



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών

Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων



**Σε συνεργασία με το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών
Σιγκελλών και Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑΤΩΝ *Shigella spp.* ΑΠΟ
ΤΗΝ ΤΡΑΠΕΖΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΝ-ΣΙΓΚΕΛΛΩΝ**

GRATUATE THESIS

**Laboratory study for *Shigella spp.* isolates, from National
Salmonella and Shigella Reference Center**



ΑΘΗΝΑ, 2021



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών

Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

ΒΑΣΙΛΙΚΗ-ΤΑΞΙΑΡΧΟΥΛΑ ΑΓΙΑΣΣΩΤΗ

VASILIKI-TAXIARCHOULA AGIASSOTI

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ

APOSTOLOS BELOUKAS

**ΟΝΟΜΑ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑΣ ΕΚΑΣΣ/ NAME OF THE SUPERVISOR OF
NSSRC.**

ΓΕΩΡΓΙΑ ΜΑΝΔΗΛΑΡΑ

GEORGIA MANDILARA

ΑΙΓΑΛΕΩ/EGALEO 2021



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών

Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων



GRATUATE THESIS

**«Laboratory study for Shigella spp. isolates, from National
Salmonella and Shigella Reference Center»**

AGIASSOTI VASILIKI-TAXIARCHOULA

vacwagiasscwth@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Apostolos Beloukas

SECOND SUPERVISOR

Georgia Mandilara

THIRD SUPERVISOR

Giannoulaki Eleni

Egaleo 2021



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών

Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων





Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών
Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων



Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

ΑΓΙΑΣΣΩΤΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ- ΤΑΞΙΑΡΧΟΥΛΑ



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών
Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων





Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών
Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων



ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η ΑΓΙΑΣΣΩΤΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ-ΤΑΞΙΑΡΧΟΥΛΑ του ΣΤΥΛΙΑΝΟΥ, με αριθμό μητρώου 62117119 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΣΕΥΠ του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα

ΑΓΙΑΣΣΩΤΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ-ΤΑΞΙΑΡΧΟΥΛΑ



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών

Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών Σιγκελλών σε συνεργασία με τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας, στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών της σχολής Βιοϊατρικών Επιστημών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, Δρ. Απόστολο Μπελούκα και εισηγητή του θέματος της διπλωματικής εργασίας για τις γνώσεις που έλαβα στο πλαίσιο της φοίτησης μου στη σχολή και για την πολύτιμη ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία σε συνεργασία με εκείνον.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και Υπεύθυνη του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών-Σιγκελών, Δρ. Μανδηλαρά Γεωργία που με δέχτηκε στην ερευνητική της ομάδα και με την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές ως προς το ερευνητικό αντικείμενο, συνέβαλε καθοριστικά στην εκπόνηση της πτυχιακής.

Ξεχωριστές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Κο Πολέμη Μιχάλη για την συμβολή του, στην δημιουργία του Δενδογράμματος της ΡFGE, καθώς και στην οικογένεια μου για την πολύτιμη στήριξη όλο αυτό το διάστημα.



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών επιστημών
Τομέας Ιατρικών εργαστηρίων



Περίληψη

Η Βακτηριακή Δυσεντερία ή αλλιώς Σιγκέλλωση είναι μια βαριά τροφιμογενής λοίμωξη, διαρροϊκή νόσος, που προκαλείται από αερόβια και δυνητικά αναερόβια gram-αρνητικά βακτήρια του γένους *Shigella spp.* Τα βακτήρια είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα πρωτεύοντα. Η μολυσματική δόση είναι πολύ μικρή καθώς η κατάποση μόλις δέκα βιώσιμων βακτηρίων είναι αρκετή για να προκληθεί η λοίμωξη (σιγκέλλωση). Το γένος *Shigella* περιλαμβάνει τα εξής είδη : *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*.

Η επιτήρηση των κρουσμάτων στην Ελλάδα είναι υποχρεωτική και ελέγχεται από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας μέσω του Συστήματος Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων από τα Νοσοκομεία. Η Εργαστηρική Επιτήρηση πραγματοποιείται ύστερα από μελέτη και καταγραφή δειγμάτων που αποστέλλονται από κλινικά εργαστήρια στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών, βερο-τοξινογόνων *E.coli*, και λοιπών εντεροπαθογόνων (ΕΚΑΣΣ).

Την περίοδο Οκτωβρίου-Δεκεμβρίου 2019, από το Γενικό Νοσοκομείο Σάμου συλλέχθηκαν δείγματα *Shigella spp.*, που προέρχονταν από δομή υποδοχής προσφύγων του νησιού και στη συνέχεια στάλθηκαν στο ΕΚΑΣΣ και στον ΕΟΔΥ, για περαιτέρω μελέτη. Πραγματοποιήθηκε οροτυποποίηση των καλλιεργημάτων, έλεγχος αντοχής σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά, μελέτη των μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά, και τυποποίηση με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis) PFGE, για να διαπιστωθεί αν τα κρούσματα οφείλονται στη διασπορά του ίδιου στελέχους.

Ταυτοποιήθηκαν 14 *Sh. flexneri 1b*, 1 *Sh. flexneri 2a* και 3 *Sh. sonnei S (I)*. Τα *Sh. flexneri 1b* και *Sh. sonnei S (I)*, βρέθηκαν θετικά στο γονίδιο CTX-M-1, με θετικό το φαινοτυπικό test DDST. Το *Sh. flexneri 2a* βρέθηκε ότι έχει μηχανισμό αντοχής *AmrC*. Όσον αφορά στη συρροή κρουσμάτων από *Shigella flexneri 1b*, φαίνεται ότι τουλάχιστον 3 διαφορετικά στελέχη αυτού του ορότυπου κυκλοφορούσαν στο κέντρο υποδοχής προσφύγων. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος ορότυπος απομονώνεται κυρίως σε χώρες όπου δεν επικρατούν καλές συνθήκες υγιεινής και πιθανά οι πρόσφυγες καθώς μετακινούνται μεταφέρουν τα διαφορετικά στελέχη με τα οποία έχουν μολυνθεί (είτε στις χώρες τους είτε στις ενδιάμεσες χώρες).

Δόθηκε θεραπεία με βάση τα εργαστηριακά αποτελέσματα και έγιναν συστάσεις για καλύτερες συνθήκες υγιεινής και ενίσχυση εργαστηριακής μελέτης.

Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει την ανάγκη της εργαστηριακής επιτήρησης των σιγκελλώσεων. Ο προσδιορισμός συγκεκριμένων στελεχών *Shigella* spp, ο πολυανθεκτικός φαινότυπος, η ικανότητα διασποράς μηχανισμών αντοχής σε κρίσιμα αντιβιοτικά κ.λ.π. αποτελούν στοιχεία όπου οδηγούν σε κρίσιμες παρεμβάσεις από τις υγειονομικές αρχές προκειμένου να ανακοπεί η μετάδοση της σιγκέλλας στον πληθυσμό.

Λέξεις-κλειδιά:

Shigella spp., σιγκέλλωση, δυσεντέρια, επιδημιολογικά δεδομένα, πρόσφυγες, μετανάστες, Ελλάδα, εργαστηριακή μελέτη, CTX-M, AmpC, ESBL, β-λακταμάσες

Abstract

Bacterial dysentery or Shigellosis is a severe foodborne infection, causing diarrheal disease, caused by aerobic and potentially anaerobic gram-negative bacteria of *Shigella* spp. The bacteria are pathogenic to humans and primates. The infectious dose is very low, only ten bacteria can cause the disease. The pathogenic species of *Shigella* are *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*.

The surveillance of shigellosis in Greece is performed through the Compulsory Disease Reporting System through National Organization of Public Health. The laboratory surveillance is performed by the National Reference Center of *Salmonella*, *Shigella*, vero-toxinogenic *E. coli* and others enteropathogens.

The General Hospital of Samos, sent isolates of *Shigella* spp. to National Organization of Public Health and National Reference Center of *Salmonella*, *Shigella*, vero-toxinogenic *E. coli* and others enteropathogens for further study, for period October-December 2019. The samples were isolated from refugees in the refugee reception center of the island. Typing of the isolates was performed (Serotyping, test for resistance to certain antibiotics, detection of antibiotic resistance mechanism, and molecular typing) in order to determine whether the isolates belong to a common strain.

14 *Sh. flexneri* 1b, 1 *Sh. flexneri* 2a and 3 *Sh. sonnei* S (I) were identified. *Sh. flexneri* 1b and *Sh. sonnei* S (I) have CTX-M-1 resistance mechanism. Three different *Sh. flexneri* 1b strains seemed to circulate within the refugees population. This result is explained by the fact that this serotype is isolated only in places without hygiene conditions. Also, the refugees, it is possible that refugees could transfer the disease from one country they visit to another.

Treatment was given on refugees, based on laboratory results. Recommendations were given for better hygiene conditions in the reception centre.

The present study highlights the necessity for laboratory surveillance of shigellosis. The identification of specific strains of *Shigella* spp., the multi-resistant phenotypes, the ability of spreading resistance mechanisms for important antibiotics etc., constitute evidence for intervention from the healthcare system, in order to restrain the spread of shigellosis.

Keywords: *Shigella* spp., shigellosis, dysentery, epidemiological data, immigrants, refugees, Greece, laboratory research, CTX-M, AmpC, ESBL, β -lactamases

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή.....	1
1.1 <i>Shigella spp.</i>	1
1.1.1) Παθογένεια	6
1.1.2) Τοξίνες.....	9
1.1.3) Τρόποι Μετάδοσης	11
1.1.4) Συμπτωματολογία	14
1.1.5) Μέθοδοι Εργαστηριακής Διάγνωσης	16
1.1.6) Θεραπεία	26
1.1.7) Αντοχή στα αντιβιοτικά	27
1.1.8) β-λακταμάσες.....	29
1.1.9) Εμβόλιο για την πρόληψη Σιγκέλλωσης.....	33
1.1.10) Τυποποίηση.....	36
1.2) Επιδημιολογικά δεδομένα Σιγκέλλωσης	37
1.2.1) Παγκόσμια Γεωγραφική Επίπτωση.....	37
1.2.2) Επιδημιολογικά Δεδομένα Ελλάδας.....	42
1.2.3) Επίπτωση Μεταναστευτικού στην Δημόσια Υγεία	47
1.3) Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων (ΣΥΔΝ)	49
1.4) Κέντρα Αναφοράς Σιγκελλών	51
2) Σκοποί- Στόχοι Εργαστηριακής μελέτης	55
3) Υλικά- Μέθοδοι Εργαστηριακής Επιτήρησης καλλιεργημάτων <i>Shigella spp.</i>	56
3.1) Απομόνωση <i>Shigella spp.</i> - Ανακαλλιέργειες.....	56
699/2019	57
3.2) Kligler- Τυποποίηση- Οροτυποποίηση	59
3.3) Απομόνωση Γενετικού υλικού- Extraction DNA	60
3.4) Αντιβιογράμματα.....	60
3.5) Μοριακή Ανίχνευση με τη Μέθοδο PCR- Ηλεκτροφόρηση.....	63
3.6) Μέθοδος PFGE	67
4. Αποτελέσματα	72
5. Συζήτηση-Συμπέρασμα.....	100
Βιβλιογραφία	103

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των ειδών <i>Shigella spp.</i> ((Smith, 1986)((Τσιρώνη, 2015)	3
Πίνακας 2: Μετατροπή ορότυπου Υ της <i>S. flexneri</i> από βακτηριοφάγους. (Minakshi, και συν., 2018).....	5
Πίνακας 3: Απομόνωση βακτηρίου <i>Shigella spp.</i> από διάφορα είδη τροφίμων. (Warren, και συν., 2007)	12
Πίνακας 4: Βιοχημικές αντιδράσεις στο Kligler Iron Agar σε διάφορα εντεροβακτηριακά, Παρατηρείται στην <i>Shigella</i> κόκκινη κεκλιμένη επιφάνεια, κίτρινος πυθμένας, δεν παράγει αέρια και υδρόθειο. (Σκεπαστιανός Π., 2012)	20
Πίνακας 5: Βιοχημικές δοκιμασίες στο TSI Η <i>Shigella</i> δεν παράγει υδρόθειο, δεν παράγει αέριο, έχει κίτρινο πυθμένα και κόκκινη κεκλιμένη επιφάνεια.	21
Πίνακας 6: Μέλη ομάδων CTX-M (Rao, 2012), (Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β-Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital In Northern Italy, 2003).....	32
Πίνακας 7: Εμβόλια δια στόματος για <i>Sh. flexneri</i> που βρίσκονται υπό μελέτη. (<i>Shigella flexneri</i> infection: pathogenesis and vaccine development, 2004)	34
Πίνακας 8: Επιβεβαιωμένα κρούσματα στην Ευρώπη, 2012-2016 (ECDC, 2016)	40
Πίνακας 9: Δήλωση κρουσμάτων από <i>Shigella</i> για την περίοδο 2004-2018 στην Ελλάδα με βάση το Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών 2004-2018	43
Πίνακας 10: Κατανομή κρουσμάτων με συχνότητα εμφάνισης κάθε στελέχους, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων και Επιτήρησης μέσω Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών- Σιγκελλών, 2004-2018 (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)	47
Πίνακας 11: Νοσήματα υποχρεωτικής δήλωσης που μεταδίδονται τροφιμογενώς, υδατογενώς, ή από περιβαλλοντική πηγή και ζωνόσοι. (Κέντρο Ελέγχου Ειδικών λοιμώξεων, 2004).....	50
Πίνακας 12: Αρίθμηση δειγμάτων <i>Shigella spp.</i>	57
Πίνακας 13: Πρωτόκολλο PCR, Ποσοότητες αντιδραστηρίων για ένα δείγμα και για 22 δείγματα.	64
Πίνακας 14: Συνθήκες κυκλοποίησης PCR (Woodford, και συν., 2005) ..	65
Πίνακας 15: Δείγματα <i>Shigella flexneri 1b</i> , που μελετήθηκαν με την μέθοδο PFGE.....	68
Πίνακας 16: Διάλυμα για Pre-cut πέψη	70
Πίνακας 17: Διάλυμα για πέψη.....	71
Πίνακας 18: Αποτελεσματα τυποποίησης βακτηρίων <i>Shigella spp.</i>	72

Πίνακας 19: Διάμετροι ζωνών αναστολής στα αντιβιοτικά, σε κάθε στέλεχος που μελετάμε, καθώς και ο χαρακτηρισμός του στελέχους ως ευαίσθητο (S) , μετρίως ευαίσθητο (I) και ανθεκτικό (R) σε κάθε αντιβιοτικό..73

Πίνακας 20: Προφίλ αντοχής *Sh. flexneri 1b* σε σύγκριση με μοριακό προφίλ PFGE.....99

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 1: Στελέχη που απομονώθηκαν στην Ουαλία και Αγγλία την περίοδο 1986-2004. Εικ. 25.1 (Greenwood, και συν., 2016)	39
Γράφημα 2: Εποχικότητα κρουσμάτων στην Ευρώπη την περίοδο 2012-2016. (Χώρες που καταγράφηκαν: Αυστρία, Βέλγιο, Βουλγαρία, Κροατία, Κύπρος, Τσεχία, Δανία, Φιλανδία, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ισλανδία, Ιρλανδία, Ιταλία, Λιθουανία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Ολλανδία, Νορβηγία, Πολωνία, Πορτογαλία, Ρουμανία, Σλοβενία, Σλοβακία, Ισπανία, Σουηδία, Αγγλία) (ECDC, 2016)	41
Γράφημα 3: Εποχικότητα κρουσμάτων στην Ευρώπη την περίοδο 2012-2016. (Χώρες που καταγράφηκαν: Αυστρία, Βέλγιο, Βουλγαρία, Κροατία, Κύπρος, Τσεχία, Δανία, Φιλανδία, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ισλανδία, Ιρλανδία, Ιταλία, Λιθουανία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Ολλανδία, Νορβηγία, Πολωνία, Πορτογαλία, Ρουμανία, Σλοβενία, Σλοβακία, Ισπανία, Σουηδία, Αγγλία) (ECDC, 2016)	41
Γράφημα 4: Κρούσματα σε σύγκριση με ηλικιακές ομάδες και φύλο ανά 100.000 πληθυσμό, 2016 στις χώρες της Ευρώπης. (Χώρες που καταγράφηκαν: Αυστρία, Βέλγιο, Βουλγαρία, Κροατία, Κύπρος, Τσεχία, Δανία, Φιλανδία, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ισλανδία, Ιρλανδία, Ιταλία, Λιθουανία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Ολλανδία, Νορβηγία, Πολωνία, Πορτογαλία, Ρουμανία, Σλοβενία, Σλοβακία, Ισπανία, Σουηδία, Αγγλία) (ECDC, 2016)	42
Γράφημα 5: Εξέλιξη δηλωμένης επίπτωσης από <i>Shigella</i> στην Ελλάδα ανά έτος με βάση το Σύστημα Δήλωσης και επιτήρησης υποχρεωτικών νοσημάτων μέσω του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών 2004-2018 (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)	44
Γράφημα 6: Κατανομή των κρουσμάτων με βάση την ηλικία των ασθενών στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων και Σύστημα Επιτήρησης μέσω του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών-Σιγκελλών, 2004-2018 (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ).....	45
Γράφημα 7: Εποχικότητα νοσήματος στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων & Σύστημα Επιτήρησης μέσω του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών-Σιγκελλών, 2004- 2018 (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ).....	46
Γράφημα 8: Ζήτηση ασύλου από Ιανουάριο 2013 έως Σεπτέμβριο 2015, (ECDC, 2015)	49
Γράφημα 9: Κατανομή εργαστηριακών επιβεβαιωμένων κρουσμάτων σιγκελλώσεως στους πρόσφυγες/μετανάστες στο κέντρο φιλοξενίας στην Σάμο, ανά βδομάδα έναρξης των κρουσμάτων, Ελλάδα, Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2019 (n=18) (Public health and clinical implications of multidrug-resistant shigellosis cases in a reception centre for refugees/ migrants, Greece, October-December 2019, 2020)	73

Κατάλογος Εικόνων

- Εικόνα 1:** Μηχανισμός δράσης των ειδών *Shigella spp.* με το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS). 1) Βακτήριο *Shigella spp.* πλησιάζει επιθηλιακό κύτταρο του εντέρου και ενεργοποιείται το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS). 2) Το σύστημα T3SS εγχέει πρωτεΐνες. 3) οι πρωτεΐνες μπορούν να δημιουργήσουν πτύχωση στη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου (ψευδοπόδια), με αποτέλεσμα να γίνεται εγκόλπωση των βακτηρίων. 4) Τα ψευδοπόδια κλείνουν και σχηματίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων κενοτόπια. (Τσιρώνη, 2015) (Tegmeyer N., 2012)7
- Εικόνα 2:** Παθογένεια βακτηρίων *Shigella spp.* Απεικονίζεται η σειρά που τα βακτήρια μολύνουν τα κύτταρα του ξενιστή και εισερχονται μέσα σε αυτά. (Tortora, και συν., 2017).....9
- Εικόνα 3:** Κατανάλωση μολυσμένης τροφής- τρόπος μετάδοσης (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ).....12
- Εικόνα 4:** Μετάδοση από άτομο σε άτομο και μόλυνση από επιφάνειες, εκτεθειμένες στο βακτήριο *Shigella spp.* (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)13
- Εικόνα 5:** Συμπτώματα (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) 14
- Εικόνα 6:** Κλινικά χαρακτηριστικά της λοίμωξης από *Shigella*. Εικ. 20.12 (Mims, και συν., 2010).....16
- Εικόνα 7:** Ανάπτυξη αποικιών *Sh. sonnei* σε θρεπτικό υλικό Mac Conkey agar. Χαρακτηριστικές λευκές αποικίες λόγω μη ζύμωσης λακτόζης. (λακτόζη αρνητικό βακτήριο) (Βιβλιοθήκη εικόνων Δημόσιας Υγείας CDC, 2014).....17
- Εικόνα 8:** *Shigella spp.* σε HE agar (Hektoen enteric agar) Η *Shigella spp* που δεν ζυμώνει την λακτόζη δημιουργεί γαλαζοπράσινες αποικίες (Βιβλιοθήκη εικόνων Δημόσιας Υγείας CDC, 2014)18
- Εικόνα 9:** SS agar, εμβολιασμένο. Φαίνονται άχρωμες αποικίες βακτηριδίων του γένους *Shigella spp.* (Σκεπαστιανός Π., 2012).....18
- Εικόνα 10:** (α) Αποικίες από *S. dysenteriae* σε XLD, (β) Αποικίες από *S. flexneri* σε XLD. (CDC, 1999).....19
- Εικόνα 11:** Αποικίες από *E. coli* εμφανίζονται με κίτρινο χρώμα, και αποικίες από *S. flexneri* με κόκκινο χρώμα. (CDC, 1999).....19
- Εικόνα 12:** Kligler Iron agar, Τυπική αντίδραση από *Shigella*. Στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα σχηματισμός κίτρινου χρώματος και στην κόκκινο χρώμα. (CDC, 1999) (Σκεπαστιανός Π., 2012).....20
- Εικόνα 13:** Βιοχημικές δοκιμασίες *S. flexneri* (επίσης παρουσιάζονται και σε πολλούς ορότυπους των *S. dysenteriae* και *S. boydii*, (1) TSI agar μη ζύμωση λακτόζης, ζύμωση γλυκόζης, μη παραγωγή αερίου και υδρόθειου, (2) Δοκιμασία ουρεάσης- αρνητική, (3) Δοκιμασία λυσίνης αρνητική, (4) δοκιμασία κιτρικών- αρνητική, (5) δοκιμασία κινητικότητας και δοκιμασία ορνιθίνης- αρνητικές αντιδράσεις, (6) δοκιμασία ινδόλης- αρνητική. ((WHO), 2015).....22

Εικόνα 14: (Αριστερά) Αρνητικό αποτέλεσμα, μη συγκόλληση αντιορού και δείγματος, (Δεξιά) Θετική αντίδραση, Συγκόλληση αντιορού και δείγματος <i>Shigella</i> . (Τσιρώνη, 2015).....	24
Εικόνα 15: Αριθμός κύκλων και αντίγραφα DNA. (Μαυρίδου Θ.Μ., 2012)	24
Εικόνα 16: Οι υποομάδες των CTX-M απεικονίζονται σε ένα δενδρόγραμμα ανάλογα με την ομολογία της αλληλουχίας των αμινοξέων. Στο τέλος των γραμμών, τα τρίγωνα δηλώνουν τις μικρόπαραλλαγές στο είδη μεταξύ τους. (The spread of CTX-M-type extended-precetrum β-lactamases, 2008)	31
Εικόνα 17: ECDC, Surveillance Atlas of infectious Diseases, Καταγεγραμμένα κρούσματα ,2018, Ελλάδα (ECDC).....	45
Εικόνα 18: Μετακινήσεις προσφύγων και μεταναστών προς τις Ευρωπαϊκές χώρες, 2015. (ECDC, 2015).....	48
Εικόνα 19: Φόρμα δήλωσης δείγματος <i>Shigella</i> στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών, βεροτοξινογόνων και λοιπών εντεροπαθογόνων	53
Εικόνα 20: Ανακαλλιέργεια <i>Shigella spp.</i> σε SS agar	58
Εικόνα 21: Ανακαλλιέργεια <i>Shigella spp</i> σε Nutrient agar	59
Εικόνα 22: Ανακαλλιέργεια <i>Shigella spp.</i> σε Kligler agar	60
Εικόνα 23: Καλλιέργεια <i>E.coli</i> ATCC 25922 σε MacConkey agar	61
Εικόνα 24: Κλίμακα McFarland, για την εκτίμηση της θολερότητας του εναιωρήματος. Η επιθυμητή κλίμακα για την δημιουργία αντιβιογραμμάτων είναι το 0,5. (notes)	62
Εικόνα 25: Plate αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη αντιβιογραμμάτων στα δείγματα από <i>Shigella</i> . Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν: ναλιδιξικό οξύ (Na), κεφεπίμη (Fer), ταζομπακτάμη (TZP), σουλφομεθοξαζόλη (SXT), Αστρεονάμη (ATM), αμιξυκλίνη-κλαβουλανικό (AMC), Κεφοταξίμη (CTX), Κεφοξιτίν (FOX), πεφλοξασίν (PEFL), κεφταζιδιμη (CAZ), ιμιπενέμη (IPM), μεροπενέμη (MEM), αμικασίνη (AN/AK).....	63
Εικόνα 26: Σύστημα ηλεκτροφόρησης (Academy)	66
Εικόνα 27: Μέθοδος ηλεκτροφόρησης γενετικού υλικού (Academy)	67
Εικόνα 28: Καλλιέργεια <i>Salmonella braenderup</i> σε XLD	69
Εικόνα 29: Εικόνα αντιβιογράματος για το <i>E. coli</i> ATCC 25922. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Έλεγχος για σωστή λειτουργία των αντιβιοτικών μας δίσκων. Σύγκριση ζωνών αναστολής με τις τιμές που έχουν δωθεί για το πρότυπο βακτήριο. Πρόβλημα με τους αντιβιοτικούς δίσκους MEM και AMC. Έγινε αλλαγή του αντιβιοτικού δίσκου AMC.	75
Εικόνα 30: Αντιβιογράμμα Δείγματος 658/2019 με ορότυπο <i>Sh. sonnei</i> . Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer,	

TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Εδώ έχει γίνει και αλλαγή του αντιβιοτικού δίσκου MEM. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στο κεφοταξίμη (CTX). Όπως φαίνεται εδώ η αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό αναστέλλει την αντοχή [έχει συνέργεια (DDST+)] με την κεφεπίμη (FEP). Επίσης υπάρχει μια συνέργεια μεταξύ αναστολέα κλαβουλανικό με την κεφοταξίμη, παρ'όλα αυτά είναι ανθεκτικό σε αυτό το αντιβιοτικό το βακτήριο. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για μηχανισμό CTX-M.....76

Εικόνα 31: Αντιβιογράμμα Δείγματος 659/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στο κεφοταξίμη (CTX), στην αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC), σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται μια πολύ μικρή συνέργεια μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό και κεφεπίμης. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.....77

Εικόνα 32: Αντιβιογράμμα Δείγματος 660/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στο κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό και κεφεπίμης, με την FEP να είναι μετρίως Ευαίσθητη , αναστολέα κλαβουλανικό με CTX, με την κεφοταξίμη να παραμένει ανθεκτική και αναστολέα κλαβουλανικό με CAZ, με την κεφταζιδιμη να είναι μετρίως ευαίσθητη. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.....78

Εικόνα 33: Αντιβιογράμμα Δείγματος 661/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC), κεφεπίμη(FEP). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό και κεφεπίμης, με την FEP να είναι ανθεκτική , αναστολέα κλαβουλανικό με CTX, με την κεφοταξίμη να παραμένει ανθεκτική, αναστολέα κλαβουλανικό με CAZ, με την κεφταζιδιμη να είναι ανθεκτική και αναστολέα ταζομπακτάμη (TZP) με κεφεπίμη(FEP), με κεφεπίμη να παρουσιάζει αντοχή. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό, με εκτεταμένο φάσμα ESBL β-λακταμασών.....79

Εικόνα 34: Αντιβιογράμμα Δείγματος 696/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na,

Fep, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται μια πολύ μικρή συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ του αναστολέα TZP με κεφεπίμη(FEP), με κεφεπίμη να παρουσιάζει ευαισθησία. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.....80

Εικόνα 35: Αντιβιογράμμα Δείγματος 697/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fep, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται μια πολύ μικρή συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ του αναστολέα TZP με κεφεπίμη(FEP), με την κεφεπίμη να παρουσιάζει μέτρια ευαισθησία. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.....81

Εικόνα 36: Αντιβιογράμμα Δείγματος 698/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fep, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεοναμη (ATM), κεφοξιτιν (FOX). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.....82

Εικόνα 37: Αντιβιογράμμα Δείγματος 708/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fep, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεοναμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ (TZP) ταζομπακτάμης με κεφοταξίμης (CTX) και κεφεπίμης (FEP), με κεφεπίμη να παρουσιάζει ευαισθησία . Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.....83

Εικόνα 38: Αντιβιογράμμα Δείγματος 744/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 2α. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fep, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή σε σουλφομεθοξαζόλη(SXT),

κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), κεφοξιπιν (FOX) και αζιθρομυκίνη (AZM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Η CTX είναι μετρίως ευαίσθητη. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.....84

Εικόνα 39: Αντιβιογράμμα Δείγματος 745/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , κεφεπίμη (FEP), σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεοναμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Με FOX ευαίσθητο και FEP ανθεκτική, συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για ESBLE εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.85

Εικόνα 40: Αντιβιογράμμα Δείγματος 746/2019 με ορότυπο *Sh. sonnei* S (I). Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), Ναλιδιξικό (Na) Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ αναστολέα κλαβουλανικό με κεφεπίμη, κεφοταξίμη και κεφταζιδιμη. Επιπλέον υπάρχει συνέργεια μεταξύ αναστολέα ταζομπακτάμης με κεφεπίμη και κεφοταξίμης. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.....86

Εικόνα 41: Αντιβιογράμμα Δείγματος 747/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ) και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.....87

Εικόνα 42: Αντιβιογράμμα Δείγματος 748/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ) και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό. Η

MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.....88

Εικόνα 43: Αντιβιογράμμα Δείγματος 778/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), κεφεπίμη (FEP), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ αναστολέα κλαβουλανικό με FEP και CAZ, καθώς επίσης αναστολέα TZP με FEP και CTX. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό, με FOX ευαίσθητο και FEP ανθεκτικό, άρα με εκτεταμένο φάσμα β-λακταμασών ESBL.....89

Εικόνα 44: Αντιβιογράμμα Δείγματος 779/2019 με ορότυπο *Sh. sonnei* S(1). Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ αναστολέα κλαβουλανικό με FEP, CAZ και CTX, καθώς επίσης αναστολέα TZP με FEP και CTX. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.....90

Εικόνα 45: Αντιβιογράμμα Δείγματος 793/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.....91

Εικόνα 46: Αντιβιογράμμα Δείγματος 794/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), κεφεπίμη (FEP), αμοξικυλλίνη-κλαβουλανικό (AMC). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό, με FOX ευαίσθητο και FEP ανθεκτικό, άρα με εκτεταμένο φάσμα β-λακταμασών ESBL.92

Εικόνα 47: Αντιβιογράμμα Δείγματος 699/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 1b. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) ,

σουλφομεθοξαζόλη(SXT), πεφλοξασίνη (PEFL),αμοξικυλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.....93

Εικόνα 48: Τεστ κεφοτετάνης για ανίχνευση AmpC μηχανισμού στο δείγμα 744/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 2a A*) Πάνω αριστερά δισκίο κεφοξιπίν με ζώνη αναστολής 6mm (ανθεκτικό) και δεξιά δισκίο κεφοτετάνης με ζώνη αναστολής 26mm (ευαίσθητο), Β) Κάτω δισκία με προσθήκη 20μL φαινυλ-βορικού οξέος, αριστερά δισκίο κεφοξιπίν με ζώνη αναστολής 12mm (ανθεκτικό) και δεξιά δισκίο κεφοτετάνης με ζώνη αναστολής 31mm (ευαίσθητο), όρια κεφοτετάνης σύμφωνα με CLSI, < 12mm ανθεκτικό.....94

Εικόνα 49: Εικόνα αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης για τα στελέχη *Sh. flexneri 1b*95

Εικόνα 50: Εικόνα αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης μεθόδου PCR για στελέχη *Sh. flexneri 1b* και *Sh. sonnei S(I)*95

Εικόνα 51: Εικόνα αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης μετά από πέψη του DNA με XbaI (μεθόδος PFGE) για τα στελέχη *Sh. flexneri 1b*.....96

Εικόνα 52: Το Δενδρόγραμμα που προέκυψε από την επεξεργασία των μοριακών προφίλ ύστερα από την πέψη του DNA των καλλιεργημάτων με την περιοριστική ενδονουκλεάση XbaI και ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το Πρόγραμμα Bionumerics.....98

1.Εισαγωγή.

Σε αυτήν την εργασία θα γίνει παρουσίαση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη καλλιιεργημάτων *Shigella spp.*, που απομονώθηκαν από κοπρανοκαλλιέργειες μεταναστών και προσφύγων που νοσηλεύτηκαν στο Γενικό Νοσοκομείο Σάμου, και αποστάθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών, βερο-τοξινογόνων *E.coli*, και λοιπών εντεροπαθογόνων (ΕΚΑΣΣ), στα πλαίσια της επιτήρησης των κρουσμάτων στην Ελλάδα σύμφωνα με το Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων ύστερα από μελέτη και καταγραφή. Επίσης θα γίνει μελέτη της αντοχής των στελεχών στα αντιβιοτικά και χαρακτηρισμός πλήρους φαινοτύπου για το καθένα. Θα γίνει ανάλυση κάθε διαδικασίας και πρωτόκολλου που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο και καταγραφή όλων των δεδομένων.

1.1 *Shigella spp.*

Η τάξη Enterobacteriales ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια που συνιστά την μεγαλύτερη υποομάδα των πρωτεοβακτηρίων, μήκους 2-4 cm. (Kenneth R., et al., 2014) (Tortora, και συν., 2017) Είναι δυνητικά αναερόβια, αρνητικά gram βακτηρίδια, μη σπορογόνα. Κάποια έχουν κινητικότητα με τη βοήθεια των μαστίγιων που διαθέτουν σε όλη τους την επιφάνεια (περίτριχα). (Tortora, και συν., 2017) Αποτελούν την ομάδα των εντεροβακτηριακών που πήρε το όνομα της, λόγω των βακτηριδίων που αποικίζουν στο γαστρεντερικό σύστημα των οργανισμών(αποτελεί το σύστημα με τα περισσότερα μικρόβια σε όλο τον οργανισμό και συγκεκριμένα το τμήμα του παχέος εντέρου). (Λεγάκης, και συν., 2013) Τα εντεροβακτήρια επίσης μπορούν να βρίσκονται σε τροφιμα, νερό, έδαφος και στα ζώα. (Singh, και συν., 2015) Κύριος εκπρόσωπος των εντεροβακτηριακών είναι τα αναερόβια μικρόβια, 10-100 τρισεκατομμύρια περίπου ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου. Τα αερόβια είναι σε μικρότερο αριθμό, περίπου 1-10 τρισεκατομμύρια ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου. (Λεγάκης, και συν., 2013). Τα περισσότερα ζυμώνουν την γλυκόζη, ένα μεγάλο μέρος τους τη λακτόζη και άλλους υδατάνθρακες. Αποτελούν την πιο κοινή αιτία λοιμώξεων ουροποιητικού συστήματος και παίζουν σημαντικό ρόλο και στις λοιμώξεις

γαστρεντερικού συστήματος. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα γένη *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia*. (Tortora, και συν., 2017), (Mims, et al., 2010)

Η *Shigella spp.* απομονώθηκε πρώτη φορά από έναν Ιάπωνα επιστήμονα, τον Kiyoshi Shiga, το 1898, όπου και πήρε το όνομα της. (Trofa, και συν., 1999) Ωστόσο υπάρχουν αναφορές ότι οι Ogata (1892) στην Ιαπωνία και Chartemesse και Widal (1888) στην Γαλλία, ίσως είχαν καταφέρει να απομονώσουν τον βάκιλλο νωρίτερα. Το γένος *Shigella* δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά το 1919. (Percival, et al., 2013) Αρχικά είχε ονομαστεί *Bacillus dysenteriae* λόγω του σχήματος που είχε και τη στενή συγγένεια με το γένος *Escherichia*, όπου τότε ονομαζόταν *Bacillus Coli*. (Tang, et al., 2015) Φυλογενετικές μελέτες που γίνονται σε αυτά τα βακτήρια έδειξαν ότι συγγενεύουν με τους εντεροδισδυτικούς οροτύπους του *E.coli* και μόνο η *S.boydii* έχει μακρινή συγγένεια με τα άλλα είδη του γένους *Shigella*. (Greenwood, και συν., 2016) Είναι gram (-) βακτήρια, μη κινητικοί βάκιλλοι που συνήθως δεν ζυμώνουν τη λακτόζη, δίνοντας λευκές αποικίες. Δεν παράγουν αέριο (μερικοί *S. flexneri* παράγουν αέριο), καταλάση θετικοί, οξειδάση αρνητικοί. Δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε KCN. Το ποσοστό (mol %) G+C του DNA είναι 49-53 (Smith, 1986). Δεν αποκαρβοξυλιώνουν τη λυσίνη και υδρολύουν την αργινίνη. (Percival, et al., 2013) Δεν παράγουν ουρεάση, δεν παράγεται υδρόθειο, δίνουν αρνητική την αντίδραση Voges-Proskauer (VP) και θετική την αντίδραση ερυθρού του μεθυλίου. Δεν υγροποιούν την ζελατίνη και δεν χρησιμοποιούν το μηλονικό νάτριο. (Kluwer academic/ plenum publishers, 2003) Είναι αναερόβιο βακτήριο που αναπτύσσεται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C. Καταστρέφεται στους 55 °C σε μία ώρα. Μπορεί να αντέξει σε όξινο pH (pH= 2,5) για μικρή περίοδο (έτσι δεν επηρεάζονται τα βακτήρια από την οξύτητα του στομάχου) (Tortora, και συν., 2017), προτιμάει να αναπτύσσεται όμως σε αλκαλικό pH (pH=7,0-7,4). (Percival, et al., 2013). Το 2002, σύμφωνα με τα κέντρα πρόληψης ασθενειών και το πρόγραμμα για πρόληψη αναδυόμενων λοιμώξεων, η *Shigella* χαρακτηρίστηκε ως το τρίτο σε συχνότητα τροφιμογενές βακτήριο. (Warren, et al., 2007)

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των ειδών *Shigella spp.* ((Smith, 1986)(
(Τσιρώνη, 2015)

Χαρακτηριστικό	Είδη <i>Shigella</i>			
	<i>S.dysenteriae</i>	<i>S.flexneri</i>	<i>S.boydii</i>	<i>S.sonnei</i>
Ορότυποι	1-10	1-6 με υπο-ορότυπους 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b	1-15	1
β-γαλακτοζιδάση	(-) ^a , ορότυπος 1 (+), άλλοι ορότυποι μπορεί να είναι (+)	(-), στελέχη του οροτύπου 2a (+)	(-), στελέχη του οροτύπου 9 (+)	(+)
Ανάπτυξη οξικού νατρίου	(-)	(-), στελέχη του οροτύπου 4 (+)	(-)	(-)
Αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης	(-)	(-)	(-), στελέχη του οροτύπου 13 (+)	(+)
Ινδόλη	Ορότυπος 1 (-), ορότυπος 2 (+), άλλοι ορότυποι (±)	Ορότυπος 6 (-), άλλοι ορότυποι (±)	(±)	(-)
Οξύ από γλυκόζη	(+)	(+)	(+)	(+)
Αέριο από γλυκόζη	(-)	(-), στελέχη του οροτύπου 6 (+)	(-), στελέχη των οροτύπων 13 και 14 (+)	(-)
Οξύ από λακτόζη	(-)	(-), στελέχη του οροτύπου 2a (+)	(-), στελέχη του οροτύπου 9 (+)	(+) κατόπιν αρκετών ημερών
Οξύ από μαννιτόλη	(-)	(+), στελέχη των οροτύπων 4a και 6 (-)	(+)	(+)
Οξύ από σακχαρόζη	(-)	(-)	(-)	(+) κατόπιν αρκετών ημερών
Οξύ από δουλσιτόλη	(-), στελέχη του οροτύπου 5 (+)	(-), στελέχη του οροτύπου 6(+)	(-), ορότυποι 2,3,4,6 και 10 (+)	(-)
Οξύ από ραφινόζη	(-)	(±)	(-)	(+) κατόπιν αρκετών ημερών
Οξύ από ξυλόζη	(-)	(-)	(±)	(±)
Καταλάση	(+), ορότυπος 1 (-)	(+)	(+)	(+)

^a(-) αρνητικά, (+) θετικά, (±) μεταβαλλόμενα

Το βακτηριακό γένος περιλαμβάνει τέσσερα είδη ή οροομάδες:

- *S. dysenteriae* (Οροομάδα A)
- *S. flexneri* (Οροομάδα B)
- *S. boydii* (Οροομάδα C)
- *S. sonnei* (Οροομάδα D)

Οι οροομάδες A,B,C διαιρούνται σε 15, 19, 23 οροτύπους και υποτύπους αντίστοιχα και γράφονται με αραβικούς αριθμούς και μικρά γράμματα (π.χ. *S. flexneri* 2a). (Aslam, και συν., 2019) (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Η *S. sonnei* (ομάδα D) έχει ένα μόνο ορότυπο. Αυτή η διαφοροποίηση σε οροτύπους-υποτύπους γίνεται βάσει του ειδικού αντιγόνου της επιφάνειας του βακτηρίου, το αντιγόνο του κυτταρικού τοιχώματος(O). Ο λιποπολυσακχαρίτης εξωτερικής μεμβράνης (LPS) ονομάζεται αντιγόνο O. Η *Shigella* δεν έχει αντιγόνα μαστιγίου (H), εφόσον δεν διαθέτει μαστίγια. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) (Kenneth R., και συν., 2014) Δεν διαθέτουν έλυτρο, οπότε τους λείπει το αντιγόνο K (K από το δανέζικο Kapsel, κάψουλα). (Kenneth R., και συν., 2014) (Greenwood, και συν., 2016) Τα είδη αυτά προσβάλλουν μόνο τον άνθρωπο και τους ανθρωποειδούς πιθήκους. (Tortora, και συν., 2017)

S. dysenteriae: Αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή από όλες. Προκαλεί βαριά δυσεντερία και εξάντληση, λόγω την τοξίνης Shiga που είναι εξαιρετικά παθογόνος. Με αυτή την τοξίνη διαφοροποιείται από τα άλλα είδη. Έχει 15 οροτύπους, με τον ορότυπο 1 να είναι το αίτιο για την πιο βαριά δυσεντερία. (Greenwood, και συν., 2016) (Tortora, και συν., 2017) (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Είναι σπάνια μορφή και απαντάται κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες, όπως χώρες της Αφρικής. Η θνησιμότητα φτάνει το 5-15%. Η *S. dysenteriae* πήρε το όνομα της από την Kiyoshi Shiga. (Murray, et al., 2016)

S. flexneri: Διακρίνεται σε 19 οροτύπους. (D.P. Muthuirulandi Sethuvel, 2016) Συνήθως προκαλεί βαριά νόσο. (Mims, και συν., 2010) Επικρατεί σε αναπτυσσόμενες χώρες. Η *S. flexneri* πήρε το όνομα της από τον Simon Flexner. (Murray, και συν., 2016) Η *S. flexneri* έχει αναφερθεί ότι υφίσταται αλλαγές στον ορότυπο Y, που προκαλείται από έξι είδη βακτηριοφάγων, προκειμένου να ξεφύγει από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. (Minakshi, et al., 2018)

Πίνακας 2: Μετατροπή ορότυπου Y της *S. flexneri* από βακτηριοφάγους. (Minakshi, και συν., 2018)

Φάγος	Μετατροπή
SfI	Ορότυπος Y ως 1α
SfII	Ορότυπος Y ως 2α
Sf6	Ορότυπος Y ως 3b
SfIV	Ορότυπος Y ως 4α
SfV	Ορότυπος Y ως 5α
SfX	Ορότυπος Y ως X

S. boydii: Διακρίνεται σε 23 ορότυπους (Aslam, και συν., 2019) και προκαλεί και αυτή σοβαρές λοιμώξεις. (Mims, και συν., 2010) Η *S. boydii* πήρε το όνομα της από τον Mark Boyd. (Murray, et al., 2016)

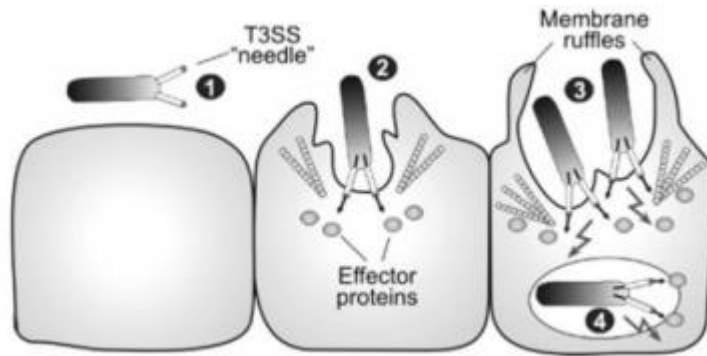
S. sonnei: Προκαλεί ήπιες λοιμώξεις, κυρίως σε ανεπτυγμένες χώρες. (Tortora, και συν., 2017) Ευθύνεται για το 85% των περιπτώσεων στις Η.Π.Α. (Murray, και συν., 2016) Έχει ορολογική ομοιογένεια με τα άλλα είδη και για να διακριθεί σε στελέχη, για επιδημιολογικούς σκοπούς κυρίως, γίνεται χρήση δεικτών όπως παροχή ειδικών κολισινών, φορεία πλασμιδίων αντοχής ή άλλων πλασμιδίων ή λυσιγονία από βακτηριοφάγους. (Greenwood, και συν., 2016) Πήρε το όνομα της από τον Carl Sonne. (Murray, et al., 2016) Η *S. sonnei* μπορεί να χωριστεί σε πέντε βιότυπους (a, b, e, f, g), με βάση βιοχημικές ιδιότητες. (Minakshi, και συν., 2018)

Η *Shigella spp.* έχει την ικανότητα να εισβάλλει και να αναπαράγεται εντός του επιθηλίου του παχέως εντέρου προκαλώντας τη νόσο που είναι γνωστή ως Σιγκέλλωση και ως βακτηριακή δυσεντερία. (Lluque, και συν., 2015) Είναι βαριά διαρροϊκή νόσος, με πολύ μικρή μολυσματική δόση σε σύγκριση με άλλα παθογόνα όπως *Escherichia coli* και *Vibrio cholerae* (Percival, et al., 2013), καθώς δέκα μόνο βιώσιμα βακτήρια στην *S. dysenteriae* και 500 βακτήρια στην *S. sonnei* μπορούν να προκαλέσουν την νόσο. Άτομα νεαρής ηλικίας, ηλικιωμένοι, ή άτομα ανοσοκατεσταλμένα διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσήσουν. Η εξάπλωση της λοίμωξης είναι κοινή από άνθρωπο σε

άνθρωπο και εύκολη σε περιπτώσεις κακής υγιεινής (π.χ. στρατόπεδα, στρατόπεδα προσφύγων, βρεφονηπειαγωγεία, παιδικοί σταθμοί και ιδρύματα αναπήρων). (Warren, et al., 2007)

1.1.1) Παθογένεια

Τα βακτήρια δεν επηρεάζονται από την οξύτητα του στομάχου, με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται και να φτάνουν στο λεπτό έντερο σε μεγάλους αριθμούς, και στη συνέχεια φτάνουν στο παχύ έντερο, όπου είναι η κύρια εστία της λοίμωξης και συγκεκριμένα τα κύτταρα M, στις πλάκες του Peyer. (Tortora, και συν., 2017) Τα στελέχη της *Shigella* παρουσιάζουν ακινησία, οπότε είναι άγνωστο για το πως φτάνουν στο παχύ έντερο. Προσκολλώνται στο βλεννογόνο του εντέρου και δημιουργείται φλεγμονή (Greenwood, και συν., 2016), έτσι διευκολύνεται η εισβολή στα κύτταρα M με την βοήθεια κυτταρικών προεκβολών που εντοπίζονται σε αυτά τα κύτταρα και ενδοκυτταρώνουν το βακτήριο. (Tortora, και συν., 2017) Όταν τα βακτήρια *Shigella* έρχονται σε επαφή με επιθηλιακά κύτταρα ενεργοποιείται το σύστημα έκκρισης τύπου 3 (T3SS). (Lluque, και συν., 2015) Τα συστήματα έκκρισης τύπου III (T3SS) έχουν κρίσιμο ρόλο στη λοιμογόνο δράση πολλών gram (-) βακτηρίων. Μετά την στενή επαφή με τα κύτταρα ενός ξενιστή, το σύστημα T3SS εγχέει πρωτεΐνες με λοιμογόνο δράση και οδηγεί σε κυτταρική εισβολή, πολλαπλασιασμό μέσα στο κύτταρο, διάδοση μεταξύ κυττάρων, καταστροφή των ιστών ή ακόμα και αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος. (Bohn, και συν., 2019) (Murray, και συν., 2016) Αυτά τα γονίδια βρίσκονται σε ένα πλασμίδιο μεγάλης λοιμογονικότητας, 180 έως 220 kDa, αλλά ρυθμίζονται από γονίδια του χρωμοσώματος, με αυτό το τρόπο το πλασμίδιο δεν εξασφαλίζει τη λειτουργική δραστηριότητα των γονιδίων. Το σύστημα T3SS μεσολαβεί για την έκκριση τεσσάρων πολύ ανοσογόνων πολυπεπτιδίων, τα IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα. (Murray, και συν., 2016) (Warren, και συν., 2007) Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να δημιουργήσουν πτύχωση στη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, με αποτέλεσμα να γίνεται εγκόλπωση των βακτηρίων.



Εικόνα 1: Μηχανισμός δράσης των ειδών *Shigella spp.* με το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS). 1) Βακτήριο *Shigella spp.* πλησιάζει επιθηλιακό κύτταρο του εντέρου και ενεργοποιείται το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS). 2) Το σύστημα T3SS εγχέει πρωτεΐνες. 3) οι πρωτεΐνες μπορούν να δημιουργήσουν πτύχωση στη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου (ψευδοπόδια), με αποτέλεσμα να γίνεται εγκόλπωση των βακτηρίων. 4) Τα ψευδοπόδια κλείνουν και σχηματίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων κενοτόπια. (Τσιρώνη, 2015) (Tegmeyer N., 2012)

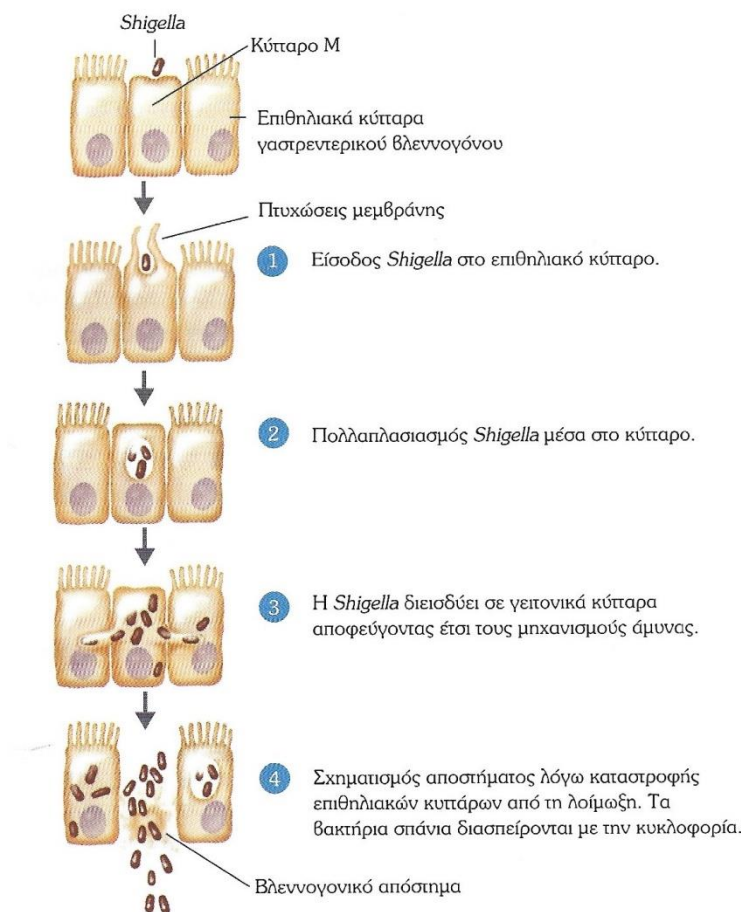
Στην εισβολή διαμεσολαβεί επίσης το γονίδιο *virR*, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου και το γονίδιο *virF*, που βρίσκεται στο πλασμίδιο μολυσματικότητας. Το γονίδιο *virF* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 30 kDa που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *Ipa*. Το γονίδιο *virR* εξαρτάται από την θερμοκρασία. Κάποια στελέχη γίνονται διεισδυτικά στους 37 °C, και τα λοιμογόνα πλασμιδικά πολυπεπτίδια κωδικοποιούνται σε αυτήν την θερμοκρασία. Όταν τα βακτήρια *Shigella* αναπτύσσονται στους 30 °C, δεν μπορούν να εκφράσουν τα πολυπεπτίδια *Ipa*. Όμως στους 37°C, έχουν πλήρη διεισδυτική και μολυσματική ικανότητα.

Κατά την εισβολή των βακτηρίων, στο γαστρεντερικό σωλήνα, και καθώς κατευθύνονται στα κύτταρα M, γίνεται μόλυνση μακροφάγων κατά την διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης και προκαλείται απόπτωση των κυττάρων, γλιτώνοντας έτσι από την φαγοκυττάρωση. Τα μολυσμένα μακροφάγα παράγουν μια ιντερλευκίνη-1β, η οποία προσελκύει πολυμορφοπύρρηνα λευκά αιμοσφαίρια στους ιστούς που έχουν προσβληθεί, προκαλώντας ισχυρή φλεγμονή. Το εντερικό τοίχωμα αποσταθεροποιείται και

έτσι τα βακτήρια μπορούν να φτάσουν σε πιο βαθιά επιθήλια. Μόλις απελευθερωθούν τα βακτήρια από το μακροφάγο, μεταδίδονται οριζοντίως στα γειτονικά κύτταρα και στη βασική μεμβράνη μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται, μικροπιοκυττάρωση. (Micropinocytosis) Ο ξενιστής επεκτείνει προεκβολές στην μεμβράνη του, σε σχηματισμούς γνωστούς ως ψευδοπόδια, με την βοήθεια των IPa πρωτεϊνών. Τα ψευδοπόδια κλείνουν και σχηματίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων κενοτόπια. Αφού απορροφήθηκαν στο εσωτερικό των κυττάρων, σπάνε τα κενοτόπια και τα βακτήρια απελευθερώνονται στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή και γίνεται γρήγορος πολλαπλασιασμός. Μέσω της αναδιάταξης που έχουν τα νημάτια ακτίνης στον ξενιστή, τα βακτήρια μετακινούνται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, και με την δίοδο από κύτταρο σε κύτταρο μολύνονται τα γειτονικά του. (Murray, και συν., 2016) (Warren, και συν., 2007)

Για να αναπτυχθούν τα βακτήρια χρειάζεται απόκτηση θρεπτικών υλικών από τον ξενιστή. Η *Shigella* έχει την ικανότητα να δεσμεύει σίδηρο από τον ξενιστή μέσω συστήματος απόκτησης σιδήρου υψηλής συγγένειας. Κατά την μεταφορά σιδήρου από την αίμη, η *Shigella* χρησιμοποιεί τα σιδηροφόρα Αεροβαντίνη και Εντεροβακτίνη χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υποδοχέα-μεταφοράς. Τα σιδηροφόρα έχουν μικρό μοριακό βάρος, και βοηθούν στην απομάκρυνση σιδήρου από τους ξενιστές. Η εντεροβακτίνη δεν παράγεται από όλα τα είδη *Shigella*, ενώ η αεροβαντίνη παράγεται από τα *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii*. (Warren, και συν., 2007)

Η εξάπλωση της μόλυνσης ρυθμίζεται από το γονίδιο *icsA* (*virG*), που βρίσκεται στο πλασμίδιο μολυσματικότητας. Από αυτό το γονίδιο, κωδικοποιείται η πρωτεΐνη *IcsA*, η οποία επιτρέπει την κινητικότητα και την εξάπλωση στα γειτονικά κύτταρα. Τα βακτήρια σχηματίζουν μια προεξοχή στη μεμβράνη, συνδεδεμένη με το γειτονικό κύτταρο, καταφέροντας να διαφύγει και να μολύνει τα γειτονικά κύτταρα. (Warren, και συν., 2007)



Εικόνα 2: Παθογένεια βακτηρίων *Shigella spp.* Απεικονίζεται η σειρά που τα βακτήρια μολύνουν τα κύτταρα του ξενιστή και εισερχονται μέσα σε αυτά. (Tortora, και συν., 2017)

1.1.2) Τοξίνες

Δύο χρόνια μετά την ανακάλυψη του βακτηρίου από τον Kiyoshi Shiga, ο Flexner ανακάλυψε τον αιτιολογικό παράγοντα νέκρωσης ποντικών από μόλυνση του βακτηρίου *Shigella spp.* Συμπέρανε ότι αυτή η λοίμωξη οφείλεται σε έναν τοξικό παράγοντα. (Flexner 1900). Το 1903 ο Conrad παρατήρησε ότι οι καλλιέργειες του *S. dysenteriae* τύπου 1, προκαλούν διάρροια, παράλυση και θάνατο μέσα σε 48-72 ώρες από την ενδοφλέβια χορήγηση τους σε νεαρά ενήλικα ποντίκια. Εξαιτίας αυτών των ευρημάτων, ο αιτιολογικός παράγοντας ονομάστηκε Shiga νευροτοξίνη ή απλά Shiga toxin. Ο Todd το 1904, πρόσεξε ότι η μόλυνση από τη *S. flexneri* προκαλεί διάρροια, αλλά όχι παράλυση, δηλώνοντας έτσι ότι η Shiga-τοξίνη αποτελεί τοξίνη μόνο της *S. dysenteriae*. (Niyogi, 2005) Ο ορότυπος 1 της *S. dysenteriae* παράγει μια ισχυρή πρωτεϊνική Shiga-τοξίνη (STX), που

καταστρέφει τους ιστούς και αποτελεί μια από τις πιο ισχυρές βακτηριακές τοξίνες, παρόμοια με τη Vero-κυτταροτοξίνη ή βέροτοξίνη (VT-1) που εκφράζεται από τα βεροτοξινογόνα *E. coli* (VTEC). Η διαφορά με την VT-1 είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν την STX, αυτά εντοπίζονται στο χρωμόσωμα. (Angela , και συν., 2014) (Greenwood, και συν., 2016), (Warren, και συν., 2007) Η STX αυξάνει τη σοβαρότητα της νόσου και δεν είναι απαραίτητη για τη διατήρηση μιας λοίμωξης. Η STX σχετίζεται με κυτταροτοξικότητα, εντεροτοξικότητα και νευροτοξικότητα καθώς επίσης αναστέλλει και την πρωτεϊνική σύνθεση. Αυτή η τοξίνη είναι ένα από τα πιο γνωστά βιολογικά δηλητήρια και ανήκει στην οικογένεια των Shiga τοξινών (SLT), με το πιο γνωστό παθογόνο σε αυτήν την οικογένεια το *E. Coli* O157:H7. (Warren, και συν., 2007) (Angela , και συν., 2014) Είναι αποδεδειγμένο ότι η Shiga-τοξίνη ρυθμίζεται από το σίδηρο και σε περίπτωση έλλειψης σιδήρου, η παραγωγή της τοξίνης αυξάνεται. (Greenwood, και συν., 2016) Η Shiga-τοξίνη προκαλεί συσσώρευση υγρού σε βρόγχους κουνελιών, νεφρική βλάβη σε ποντίκια, κουνέλια, μπαμπούνους και είναι θανατηφόρα για αρκετά ζώα κατά την ενέσιμη χορήγηση της. (Angela , και συν., 2014)

Αποτελείται από δύο πολυπεπτίδια: πέντε υποομάδες B (7,691 M.B. το καθένα) και μια A υποομάδα (32,225 M.B.) που ενώνονται μη ομοιοπολικά μεταξύ τους. (Angela , και συν., 2014) Η υποομάδες B βοηθούν να δεσμευτεί το βακτήριο στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή. Η υποομάδα A μπαίνει στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή και σπάει τον N-γλυκοσιδικό δεσμό της αδενίνης (Warren, και συν., 2007), επίσης έχει τις ιδιότητες της τοξίνης. (Greenwood, και συν., 2016) Η υπομονάδα B της Shiga- τοξίνης συνδέεται με μόρια ενός γλυκολιπιδίου, το γκλομποτριουλοκεραμιδίου (Gb₃), που υπάρχει στην επιφάνεια κάποιων ευκαρυωτικών κυττάρων του κυττάρου ξενιστή και διευκολύνουν την μεταφορά της A υπομονάδας μέσα στο κύτταρο. Κατά την παθογένεση, η απελευθέρωση ιντερλευκίνης-1 και του παράγοντα νέκρωσης όγκων, βοηθά να αυξηθεί η ποσότητα Gb₃, ενισχύοντας έτσι την σύνδεση κυττάρων και τοξίνης. (Greenwood, και συν., 2016)

Η Shiga-τοξίνη όταν μπαίνει στα κύτταρα του ξενιστή, παραμένει δραστική στα ενδοσώματα, φτάνοντας στο σύστημα Golgi. Η υπομονάδα A διασπάτε σε δύο κλάσματα, τα A₁ και A₂. Το κλάσμα A₁ διασπά το 28S rRNA στην 60S

ριβωσωμική υπομονάδα. Έτσι εμποδίζεται η πρόσδεση του αμινοακυλο-μεταφορικού RNA και διακόπτεται η πρωτεϊνοσύνθεση και επέρχεται κυτταρικός θάνατος. Η τοξίνη προκαλεί κυρίως προβλήματα στο εντερικό επιθήλιο και το καταστρέφει. Ωστόσο κάποιοι ασθενείς εμφανίζουν βλάβες στα ενδοθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σπειραμάτων και οδηγούνται σε νεφρική ανεπάρκεια. Πιστεύεται επίσης ότι είναι υπεύθυνη για το ουραιμικό-αιμολυτικό σύνδρομο σε νεφρικούς ιστούς. Έχει αποδειχθεί ότι έχει νευροτοξικές ιδιότητες. (Greenwood, και συν., 2016) (Murray, και συν., 2016)

Πρόσφατα έχουν ανακαλυφθεί δύο νέες εντεροτοξίνες, enterotoxin *Shigella* 1 (ShET 1) και enterotoxin *Shigella* 2 (ShET 2). Πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην κλινική εκδήλωση της νόσου. Το ShET 1 απομονώθηκε κυρίως από τα στελέχη *S. flexneri* 2a, σε αντίθεση με το ShET 2 που ανιχνεύεται σε όλα τα στελέχη λόγω της θέσης που έχει στο πλασμίδιο μολυσματικότητας. (Warren, και συν., 2007)

1.1.3) Τρόποι Μετάδοσης

Η *Shigella spp.* μεταδίδεται άμεσα ή έμμεσα μέσω της κόπρανο-στοματικής οδού από ασυμπτωματικούς φορείς ή ασθενείς και είναι πολύ μεταδοτική νόσος. (Greenwood, και συν., 2016) (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

A) Κατανάλωση μολυσμένης τροφής.

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος μετάδοσης είναι η κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή νερού με κόπρανα. Η μολυσματική δόση του παθογόνου είναι πολύ μικρή και κυμαίνεται μεταξύ 10-100 μικροοργανισμούς. Ιδιαίτερη πηγή μόλυνσης αποτελεί η κατανάλωση ωμών τροφίμων. (Greenwood, και συν., 2016) Η *Shigella spp.* είναι ανθεκτική στο αλάτι και μπορεί να επιβιώσει σε πολλούς τύπους τροφίμων, όπως φρούτα, λαχανικά, συσκευασμένα τρόφιμα, τρόφιμα με χαμηλό pH. Η επιβίωση του βακτηρίου αυξάνεται σε ψυκτικές θερμοκρασίες. (Warren, και συν., 2007) Η *S. sonnei* αποτελεί ανθεκτικό είδος για τα τρόφιμα και μπορεί να αναπτυχθεί σε ελάχιστη θερμοκρασία 6-7 °C με μέγιστη 45-47 °C. Υπάρχουν αναφορές ότι μπορεί να αναπτυχθεί και σε κομμένα φρούτα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. (Τσιρώνη, 2015)



Εικόνα 3: Κατανάλωση μολυσμένης τροφής- τρόπος μετάδοσης (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

Πίνακας 3: Απομόνωση βακτηρίου *Shigella spp.* από διάφορα είδη τροφίμων. (Warren, και συν., 2007)

Χρονιά	Όροτυπος	Εμπλεκόμενα τρόφιμα
1983	<i>S. sonnei</i>	Ανάμεικτη Σαλάτα
1986	<i>S. sonnei</i>	Ψιλοκομμένο μαρούλι
1986	<i>S. sonnei</i>	Ωμά στρείδια
1987	<i>S. sonnei</i>	Καρπούζι
1988	<i>S. sonnei</i>	Ωμή tofu σαλάτα
1989	<i>S. flexneri</i> 4a	Γερμανική πατατοσαλάτα
1992	<i>S. flexneri</i> 2	Ανάμεικτη σαλάτα
1994	<i>S. sonnei</i>	μαρούλι ice berg
1995-6	<i>S. sonnei</i>	Γαλλικό παστεριωμένο τυρί
1996	<i>S. flexneri</i>	Σαλάτα
1998	<i>S. sonnei</i>	Μαιντανός
1998	<i>S. flexneri</i>	Εστιατόριο-Αγνωστη πηγή
1999	<i>S. boydii</i> 18	Σαλάτα φασολιών
2000	<i>S. sonnei</i>	Φασόλια
2001	<i>S. sonnei</i>	Ωμά στρείδια
2002	<i>Shigella spp.</i>	Ελληνική σαλάτα ζυμαρικών

Β) Μετάδοση από χειριστή τροφίμων.

Έχει παρατηρηθεί επίσης μόλυνση τροφής από φορέα του μικροβίου ή ασθενή, που δεν τηρεί τα μέτρα ατομικής προστασίας. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

Γ) Μετάδοση από άτομο σε άτομο.

Μετάδοση από άτομο σε άτομο μέσω της κόπρανο-στοματικής οδού μπορεί να συμβεί και χωρίς κάποιο ενδιάμεσο μολυσμένο τρόφιμο. Σε περίπτωση μη τήρησης των κανόνων υγιεινής, παρατηρείται συχνά σε σπίτια, σε ιδρύματα, στρατόπεδα, σχολεία. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί και κατά τη σεξουαλική επαφή, σε άτομα που εφαρμόζουν τεχνικές που μπορεί να φέρουν σε επαφή στην στοματική κοιλότητα με τον πρωκτό και κατ' επέκταση μόλυνση μέσω εντεροστοματικής οδού. (Greenwood, και συν., 2016) (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)



Εικόνα 4: Μετάδοση από άτομο σε άτομο και μόλυνση από επιφάνειες, εκτεθειμένες στο βακτήριο *Shigella spp.* (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

Δ) Άλλοι τρόποι μετάδοσης.

Λόγω του ότι η *Shigella* και κυρίως η *S. sonnei* μπορεί να επιβιώσει στο περιβάλλον (κυρίως σε υγρά και σκοτεινά μέρη) μέχρι και 20 ημέρες, ο μικροοργανισμός μπορεί να μεταδοθεί μέσω οποιουδήποτε μολυσμένου με κόπρανα αγωγού, αντικειμένου, επιφάνειας (πετσέτες, τουαλέτες, κλινοσκεπάσματα, βρύσες, παιχνίδια κ.α.) (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Οι *Shigella spp.* απελευθερώνονται και στον αέρα, όταν απομακρύνεται από την λεκάνη μια διαρροϊκή κένωση την στιγμή που τραβάμε το καζανάκι, υπό μορφή αερολύματος. Πέφτουν τα αερολύματα στις κοντινές επιφάνειες και αντικείμενα και μπορούν να επιζήσουν τα βακτήρια για μέρες σε ατμόσφαιρα με υγρασία. (Greenwood, και συν., 2016) Οι μύγες, επίσης, μπορούν να μεταφέρουν μηχανικά το βακτήριο σε εκτεθειμένες τροφές. Τροφιμογενείς και υδατογενείς επιδημίες σιγκέλλωσης δεν παρατηρούνται συχνά. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί επιδημίες, όπου ο

υπεύθυνος παράγοντας ήταν μαρούλι-iceberg, μικρό καλαμπόκι(baby maize), τυρί μολυσμένο από χειριστή τροφίμων, και μολυσμένο πόσιμο νερό. Επίσης, επιδημίες έχουν αναφερθεί σε πληθυσμούς ομοφυλόφιλων ανδρών. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

1.1.4) Συμπτωματολογία

Η περίοδος επώασης της νόσου είναι 2 με 3 μέρες, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις φτάνει και τις 8 μέρες. Τα συμπτώματα ξεκινάνε αιφνίδια, με πρώτο από αυτά να είναι ο κολικός του εντέρου. Συνεχίζουν με διαρροϊκές κενώσεις που ένας ασθενής μπορεί να εμφανίσει είκοσι μέσα σε ένα εικοσιτετράωρο και συνοδεύονται με πυρετό, κεφαλαλγία, κακουχία, ανορεξία, ναυτία, τοξιναιμία, εμετούς, συσπάσεις κοιλιακού τοιχώματος και τεινεσμό του εντέρου. (Greenwood, και συν., 2016) (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) (Niyogi, 2005) Πολλά επεισόδια αυτοϊώνονται. Παρατηρείται επίσης συχνή αποβολή μικρών όγκων κοπράνων, αποτελούμενων με βλέννη και αίμα. (Greenwood, και συν., 2016) Οι σπασμοί αποτελούν σοβαρή επιπλοκή για παιδιά και η βακτηριαιμία είναι σπάνια καθώς τα βακτήρια *Shigella* δεν εισέρχονται συχνά στην κυκλοφορία του αίματος. (Tortora, και συν., 2017) (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Η δυσεντέρια χαρακτηρίζεται επίσης από απώλεια 200-300 ml πρωτεϊνών του ορού την ημέρα, που αυτό οδηγεί σε εξάντληση των αποθεμάτων αζώτου, και κατ'επέκταση σε υποσιτισμό και προβλήματα ανάπτυξης. (Niyogi, 2005)



Εικόνα 5: Συμπτώματα (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

Τα συμπτώματα διαρκούν συνήθως 4 ημέρες, αλλά συνεχίζονται για 14 και παραπάνω μέρες σε πιο σοβαρές λοιμώξεις. Μπορεί από τη νόσο να προσβληθεί το νευρικό σύστημα με αποτέλεσμα να παρουσιαστούν επιληπτικοί σπασμοί και εγκεφαλίτιδα. (Greenwood, et al., 2016) Η Σιγκέλλωση έχει συσχετιστεί και με το σύνδρομο Reiter (αντιδραστική

αρθρίτιδα), ειδικά σε άτομα με τον γενετικό δείκτη HLA-B27. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από πόνο στις αρθρώσεις, ερεθισμό των ματιών και επώδυνη ούρηση. (Warren, et al., 2007)

Η περίοδος μεταδοτικότητας του νοσήματος διαρκεί όσο και η οξεία φάση της λοίμωξης και μέχρι ο μικροοργανισμός να πάψει να ανιχνεύεται στα κόπρανα (συνήθως έως και 4 εβδομάδες μετά τη νόσηση). Ασυμπτωματικοί φορείς μπορεί να μεταδίδουν τη νόσο, ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις η κατάσταση φορέας μπορεί να επιμένει για αρκετούς μήνες. Συνήθως μειώνεται η διάρκεια της φορέας σε λίγες ημέρες με κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

Η σοβαρότητα της νόσου και η θνητότητα οφείλονται στο είδος του βακτηρίου, τα χαρακτηριστικά του ατόμου (ηλικία, προϋπάρχουσα διατροφική κατάσταση) και τον ορότυπο. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Η *S. dysenteriae* 1 συχνά συσχετίζεται με σοβαρή νόσηση και επιπλοκές όπως έντονη εξάντληση και πυρετικούς σπασμούς σε μικρά παιδιά (Greenwood, και συν., 2016) και το τοξικό megacolon και το αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο (Haemolytic Uraemic Syndrome-HUS) που προκαλεί επιδημίες σε πολλές χώρες. Η θνητότητα σε νοσηλευόμενους ασθενείς είναι υψηλή (20%). (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από αναιμία, θρομβοκυτταροπενία, οξεία νεφρική ανεπάρκεια, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη. Σε ορισμένα μέρη του κόσμου αποτελεί συχνό αίτιο νεφρικής ανεπάρκειας σε παιδιά. Πολλές λοιμώξεις από *S. sonnei* εμφανίζουν σύντομη κλινική διαδρομή (λίγες διαροϊκές κενώσεις, ήπια κοιλιακά άλγη κατά την διάρκεια των οποίων ο ασθενής συνεχίζει την καθημερινότητα του) και έχουν σχεδόν αμελητέα θνητότητα, με εξαίρεση στους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. (Greenwood, και συν., 2016).

Με απόφαση της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων για να έχει ένα άτομο αποδεδειγμένα λοίμωξη από *Shigella spp.*, θα πρέπει να παρουσιάζει τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα συμπτώματα: διάρροια, πυρετός, εμετός και κοιλιακό άλγος. Στις εργαστηριακές εξετάσεις θα πρέπει να απομονώνεται το βακτήριο *Shigella spp.* από το κλινικό δείγμα του ασθενούς. Με βάση τα επιδημιολογικά κριτήρια θα πρέπει να έχει τουλάχιστον

ένα από τα παρακάτω: μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, έκθεση σε κοινή πηγή, μετάδοση από ζώο σε άνθρωπο, έκθεση σε μολυσμένα τρόφιμα και πόσιμο νερό, περιβαλλοντική έκθεση. Επιπλέον τα κρούσματα κατατάσσονται α) δυνητικό κρούσμα (άνευ αντικειμένου), β) πιθανό κρούσμα (ικανοποιούνται κλινικά κριτήρια και υπάρχει επιδημιολογική σύνδεση), γ) επιβεβαιωμένο κρούσμα (ικανοποιούνται τα κλινικά και επιδημιολογικά κριτήρια). (Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 2008)

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΔΙΑΡΡΟΪΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ						
Παθογόνο	Περίοδος	Διάρκεια επίθεσης	Συμπτώματα			
			Διάρροια	Έμετος	Κοιλιακές κρίμπες	Πυρετός
<i>Salmonella</i>	6 ώρες-2 ημέρες	2-7 ημέρες	++	+	-	+
<i>Campylobacter</i>	2-11 ημέρες	3 ημέρες-3 εβδομάδες	+++	-	++	++
<i>Shigella</i>	1-4 ημέρες	2-3 ημέρες	++/+++	-	+	+
<i>Vibrio cholerae</i>	2-3 ημέρες	Μέχρι 7 ημέρες	++++	+	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8 ώρες-2 ημέρες	3 ημέρες	+/++	+	+	+
<i>Clostridium perfringens</i>	8 ώρες - 1 ημέρα	12 ώρες-1 ημέρα	++	-	++	-
<i>Bacillus cereus</i> : Διαρροϊκός Εμετικός	8-12 ώρες 15 λεπτά-4 ώρες	12 ώρες-1 ημέρα 12 ώρες-2 ημέρες	++ +	- ++	++ -	- -
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4-7 ημέρες	1-2 εβδομάδες	++	-	++	+

Εικόνα 6: Κλινικά χαρακτηριστικά της λοίμωξης από *Shigella*. Εικ. 20.12 (Mims, και συν., 2010)

1.1.5) Μέθοδοι Εργαστηριακής Διάγνωσης

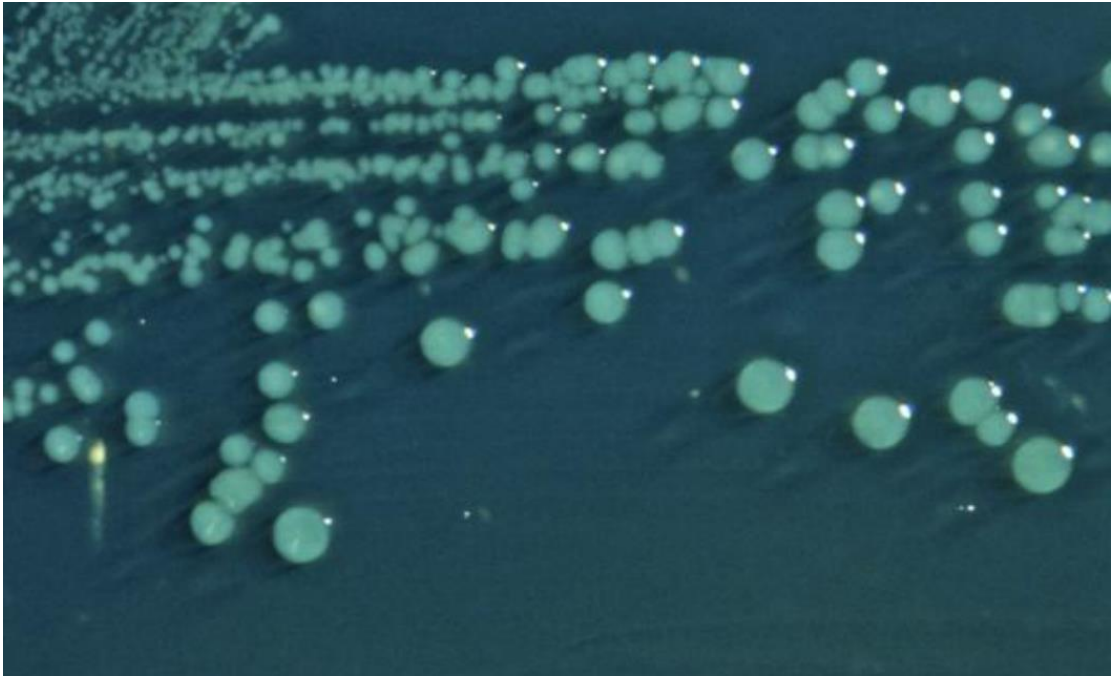
Σε περίπτωση συμπτωμάτων όπως διάρροια και αιματηρή διάρροια θα πρέπει να γίνει διαφορική διάγνωση, καθώς η θεραπεία εξαρτάται από το είδος του αιτιολογικού παράγοντα που προκαλεί την νόσο σε κάθε περίπτωση. Για να διαπιστωθεί το αν ο ασθενής έχει προσβληθεί από *Shigella spp.* γίνονται εργαστηριακές δοκιμασίες σε κλινικά εργαστήρια ιδιωτικά ή δημόσια, που απομονώνουν το βακτήριο από *Shigella spp.* δείγματα κοπράνων ή ορθικό επίχρισμα των προσβεβλημένων ατόμων. Στο ορθικό επίχρισμα δεν είναι εφικτή η επαρκής μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση. Λόγω της ξήρανσης του δείγματος τα μικρόβια καταστρέφονται γρήγορα και ενδέχεται να μην επιβιώσουν κατά τη μεταφορά στο εργαστήριο. (Greenwood, και συν., 2016) Τα κλινικά εργαστήρια μπορούν επίσης να πραγματοποιήσουν άλλων ειδών δοκιμασίες για τον προσδιορισμό του είδους *Shigella* από τον οποίο έχει νοσήσει ασθενής, καθώς και για τον

καθορισμό της κατάλληλης θεραπείας για την αντιμετώπισή του, με τη χρήση αντιβιογραμμάτων. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

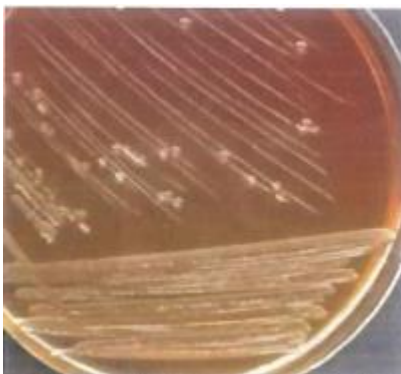
Για την απομόνωση του βακτηρίου *Shigella spp.*, χρησιμοποιούνται δύο θρεπτικά υποστρώματα: το MacConkey agar (MAC) και το xylose lysine desoxycholate (XLD) agar. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλλα δύο θρεπτικά υποστρώματα στη θέση του XLD, όπως τα desoxycholate citrate agar (DCA) Hektoen enteric (HE) agar, παρουσιάζοντας χαμηλή έως και μέση εκλεκτικότητα. (CDC, 1999) Το SS agar χρησιμοποιείται ως δεύτερη επιλογή για την απομόνωση της *Shigella*. (Smith, 1986).



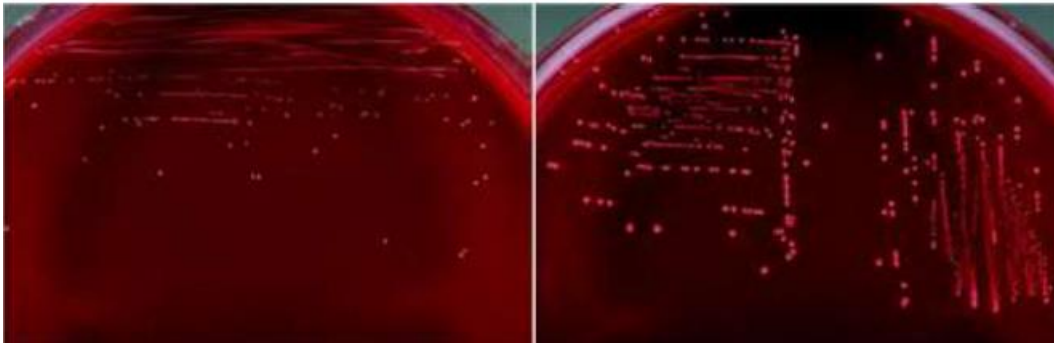
Εικόνα 7: Ανάπτυξη αποικιών *Sh. sonnei* σε θρεπτικό υλικό Mac Conkey agar. Χαρακτηριστικές λευκές αποικίες λόγω μη ζύμωσης λακτόζης. (λακτόζη αρνητικό βακτήριο) (Βιβλιοθήκη εικόνων Δημόσιας Υγείας CDC, 2014)



Εικόνα 8: *Shigella spp.* σε HE agar (Hektoen enteric agar) Η *Shigella spp.* που δεν ζυμώνει την λακτόζη δημιουργεί γαλαζοπράσινες αποικίες (Βιβλιοθήκη εικόνων Δημόσιας Υγείας CDC, 2014)



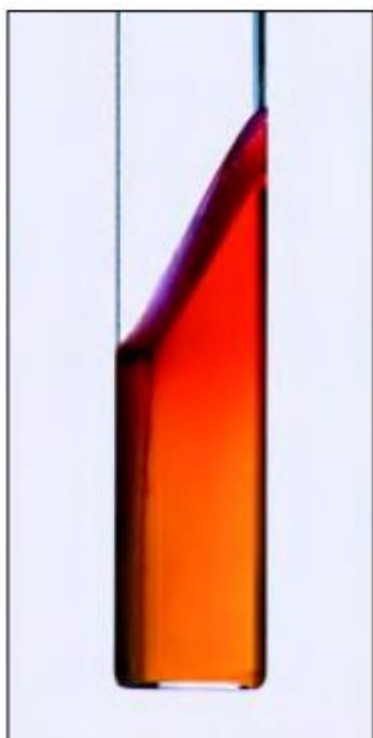
Εικόνα 9: SS agar, εμβολιασμένο. Φαίνονται άχρωμες αποικίες βακτηριδίων του γένους *Shigella spp.* (Σκεπαστιανός Π., 2012)



Εικόνα 10: (α) Αποικίες από *S. dysenteriae* σε XLD, (β) Αποικίες από *S. flexneri* σε XLD. (CDC, 1999)



Εικόνα 11: Αποικίες από *E. coli* εμφανίζονται με κίτρινο χρώμα, και αποικίες από *S. flexneri* με κόκκινο χρώμα. (CDC, 1999)



Εικόνα 12: Kligler Iron agar, Τυπική αντίδραση από *Shigella*. Στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα σχηματισμός κίτρινου χρώματος και στην κόκκινο χρώμα. (CDC, 1999) (Σκεπασσιανός Π., 2012)

Πίνακας 4: Βιοχημικές αντιδράσεις στο Kligler Iron Agar σε διάφορα εντεροβακτηριακά, Παρατηρείται στην *Shigella* κόκκινη κεκλιμένη επιφάνεια, κίτρινος πυθμένας, δεν παράγει αέρια και υδρόθειο. (Σκεπασσιανός Π., 2012)

Βακτηρίδιο	Κεκλιμένη επιφάνεια	Πυθμένας	Αέριο	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	+	±
<i>Edwardsiella</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	+	+
<i>E. coli</i>	Κίτρινο	Κίτρινο	+	-
<i>Enterobacter</i>	Κίτρινο*	Κίτρινο	+	-
<i>Morganella</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	±	-
<i>Proteus</i>	Κόκκινο ή κίτρινο	Κίτρινο	+	+
<i>Providencia</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	±	-
<i>Salmonella</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	+	+
<i>Shigella</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	-	-

Πίνακας 5: Βιοχημικές δοκιμασίες στο TSI Η *Shigella* δεν παράγει υδρόθειο, δεν παράγει αέριο, έχει κίτρινο πυθμένα και κόκκινη κεκλιμένη επιφάνεια.

Βακτηρίδιο	Κεκλιμένη επιφάνεια	Πυθμένας	Αέριο	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	+	±
<i>Edwardsiella</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	+	+
<i>E. coli</i>	Κίτρινο	Κίτρινο	+	-
<i>Enterobacter</i>	Κίτρινο*	Κίτρινο	+	-
<i>Morganella</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	±	-
<i>Proteus</i>	Κόκκινο ή κίτρινο	Κίτρινο	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Κόκκινο	Κόκκινο	-	-
<i>Salmonella</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	+	+
<i>Shigella</i>	Κόκκινο	Κίτρινο	-	-

Άλλες βιοχημικές δοκιμασίες που μπορούμε να κάνουμε για να διαφοροποιήσουμε τη *Shigella* από άλλα εντεροβακτηριακά, είναι δοκιμασία ουρεάσης, δοκιμασία οξειδάσης, ινδόλη, δοκιμασία κινητικότητας, δοκιμασία ορνιθίνης, δοκιμή κιτρικών και δοκιμασία λυσίνης. ((WHO), 2015) Τα είδη της *Shigella* δίνουν αρνητική την αντίδραση ουρεάσης, με το υλικό να παραμένει κίτρινο (σε θετική αντίδραση, το χρώμα αλλάζει σε ροζ) και την αντίδραση οξειδάσης, επίσης αρνητική. (Public Health, 2013). Η δοκιμασία ινδόλης είναι αρνητική για τα περισσότερα είδη. Η δοκιμασία κινητικότητας είναι αρνητική ((WHO), 2015) , αφού τα βακτήρια του γένους *Shigella* δεν έχουν κινητικότητα. (Greenwood, και συν., 2016). Η *S. sonnei* δίνει θετική την αντίδραση ορνιθίνης που βοηθά στην διαφοροποίησή της από τα άλλα είδη που δίνουν αρνητική την αντίδραση. Η δοκιμασία κιτρικών είναι αρνητική με το υλικό να παραμένει πράσινο, (σε θετική αντίδραση γίνεται μπλε) και η δοκιμασία λυσίνης επίσης αρνητική.



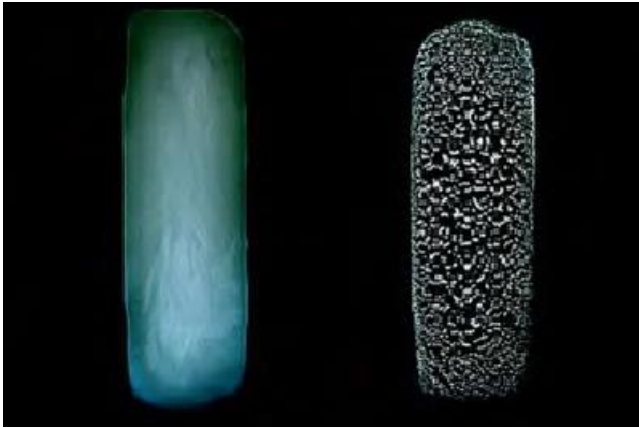
Εικόνα 13: Βιοχημικές δοκιμασίες σε *S. sonnei*, (1) TSI agar μη ζύμωση λακτόζης, ζύμωση γλυκόζης, μη παραγωγή αερίου και υδρόθειου, (2) Δοκιμασία ουρεάσης- αρνητική, (3) Δοκιμασία λυσίνης αρνητική, (4) δοκιμασία κιτρικών- αρνητική, (5) δοκιμασία κινητικότητας- αρνητική και δοκιμασία ορνιθίνης-θετική αντίδραση, (6) δοκιμασία ινδόλης- αρνητική. ((WHO), 2015)



Εικόνα 13: Βιοχημικές δοκιμασίες *S. flexneri* (επίσης παρουσιάζονται και σε πολλούς ορότυπους των *S. dysenteriae* και *S. boydii*, (1) TSI agar μη ζύμωση λακτόζης, ζύμωση γλυκόζης, μη παραγωγή αερίου και υδρόθειου, (2) Δοκιμασία ουρεάσης- αρνητική, (3) Δοκιμασία λυσίνης αρνητική, (4) δοκιμασία κιτρικών- αρνητική, (5)

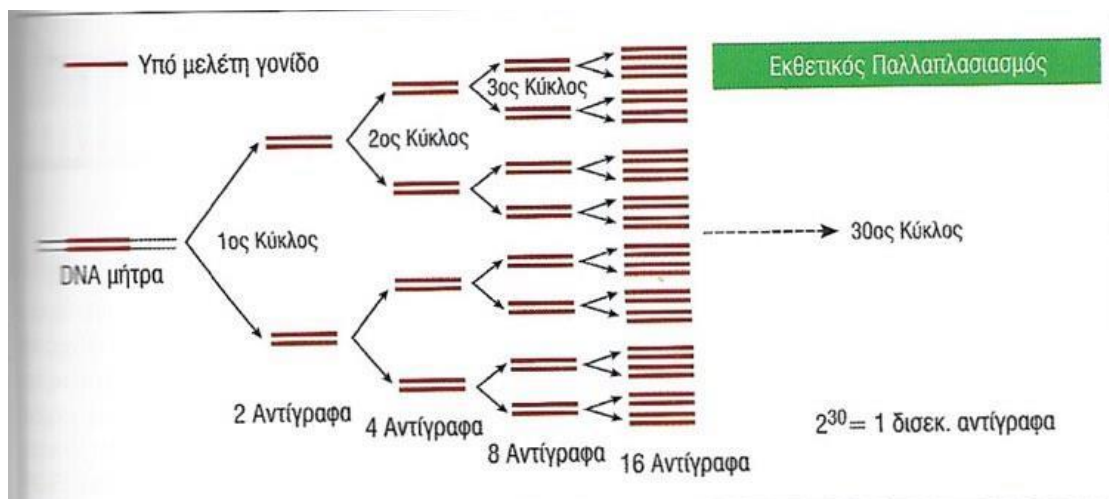
δοκιμασία κινητικότητας και δοκιμασία ορνιθίνης- αρνητικές αντιδράσεις, (6) δοκιμασία ινδόλης- αρνητική. ((WHO), 2015)

Μετά την ολοκλήρωση των βιοχημικών δοκιμασιών, ακολουθούν οι ορολογικές δοκιμασίες, έτσι ώστε να εξακριβωθεί ο ορότυπος του κάθε στελέχους. Όπως έχουμε αναφέρει και παραπάνω, η *S. dysenteriae* έχει 15 ορότυπους, η *S. flexneri* έχει 19 ορότυπους (1a, 1b, 1d, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4av, 4b, 5a, 5b, 6, X, Y, Xv, Yv, 7a, 7b), (D.P. Muthuirulandi Sethuvel, 2016), η *S. sonnei* έχει έναν ορότυπο και η *S. boydii* έχει 23 ορότυπους. (Aslam A., 2020) Η *S. sonnei* έχει και πέντε βιότυπους (a, b, e, f, g). Οι πιο διαδεδομένοι ορότυποι είναι της *S. flexneri*, με τους πιο διαδεδομένους ορότυπους στην Ασία να είναι οι 1a, 2a, 3a. (D.P. Muthuirulandi Sethuvel, 2016) Η ορολογική τυποποίηση πραγματοποιείται με αντιορούς. (CDC, 1999) Φτιάχνονται, έπειτα από ανοσοποίηση κουνελιών στο εργαστήριο. (diagnostica) Η δοκιμασία γίνεται με τοποθέτηση μιας αποικίας του βακτηρίου σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθέτηση μιας σταγόνας αντιορού. (CDC, 1999) Το αποτέλεσμα φαίνεται 5-10 δευτερόλεπτα μετά. Αν παρατηρηθεί κροκκίδωση-συγκόλληση, η αντίδραση είναι θετική για αυτόν τον ορότυπο. (diagnostica) Στην αρχή γίνεται χρήση πολυσθενούς αντιορού με σωματικό O αντιγόνο (polyvalent somatic (O) Ag) και συνεχίζουμε με θετικό αποτέλεσμα, σε μονοσθενείς αντιορούς (monovalent). (CDC, 1999) Η *S. sonnei* αποτελείται από δύο φάσεις. Μπορούν να διαφοροποιηθούν μορφολογικά από τις αποικίες. Η φάση I έχει λείες αποικίες και η φάση II εμφανίζεται με την μορφή τραχιών αποικιών. Υπάρχουν και δύο αντιοροί, ένας για κάθε φάση. (diagnostica). Το δείγμα αποικιών το παίρνουμε από TSI agar ή Kligler iron agar. Σε περίπτωση χρήσης αποικίας από άλλο θρεπτικό υπόστρωμα, υπάρχει πιθανότητα ψευδώς λάθους αποτελέσματος. (CDC, 1999)



Εικόνα 14: (Αριστερά) Αρνητικό αποτέλεσμα, μη συγκόλληση αντιορού και δείγματος, (Δεξιά) Θετική αντίδραση, Συγκόλληση αντιορού και δείγματος *Shigella*. (Τσιρώνη, 2015)

Η τυποποίηση του βακτηρίου μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω της τεχνικής PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, polymerase chain reaction), με ανίχνευση αλληλουχιών DNA του βακτηρίου. (Τσιρώνη, 2015) Η PCR είναι μια *in vitro* τεχνική, που επιτρέπει την ενίσχυση ενός τμήματος DNA. Μέσα σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, παράγεται ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων της αλληλουχίας που θέλουμε να εξετάσουμε. Το επιθυμητό DNA προς μελέτη, ενισχύεται με γεωμετρική πρόοδο σε κάθε κύκλο. Τα αντίγραφα του DNA φτάνουν τα 10^{13} . (Μαυρίδου Θ.Μ., 2012)



Εικόνα 15: Αριθμός κύκλων και αντίγραφα DNA. (Μαυρίδου Θ.Μ., 2012)

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ενζυμική αντίδραση πολλαπλασιασμού ενός μονόκλωνου τμήματος DNA, που οριοθετείται από δύο εκκινητές. Με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση, αρχίζει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA με τους εκκινητές. Σημαντικός παράγοντας είναι, η μετατροπή του δίκλωνου DNA, σε μονόκλωνο, αφού η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί σαν μήτρα (καλούπι), μόνο μονόκλωνο τμήμα γενετικού υλικού. Επιπλέον θέλει μεγάλη προσοχή, η επιλογή κατάλληλων εκκινητών, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την μέθοδο μας. (Μαυρίδου Θ.Μ., 2012) Όπως θα αναφερθούμε λεπτομερώς παρακάτω, για την ανίχνευση του CTX-M μηχανισμού του βακτηρίου, οι εκκινητές που χρησιμοποιούμε είναι τα group 1, 2, 8, 9 και 25. (Rao, 2012) Οι εκκινητές επιλέγονται με κριτήριο (α) το μήκος τους, (β) το σημείο τήξης, (γ) την ειδικότητα τους, (δ) να μην είναι συμπληρωματικές οι αλληλουχίες των εκκινητών, για να αποφύγουμε την σχηματισμό θηλιάς, (ε) την περιεκτικότητα σε G-C, και την αλληλουχία του 3-άκρου. Η αντίδραση περιλαμβάνει τρία στάδια: (α) Εκθετική φάση, όπου γίνεται διπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος και συσσώρευση του, (β) γραμμική φάση, τα αντιδραστήρια ελαττώνονται και η αντίδραση επιβραδύνεται, (γ) φάση πλάτος, τέλος της αντίδρασης, δεν παράγονται πλέον άλλα αντίγραφα. (Μαυρίδου Θ.Μ., 2012). Η διαδικασία ενός κύκλου περιλαμβάνει την αποδιάταξη των αλυσιδών DNA, τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση του γενετικού υλικού. (Τσιρώνη, 2015) Για τον πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού χρησιμοποιούνται οι θερμικοί κυκλοποιητές. Παρακάτω θα γίνει ανάλυση της διαδικασίας της τεχνικής PCR σε δείγματα *Shigella spp.*

Άλλη μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την **τυποποίηση** των στελεχών είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE, pulsed field gel electrophoresis). Η τεχνική χρησιμοποιείται για την παραγωγή μοναδικών αποτυπωμάτων γενετικού υλικού του βακτηρίου με πέψη του γενετικού υλικού με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η PFGE διαφέρει από την συμβατική ηλεκτροφόρηση, επειδή δίνει την δυνατότητα να διαχωρίζει μεγάλα θραύσματα γενετικού υλικού, δημιουργώντας ένα μοναδικό μοριακό αποτύπωμα αλλάζοντας συνεχώς την κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου. (CDC)

Σημαντική δοκιμασία για να μπορέσει ο κλινικός ιατρός να χορηγήσει κατάλληλη θεραπεία αποτελεί το αντιβιογράμμα, καθώς η *Shigella* δεν είναι ευαίσθητη πλέον σε αρκετά αντιβιοτικά, όπως αναλύεται και στις παρακάτω δύο ενότητες. Σκοπός του αντιβιογράμματος είναι η ταυτοποίηση και η μελέτη της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά του στελέχους που μελετάτε, για να οδηγήσει στην επιλογή κατάλληλης θεραπείας. Χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό κατάλληλο για αντιβιογράμματα, το Mueller-Hinton. (Μαυρίδου Θ.Μ., 2012) Επιπλέον πριν την χρήση του Mueller-Hinton ως βασικό υλικό για το αντιβιογράμμα, χρησιμοποιείται και το Nutrient agar για καλλιέργεια μιας απομονωμένης καθαρής αποικίας, που μετά από επώαση θα χρησιμοποιηθεί ως υλικό για το αντιβιογράμμα.. (Σκεπαστιανός Π., 2012). Το αντιβιογράμμα χρησιμοποιείται και ως μέθοδος **τυποποίησης** για την επιτήρηση των παθογόνων μικροβίων ως προς την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών.

1.1.6) Θεραπεία

Η σιγκέλλωση αποτελεί σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας υγείας, με 700.000 θανάτους ετησίως παγκόσμια. Τα πρώτα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σουλφοναμίδες, και στη συνέχεια τετρακυκλίνη και χλωραμφενικόλη. Το βακτήριο ανέπτυξε αντοχή σε αυτά τα αντιβιοτικά και η θεραπεία στράφηκε σε άλλα σχήματα στη συνέχεια. (Minakshi, και συν., 2018) Αρχικά πρέπει να γίνεται εκτίμηση και της κλινικής εικόνας, για να δωθεί πλέον το κατάλληλο αντιβιοτικό. Σε περίπτωση που ένα άτομο έχει διαρροϊκές κενώσεις, ακόμα και αιματηρές, σοβαρές κράμπες στο στομάχι, ευαισθησία, πυρετό, κακουχία, θα πρέπει να γίνει άμεση ενημέρωση του θεράποντος ιατρού. Επίσης θα πρέπει να γίνει επισήμανση αν το άτομο έχει χαμηλό ανοσοποιητικό, για παράδειγμα από χημειοθεραπείες ή από νόσο, όπως HIV, λόγω πιθανότητας περισσότερων επιπλοκών. Η χορήγηση υγρών και ηλεκτρολυτών αποτελούν σημαντικό βήμα για την αποφυγή αφυδάτωσης του οργανισμού. Όταν ένα άτομο πάσχει από αιματηρή διάρροια, καλό θα ήταν να αποφεύγονται τα αντιδιαρροϊκά φάρμακα, για παράδειγμα λοπεραμίδη ή διφαινοξυλικό με ατροπίνη. Σε αυτά τα άτομα,σε συνδιασμό με αυτά τα φάρμακα, μπορούν να επιδεινωθούν τα συμπτώματα. (CDC) Επιπλέον σε παιδιά με ύποπτα έντονα συμπτώματα, όπως αιματηρή διάρροια, βακτηριαιμία, λήθαργο, θερμοκρασία άνω των 39 °C (102,2 °F), ανοσολογική

ανεπάρκεια είναι σημαντικά τα παρεντερικά φάρμακα. (Aslam, και συν., 2019) Τα αντιβιοτικά βοηθάνε στην μείωση της διάρκειας της νόσου κατά δύο μέρες. Μερικά αντιβιοτικά κατάλληλα για την νόσο, είναι η σιπροφλοξασίνη και η αζιθρομυκίνη. Υπάρχουν και περιπτώσεις που δεν χρειάζεται η χορήγηση κάποιου αντιβιοτικού. (CDC) Σχετικά οικονομικά αντιβιοτικά και αποτελεσματικά για την σιγκέλλωση, αποτελούν οι κινολόνες (ναλιδιξικό οξύ), αν και σε αυτήν την κατηγορία αντιβιοτικών είναι εμφανής η αντοχή στα αντιβιοτικά, σε περιοχές που υπάρχει αρκετή χρήση αυτής της ομάδας αντιβιοτικών. (Τσιρώνη, 2015)

Τα αντιβιοτικά που χορηγούνται σε ασθενείς μπορούν να χωριστούν σε δύο σχήματα ανάλογα με την ηλικία. Σε ενήλικες χορηγούνται φθοροκινολόνη, και κεφαλοσπορίνες δεύτερης γενιάς και αμπικιλίνη, αφού τεκμηριωθεί η ευαισθησία τους. Στα παιδιά, το φάρμακο που χρησιμοποιείται είναι η αζιθρομυκίνη, μέχρι να ολοκληρωθεί το αντιβιογράμμα, για να ξεκαθαριστεί ποιο είναι το κατάλληλο αντιβιοτικό για θεραπεία. Σε μια δοκιμή που πραγματοποιήθηκε, παρατήρησαν ότι η αζιθρομυκίνη ήταν αποτελεσματική κατά 94%. Στην Νότια Ασία τα αντιβιοτικά Cefixine και Centribufen αποτελούν πρώτη γραμμή θεραπείας. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται και ένα είδος πενικιλίνης, το ρινmecillinam, που είναι αποτελεσματικό, για την μείωση της διάρκειας της διάρροιας και την εξάλειψη των βακτηρίων. (Aslam, και συν., 2019) Σημαντικό είναι να γίνει δικομασία αντιβιογράμματος για να γίνει σωστή αποτίμηση του κατάλληλου αντιβιοτικού για θεραπεία.

1.1.7) Αντοχή στα αντιβιοτικά

Η ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριών στα αντιβιοτικά, έχει ανακηρυχθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ως μείζον πρόβλημα. Πλέον πολλά σχήματα αντιβιοτικών έχουν μεγάλα ποσοστά αποτυχίας λόγω των γονιδίων αντοχής που διαθέτει ένα βακτήριο. Στους μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά συγκαταλέγεται, 1) η ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα σε αντιβιοτικά λόγω της μειωμένης έκφρασης πορινών, με αποτέλεσμα το αντιβιοτικό να αδυνατεί να εισέλθει στο εσωτερικό του βακτηρίου και να συναντήσει το στόχο του 2.) υπερβολική έκφραση αντλιών εκροής οδηγώντας στην γρήγορη αποβολή του αντιβιοτικού εκτός του κυττάρου 3.) Τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού λόγω κάποιας μετάλλαξης και 4.) Ύπαρξη

γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που υδρολύουν τα αντιβιοτικά, (Minakshi, και συν., 2018) (Ερμηνεία αντιβιογράμματος, φαινοτυπικές δοκιμασίες και μηχανισμοί αντοχής). Τα καλλιεργήματα που απομονώνονται σε λοιμώξεις από *Shigella spp.* εμφανίζουν αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά. Υπολογίζεται ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ότι πάνω από 77.000 λοιμώξεις από *Shigella*, εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Αποτελεί σοβαρή απειλή, λόγω της ανάπτυξης αντοχής σε πολλαπλά φάρμακα, όπως τις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και σε τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη, σιπροφλοξασίνη, αζιθρομυκίνη. Από το 2017, το Εθνικό Σύστημα Παρακολούθησης της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά (NARMS) παρατήρησε αύξηση στην αντοχή σε σιπροφλοξασίνη και αζιθρομυκίνη, σε όλο και περισσότερες απομονώσεις του βακτηρίου *Shigella*. (CDC) Η *Shigella*, ενώ ήταν ευαίσθητη σε αμπικιλίνη, χλωραμφενικόλη, κοτριμοξαζόλη, ναλιδιξικό οξύ, πλέον ανιχνεύονται πολλά στελέχη που εμφανίζουν αντοχή σε κεφαλοσπορίνες, αζιθρομυκίνη και φθοροκινολόνες. Σε περίπτωση αντοχής σε φθοροκινολόνες, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συστήνει κεφτριαξόνη, pivmecillinam και αζιθρομυκίνη. (Minakshi, et al., 2018)

Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την αντοχή στα αντιβιοτικά σε ασθενείς με σιγκέλλωση. Στο Ιράν μελετήθηκαν 719 δείγματα διαρροικών κοπράνων, με τα οποία ανακάλυψαν αντοχή στην κο-τριμοξαζόλη στο 90,24% των περιπτώσεων με απομόνωση του βακτηρίου *Shigella*. Μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Αιθιοπία, παρατήρησαν αντοχή στα τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη, κοτριμοξαζόλη. Αυτή η περίπτωση οδήγησε σε συστάσεις, να γίνει χρήση των γενταμυκίνη και σιπροφλοξασίνη, μόνο για σοβαρές περιπτώσεις. Πραγματοποιήθηκε επίσης μια μελέτη στην Κορέα (1991-2002), όπου παρατηρήθηκε 20 από τα 5.911 απομονωμένα στελέχη *Shigella*, ήταν θετικά στην β-λακταμάση εκτεταμένου φάσματος (ESBL). Η παραγωγή β-λακταμασών αποτελεί από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς αντοχής των Gram (-) βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονομπακτάμες, καρβαπενέμες). (Ερμηνεία αντιβιογράμματος, φαινοτυπικές δοκιμασίες και μηχανισμοί αντοχής) Διαδεδομένες β-λακταμάσες που υπάρχουν σε gram (-) βακτήρια είναι οι CTX-M, TEM-, OXA-, SHV-. Στη *Sh. flexneri* με το γονίδιο bla_{-oxa}, υπάρχει

αντίσταση στην αμπικιλίνη, ενώ στην *Sh. sonnei* αυτό συμβαίνει με το γονίδιο

bla-TEM. Με τα γονίδια *A1*, *str A*, *tet B* έχει παρατηρηθεί αντοχή σε τετρακυκλίνη, χλωραμφενικόλη, στρεπτομυκίνη. Επιπλέον αντοχή σε σουλφοναμίδη σχετίζεται με γονίδια όπως *Sul I*, *Sul II*, *Sul III*, ενώ με τα γονίδια *dhfr Ia* ή *dhfr IIIc* υπάρχει αντοχή σε τριμεθοπρίμη. Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε την περίοδο 2001-2009, ανέφερε ότι η αντοχή σε κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς με παρουσία ESBL και *AmpC* λακταμασών ήταν πολύ αυξημένη. (Minakshi, et al., 2018)

1.1.8) β-λακταμάσες

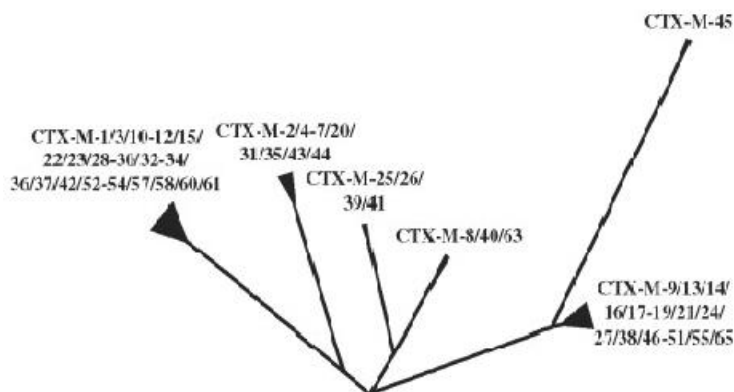
Οι β-λακταμάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, καθιστώντας το βακτήριο ανθεκτικό σε αυτά τα φάρμακα. Η ανάπτυξη αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά οφείλεται α) στην παραγωγή β-λακταμασών, ενζύμων που υδρολύουν τα αντιβιοτικά, β) αλλαγή του στόχου δράσης του αντιβιοτικού λόγω κάποιας μετάλλαξης, γ) ελαττωμένη πρόσληψη αντιβιοτικού, λόγω απώλειας ή αλλαγής των πορινών και δ) απέκκριση του αντιβιοτικού από το βακτηριακό κύτταρο. Η πρώτη β-λακταμάση *TEM-1*, βρέθηκε στις αρχές τις δεκαετίες του 60, σε στέλεχος *E. coli*, που απομονώθηκε από Έλληνα ασθενή με όνομα Τεμονιέρα, όπου πήρε και το όνομα του. Άλλη μια γνωστή β-λακταμάση είναι η *SHV-1*, η οποία εδράζεται στο βασικό χρωμόσωμα της *K. pneumoniae* ενώ στο *E. coli* εντοπίζεται κυρίως σε πλασμίδια. Η *TEM-2* έχει παρόμοιες ιδιότητες με την *TEM-1*, αλλά είναι λιγότερο συχνή. (Ερμηνεία αντιβιογράμματος, φαινοτυπικές δοκιμασίες και μηχανισμοί αντοχής)

Η ευρεία χρήση των αντιβακτηριακών φαρμάκων οδήγησε στην δημιουργία βακτηρίων με εκταταμμένο φάσμα β-λακταμασών (ESBL). Τα ESBLs προέρχονται από την ομάδα 2b (*TEM-1*, *SHV-1*, *TEM-2*), έπειτα από μετάλλαξη στους γόνους, με διαφορά κάποιων αμινοξέων. (Ερμηνεία αντιβιογράμματος, φαινοτυπικές δοκιμασίες και μηχανισμοί αντοχής) Αυτή η αντοχή δημιουργείται από μετάλλαξη του γονιδίου *bla-*. Υπάρχουν 186 τύποι *TEM*, 146 τύποι *SHV* και ένας τύπος *OXA*, που δεν δημιουργούν όλοι φαινότυπο ESBL. (Rao, 2012) Τα ESBLs έχουν την ικανότητα να υδρολύουν κάποια είδη φαρμάκων όπως, κεφαλοσπορίνες τρίτης και τέταρτης γενιάς,

πενικιλίνες, οξυϊμινο-θειαζολύλ, αστρεονάμες και μονοβακτάμες. (Rao, 2012) (Ερμηνεία αντιβιογράμματος, φαινοτυπικές δοκιμασίες και μηχανισμοί αντοχής) Δεν υδρολύουν καρβαπεμένες και κεφαμυκίνες. Τα ESBLs μπορούν να ανασταθούν από κάποιους αναστολείς όπως κλαβουλανικό οξύ, ταζομπακτάμη και σουλβακτάμη. Η πρώτη ESBL ανιχνεύθηκε σε στέλεχος *Klebsiella ozaenae* το 1983 στην Γερμανία. Εφαρμόζοντας την τεχνική sequencing και με ανάλυση του γονιδιώματος ανακάλυψαν μετάλλαξη της SHV-1 β-λακταμάσης και διαφορά μόνο σε ένα αμινοξύ (αντικατάσταση γλυκίνης από σερετονίνη).

Ένας τύπος β-λακταμασών, από τους πιο συχνούς παγκόσμιο αποτελεί οι CTX-M β-λακταμάσες εκταταμένου φάσματος ESBLs. (Ερμηνεία αντιβιογράμματος, φαινοτυπικές δοκιμασίες και μηχανισμοί αντοχής) Στην κατηγορία A των ESBLs ανήκουν τα CTX-M, TEM, SHV, VEB, GES, με τα CTX-M να έχουν τις πιο πολλές μεταλλαγές. Οι β-λακταμάσες κατατάσσονται κυρίως με το σύστημα Ambler (1980) σε μοριακές τάξεις από A έως D, και με διάκριση να γίνεται βάση το προφίλ του υδρολυτικού υποστρώματος και την απόκριση σε αναστολείς χρησιμοποιώντας το σύστημα Bush. (Canton, et al., 2012) Η CTX-M ανήκει στην A μοριακή τάξη (σύστημα Ambler) και στο γκρουπ 2be του συστήματος Bush. (Rao, 2012)

Το πρώτο CTX-M, περιγράφηκε σε εντεροβακτηριακά, στην Ευρώπη στα τέλη της δεκατίας του 80'. (The spread of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases, 2008) Η ανακάλυψη προέκυψε από δείγμα σε αυτό ενός παιδιού 4 ετών στο Μόναχο της Γερμανίας. Το όνομα CTX-M-1 δώθηκε γιατί ήταν ανθεκτικό στην κεφοταξιμάση (CTX), το -M- γιατί η απομόνωση έγινε στο Μόναχο, και το 1 δηλώνει την πρώτη CTX-M που απομονώθηκε. Το 1989, παρατηρήθηκε πάλι αντίσταση στις κεφοταξιμάσες σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα στην Αργεντινή, Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε, η αλληλουχία αμινοξέων αυτού του CTX-M είχε 84% ομολογία με την CTX-M-1, με αποτέλεσμα να αποτελεί την CTX-M-2. (Rao, 2012)



Εικόνα 16: Οι υποομάδες των CTX-M απεικονίζονται σε ένα δενδρόγραμμα ανάλογο με την ομολογία της αλληλουχίας των αμινοξέων. Στο τέλος των γραμμών, τα τρίγωνα δηλώνουν τις μικρόπαραλλαγές στο είδη μεταξύ τους. (The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases, 2008)

Το 1993, απομονώθηκε η CTX-M-44, γνωστή και ως Toho-1. Το 1995, ακολούθησε η CTX-M-45 ή αλλιώς Toho-2. Και οι δύο CTX-M ανακαλύφθηκαν σε δείγματα από *E. coli*. Ακολούθησαν οι CTX-M-3 (Βαρσοβία, Γαλλία, 1996), CTX-M-4 (Ρωσία, 1996), CTX-M-9 (Βραζιλία, 1996), CTX-M-10 (Ισπανία, 1997), CTX-M-14 (Κορέα, 1995), CTX-M-15 (Ινδία, 1999). (Rao, 2012). Οι CTX-M χωρίζονται σε 6 ομάδες, οι οποίες είναι: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25, CTX-M-45 ή Toho-2. (Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital In Northern Italy, 2003) Τα μέλη σε μια ομάδα έχουν $\leq 90\%$ συσχέτιση μεταξύ άλλων ομάδων και $>94\%$ ομολογία στην αλληλουχία αμινοξέων. Τα μέλη της κάθε ομάδας εμφανίζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα. (Rao, 2012)

Πίνακας 6: Μέλη ομάδων CTX-M (Rao, 2012), (Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β-Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital In Northern Italy, 2003)

Ομάδες CTX-M	Μέλη
CTX-M-1	CTX-M-1, -3, -10, -12, -15, -22, -23
CTX-M-2	CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, -76, -77
CTX-M-8	CTX-M-8, -40, -63
CTX-M-9	CTX-M-9, -14, -15, -16, -17, -18, -19
CTX-M-25	CTX-M-25, -26, -39, -41, -91
CTX-M-45 (Toho-2)	

Οι αναστολείς κλαβουλανικό οξύ, ταζομπακτάμη και σουλβακτάμη αναστέλλουν τις CTX-M β-λακταμάσες των βακτηρίων, όμως υπάρχουν και πολλά στελέχη βακτηρίων, που παράγουν ταυτόχρονα OXA-1 πενικιλινάσες και καθιστούν τα βακτήρια ανθεκτικά στους αναστολείς των β-λακταμασών. Ο αναστολέας ταζομπακτάμη είναι 10 φορές πιο ανασταλτικός από το κλαβουλανικό οξύ, έναντι CTX-M τύπου ESBLs.

Άλλος ένας μηχανισμός αντοχής στις β-λακταμάσες είναι ο AmpC. Οι AmpC β-λακταμάσες ανήκουν στην μοριακή κλάση C και στη λειτουργική ομάδα 1. Μεταλλάξεις που γίνονται στην χρωμοσωμική AmpC β-λακταμάση οδηγούν σε υπερπαραγωγή της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αντοχή σε μονοβακτάμες και οχγίμινο και 7-α-μέθυλο-κεφαλοσπορίνες. Η πιο κοινή μετάλλαξη είναι του AmpD γόνου. Σε AmpC μηχανισμούς υπάρχει ευρύτερο φάσμα αντοχής από τα ESBLs. Υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυσίνες (κεφοξιπίν και κεφοτετάν) και μονομπακτάμες (αστρεονάμη). Δεν αναστέλλονται από κλαβουλανικό, ταζομπακτάμη και σουλβακτάμη όπως ο

CTX-M μηχανισμός. Επιπλέον δεν υδρολύουν κεφεπίμη και καρβαπενέμες. (Ερμηνεία αντιβιογράμματος, φαινοτυπικές δοκιμασίες και μηχανισμοί αντοχής)

1.1.9) Εμβόλιο για την πρόληψη Σιγκέλλωσης

Με την θεραπεία της Σιγκέλλωσης να βρίσκεται σε κρίσιμη κατάσταση, ερευνητές κάνουν μελέτες, για να παραχθεί ένα αποτελεσματικό εμβόλιο έναντι της λοίμωξης. (Τσιρώνη, 2015) Το 2000, η Επιτροπή Ινστιτούτου Ιατρικής στις ΗΠΑ, υπέθεσε ότι θα χρειαστούν 7 χρόνια τουλάχιστον για να εγκριθεί ένα εμβόλιο και θα πρέπει να επενδυθούν πάνω από 240 εκατομμύρια δολάρια. (Vaccines for the 21st Century: A tool for Decisionmaking, 2000) Στο 6^ο Συμπόσιο Εμβολίων για Εντερικές ασθένειες που πραγματοποιήθηκε στην Γαλλία, τον Σεπτέμβριο του 2011, αναφέρθηκε ότι η *Shigella spp.* βρίσκεται στη λίστα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, με τα παθογόνα που τίθενται σε προτεραιότητα για την ανάπτυξη ενός εμβολίου. Για την ώρα, δεν υπάρχει κάποιο αδειοδοτημένο εμβόλιο για την Σιγκέλλωση, αν και υπάρχουν πολλοί δωρητές σε Αμερική και Ευρώπη, που στηρίζουν την έρευνα για ανακάλυψη ενός αποτελεσματικού σκευάσματος. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ένα εμβόλιο (WRRS1) με εξασθενημένη *Sh. sonnei* που πραγματοποιήθηκε στην Ταϊλάνδη, ότι ήταν 50% αποτελεσματικό σε ενήλικες που είχαν προσβληθεί με αυτό το στέλεχος. Επίσης καλή πρόοδο έχει και το ανδρανοποιημένο σκεύασμα που μελετούν. (Steele, et al., 2014)

Προτεραιότητα για παρασκευή εμβολίου έχουν δώσει για τα είδη *Sh. flexneri* και *Sh. dysenteriae*. (Shigellosis, 2005) Για να θεωρηθεί κατάλληλο το εμβόλιο πρέπει να τηρεί κάποιες προϋποθέσεις, όπως να ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου του εντέρου, η ανοσία να είναι μακροχρόνια, το εμβόλιο να είναι οικονομικό στην παραγωγή, να προκαλούνται ελάχιστες ελαφριές παρενέργειες και να είναι απλό στην χορήγηση. Από το 1940 έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμα εμβόλια, αλλά μέχρι στιγμής κανένα δεν έχει φτάσει στην αγορά. Το πρώτο εμβόλιο που δοκιμάστηκε ήταν με αδρανοποιημένο βακτήριο, που χρηγήθηκαν παρεντερικά, όμως απέτυχαν να προστατέψουν τον οργανισμό. Πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη δημιουργία εμβολίων με ζωντανούς εξασθενημένους οργανισμούς, με χορήγηση δόσης δια του

στόματος. (Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development, 2004)

Πίνακας 7: Εμβόλια δια στόματος για Sh. flexneri που βρίσκονται υπό μελέτη. (Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development, 2004)

Εμβόλιο	Αποτελεσματικότητα	Σχόλια
Sh. flexneri 5a SC5700	70% προστασία σε πιθήκους μετά από 3 δόσεις	Ελαφριές παρενέργειες σε πιθήκους
Sh. flexneri 5a SC560	100% προστατευτικό σε πιθήκους μετά από 3 δόσεις	Ελαφριές παρενέργειες σε πιθήκους
Sh. flexneri 5a SC433	100% προστατευτικό σε πιθήκους μετά από 3 δόσεις	Ελαφριές παρενέργειες σε πιθήκους
Sh. flexneri 5a SC445	1/5 πιθήκους αρρώστησε	Το επίπεδο εξασθένησης πολύ χαμηλό, για συνεχή προστασία
Sh. flexneri Y TSF-21	100% προστατευτικό σε πιθήκους μετά από 2 δόσεις	Δεν υπήρχαν συμπτώματα σε πιθήκους
Sh. flexneri 2a vc77	Αμφισβητήθηκε η δυσεντέρια σε 2/4 ενήλικες	Δεν υπάρχουν συμπτώματα σε ενήλικες και παιδιά έως

Sh. flexneri Y SFL114	100% προστατευτικό πιθήκους μετά από 4 δόσεις	σε	3*10 ¹⁰ CFU
Sh. flexneri Y SFL124	100% προστατευτικό πιθήκους μετά από 3 δόσεις	σε	Δεν υπήρχαν συμπτώματα σε πιθήκους Ήπια συμπτώματα σε ορισμένους ανθρώπους εθελοντές σε 2*10 ¹⁰ CFU σε
Sh. flexneri 2a SFL1070	85% προστασία μετά από 4 δόσεις	σε	πιθήκους ενήλικες και 1*10 ¹⁰ CFU σε παιδια Ήπια συμπτώματα σε εθελοντές σε 1*10 ⁸ CFU και αυξημένα κλινικά συμπτώματα σε 1*10 ⁹ CFU
Sh. flexneri 2a CVD1203	Χορηγήθηκε μόνο χοιρίδια, προστασία 85%	σε	ινδικά Καθόλου συμπτώματα σε ανθρώπους σε δόση 1*10 ⁶ CFU
Sh. flexneri 2a SC602	3/7 εθελοντές είχαν ήπια συμπτώματα		Ήπια διάρροια και πυρετός στους

1.1.10) Τυποποίηση

Η επιδημιολογική επιτήρηση των τροφιμογενών λοιμώξεων είναι πολύ σημαντικό «όπλο» για την προστασία της δημόσιας υγείας. Η συνεχής και συστηματική συλλογή, ανάλυση και ερμηνεία όλων των δεδομένων που αφορούν στην εμφάνιση και εξάπλωση των τροφιμογενών παραγόντων είναι απαραίτητες διαδικασίες για το σχεδιασμό, την εφαρμογή και την αξιολόγηση των παρεμβάσεων δημόσιας υγείας με τελικό στόχο τον αποτελεσματικό έλεγχο των λοιμωδών νοσημάτων.

Οι βασικοί στόχοι της επιδημιολογικής επιτήρησης είναι :

1. Η έγκαιρη αναγνώριση επιδημιών, ώστε να λαμβάνονται άμεσα τα κατάλληλα μέτρα.
2. Η συνεχής καταγραφή της συχνότητας των τροφιμογενών λοιμώξεων / επιπολασμού αιτιολογικών παραγόντων και η εκτίμηση της νοσηρότητας ή θνησιμότητας που προκαλούν
3. Η έγκαιρη προειδοποίηση για αλλαγές στη συχνότητα τροφιμογενών λοιμώξεων

Στα πλαίσια των παραπάνω στόχων και με δεδομένα τη διάσπαρτη μορφή τροφιμογενών επιδημιών και της εξάπλωσης ενός παθογόνου μικροβίου μέσω των τροφίμων σε διαφορετικά μέρη του πλανήτη, καθίσταται κρίσιμη και απαραίτητη η δυνατότητα γρήγορης και αξιόπιστης διαφοροποίησης μεταξύ σχετιζόμενων μικροβιακών καλλιεργημάτων (isolates) ώστε να είναι δυνατή έγκαιρα και έγκυρα η ανίχνευση τυχόν κλωνικής διασποράς ενός μικροοργανισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διαδικασία της τυποποίησης (typing) των καλλιεργημάτων, δηλαδή της φαινοτυπικής ή/και γονοτυπικής

ανάλυσής τους με σκοπό την παραγωγή “αποτυπώματος” (fingerprint) ειδικού για κάθε στέλεχος (strain) ή κλώνο (clone).

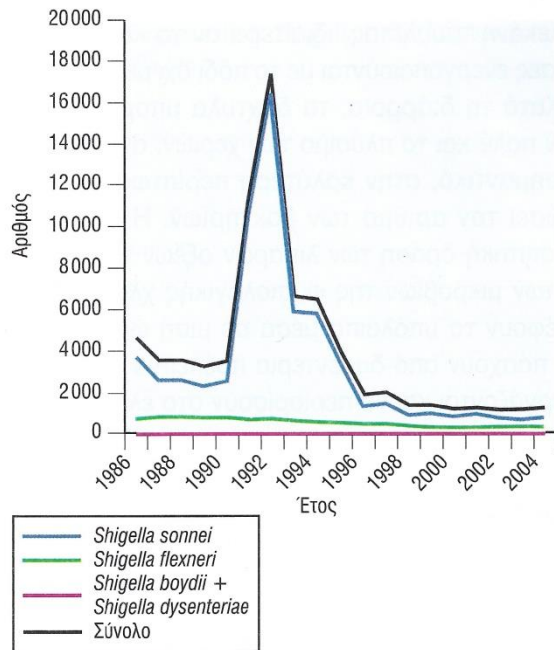
1.2) Επιδημιολογικά δεδομένα Σιγκέλλωσης

1.2.1) Παγκόσμια Γεωγραφική Επίπτωση

Η Σιγκέλλωση αποτελεί ένα παγκόσμιο υγειονομικό πρόβλημα. Σήμερα, τόσα χρόνια μετά την ανακάλυψη του βακτηρίου, η σιγκέλλωση αποτελεί ακόμα σημαντικό νόσημα για την δημόσια υγεία, και πιο συγκεκριμένα στην αναπτυσσόμενες χώρες, όπου οι συνθήκες διαβίωσης δεν είναι κατάλληλες. (Niyogi, 2005) Οι άνθρωποι είναι οι κύριοι ξενιστές αυτού του βακτηρίου, ωστόσο έχουν αναφερθεί επιδημίες και σε αποικίες πρωτεύοντων. Σε αναπτυσσόμενες χώρες οι άσχημες συνθήκες υγιεινής που επικρατούν και η υπερπληθυσμένη στέγαση, αποτελούν παράγοντες μετάδοσης του βακτηρίου. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Τον 19^ο αιώνα η *S. dysenteriae 1*, είχε πολυάριθμα κρούσματα με υψηλή θνητότητα σε πολλά μέρη του κόσμου. Μετα το 1920 άρχισε να εξαφανίζεται η μεγάλη επίπτωση από αυτό το είδος *Shigella*, για άγνωστους λόγους. Την δεκαετία του 70', εμφανίστηκε μια αύξηση των κρουσμάτων και της μετάδοσης, στην Γουατεμάλα. Πριν από αυτήν την δεκαετία η Κεντρική Αμερική δεν εμφάνιζε τόσα πολλά κρούσματα δυσεντερίας. (Epidemic Shiga Dysentery in Central America II. Epidemiologic Studies in 1969, 1970) Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε έξι ασιατικές χώρες, βρέθηκε ότι η Σιγκέλλωση αποτελεί 5% των περιπτώσεων με σύμπτωμα την διάρροια με 2,1 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό τον χρόνο. Έχουν σημειωθεί αρκετές επιδημίες Σιγκέλλωσης σε χώρες της Ασίας, όπως το Μπαγκλαντές (1972-1978,2003), Σρι Λάνκα (1976), Μαλδίβες (1982), Νεπάλ (1984-1985). Η *Shigella spp.* έχει από το παρελθόν μέχρι και τώρα, την ικανότητα να προκαλεί επιδημίες παγκόσμια. Τη δεκαετία το 90' στην Δυτική Βεγγάλη καταγράφηκαν 350.000 κρούσματα, με τους θανάτους να ανέρχονται στους 3.500 σε ένα χρόνο. (Taneja N., 2014)

Πρόσφατες αναφορές δηλώνουν ότι υπάρχουν 188.000.000 περιπτώσεις ετησίως σε όλο τον κόσμο, με τους θανάτους να κυμαίνονται στο 1.000.000 (Aslam A., 2020), με τα 2/3 των θανάτων αφορούν παιδιά μικρής ηλικίας έως και τα 10 έτη. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Οι Ηνωμένες Πολιτείες έχουν 450.000 περιπτώσεις ετησίως, με την επιτήρηση των λοιμώξεων να αρχίζει το 1999. (Minakshi, και συν., 2018) Οι περισσότερες περιπτώσεις στις Ηνωμένες πολιτείες, οφείλονται στη *S. sonnei* (77%). Στις αναπτυσσόμενες χώρες ο κύριος υπότυπος για τις λοιμώξεις αποτελεί η *S. flexneri*. Είναι πιο συχνό σε παιδιά, με τις περισσότερες περιπτώσεις να είναι σε παιδιά κάτω των 4 ετών. (28 περιπτώσεις/100.000) και 25/100.000 περιπτώσεις σε παιδιά ηλικίας 4 έως 11 ετών. (Aslam A., 2020) Βρέφη κάτω των έξι μηνών δεν είναι συνηθισμένο να νοσήσουν. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Επιδημίες μπορεί να παρατηρηθούν σε μη τήρηση κανόνων υγιεινής και όταν υπάρχει μεγάλος αριθμός ατόμων σε ένα χώρο (π.χ. φυλακές, ψυχιατρικές κλινικές, στρατόπεδα, βρεφονηπιακούς σταθμούς, καταυλισμούς προσφύγων). Επιδημίες επίσης έχουν παρατηρηθεί μεταξύ ομοφυλόφιλων ζευγαριών. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Η Σιγκέλλωση αποτελεί την πιο κοινή αιτία διαρροϊκής νόσου στην Αφρική και τη Νότια Ασία. (Aslam A., 2020) Το 2007 νόσησαν στη Δυτική Βεγγάλη 461 άτομα από τους ορότυπους *S. flexneri* 2a και 3a. Στην Δυτική Ινδία μολύνθηκαν 300 άνθρωποι το 2009. (Taneja N., 2014)

Οι λοιμώξεις από *S. dysenteriae* 1 και *S. boydii* μειώθηκαν και τα στελέχη *S. sonnei* επικράτησαν στις Ευρωπαϊκές χώρες, τον 20^ο αιώνα. Στην Αγγλία και την Ουαλία το 1992 καταγράφηκαν 16.000 κρούσματα από *S. sonnei*. Μεταξύ 1998 με 2004 μειώθηκε ο αριθμός των κρουσμάτων, όπου φτάσαν τα 1000 κρούσματα ετησίως. Μειώθηκαν τα κρούσματα από την *S. flexneri* (250 κρούσματα/έτος), αλλά παραμέναν παραπάνω από τα κρούσματα που οφείλονται σε *S. boydii* (50-100 κρούσματα/έτος) και *S. dysenteriae* (40-50 κρούσματα/έτος) τα οποία αποτελούν εισαγόμενα κρούσματα.



Γράφημα 1: Στελέχη που απομονώθηκαν στην Ουαλία και Αγγλία την περίοδο 1986-2004. Εικ. 25.1 (Greenwood, και συν., 2016)

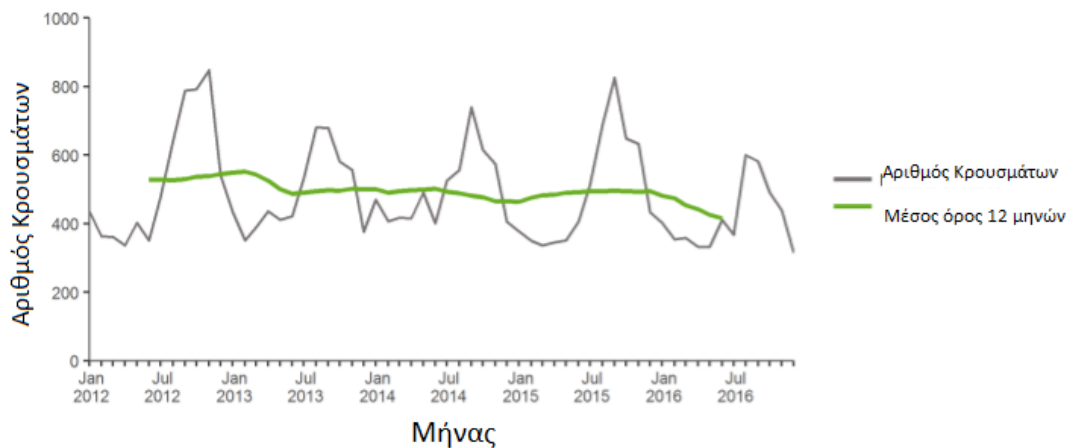
Στις αναπτυσσόμενες χώρες απομονώνονται συχνότερα οι *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, και *S. boydii*, ενώ στις αναπτυγμένες χώρες συχνότερα συναντάται η *S. sonnei*. Η εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών σχετίζεται με την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών παγκόσμια.

Στις χώρες της ευρωπαϊκής Ένωσης (εκτός της Ιταλίας και της Ισπανίας) και των χωρών της ΕΕΑ/ΕΦΤΑ (European Economic Area/ European Free Trade Association) σύμφωνα με το ECDC, η μέση επίπτωση ήταν 18 κρούσματα άνα 1.000.000 πληθυσμό το 2008. Το 2016, αναφέρθηκαν 5.631 κρούσματα Σιγκέλλωσης σε 29 χώρες της Ευρώπης, με την Γερμανία, Γαλλία, Ολλανδία και Αγγλία να παρουσιάζουν το 62,7% των περιπτώσεων. Η Αγγλία κατείχε ποσοστό 32,9% των συνολικών κρουσμάτων. Τα αναφερόμενα κρούσματα ήταν 1,5 / 100.000 πληθυσμό το 2016, το χαμηλότερο ποσοστό που έχει αναφερθεί μέσα στο 2012-2016. Η Βουλγαρία συνέχισε να έχει υψηλά ποσοστά μέσα στο 2016, δηλώνοντας 4.1 κρούσματα/ 100.000 πληθυσμό. (ECDC, 2016)

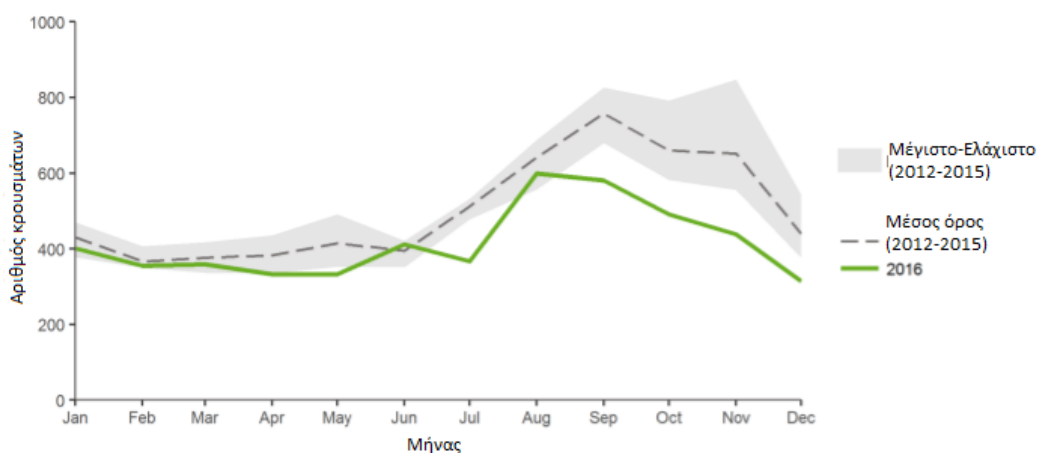
Πίνακας 8: Επιβεβαιωμένα κρούσματα στην Ευρώπη, 2012-2016 (ECDC, 2016)

Χώρα	2012		2013		2014		2015		2016			Αναφερόμενα κρούσματα
	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό	Αριθμός	Ποσοστό	Κρούσματα	Ποσοστό	ASR	
Αυστρία	57	0.7	70	0.8	75	0.9	96	1.1	62	0.7	0.8	62
Βέλγιο	340	3.1	323	2.9	403	3.6	391	3.5	353	3.1	3.1	353
Βουλγαρία	777	10.6	486	6.7	512	7.1	410	5.7	291	4.1	4.4	291
Κροατία	26	0.6	19	0.4	0	0.0	12	0.3	6	0.1	0.1	6
Κύπρος	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.1	0.1	1
Τσεχία	266	2.5	247	2.3	92	0.9	88	0.8	68	0.6	0.6	70
Δανία	105	1.9	109	1.9	110	2.0	170	3.0	212	3.7	3.9	212
Εστονία	34	2.6	12	0.9	10	0.8	12	0.9	17	1.3	1.3	17
Φιλανδία	88	1.6	111	2.0	89	1.6	86	1.6	59	1.1	1.1	66
Γαλλία	686	2.4	662	2.3	873	3.0	822	2.8	828	2.8	2.9	828
Γερμανία	523	0.7	562	0.7	509	0.6	553	0.7	418	0.5	0.5	426
Ελλάδα	89	0.8	112	1.0	90	0.8	78	0.7	72	0.7	0.7	72
Ουγγαρία	32	0.3	39	0.4	7	0.1	65	0.7	23	0.2	0.3	23
Ισλανδία	1	0.3	0	0.0	2	0.6	1	0.3	0	0.0	0.0	0
Ιρλανδία	29	0.6	45	1.0	53	1.2	88	1.9	84	1.8	1.8	84
Ιταλία	30	-	19	-	24	-	26	-	20	-	-	20
Λετονία	3	0.1	2	0.1	8	0.4	12	0.6	3	0.2	0.2	3
Λιχτενστάιν	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Λιθουανία	52	1.7	32	1.1	21	0.7	24	0.8	13	0.5	0.5	13
Λουξεμβούργο	14	2.7	23	4.3	12	2.2	3	0.5	1	0.2	0.2	1
Μάλτα	0	0.0	2	0.5	0	0.0	1	0.2	2	0.5	0.5	2
Ολλανδία	450	2.7	382	2.3	335	2.0	444	2.6	428	2.5	2.6	440
Νορβηγία	77	1.5	104	2.1	93	1.8	85	1.6	83	1.6	1.6	83
Πολωνία	13	0.0	19	0.0	41	0.1	18	0.0	15	0.0	0.0	15
Πορτογαλία	10	0.1	2	0.0	5	0.0	33	0.3	13	0.1	0.1	18
Ρουμανία	354	1.8	156	0.8	147	0.7	168	0.8	129	0.7	0.7	130
Σλοβακία	449	8.3	256	4.7	222	4.1	191	3.5	145	2.7	2.7	150
Σλοβενία	25	1.2	10	0.5	18	0.9	34	1.6	17	0.8	0.9	17
Ισπανία	264	0.6	141	0.3	230	0.5	293	0.6	180	0.4	0.4	208
Σουηδία	328	3.5	335	3.5	324	3.4	311	3.2	232	2.4	2.4	232
Αγγλία	2 021	3.2	2 076	3.2	2 226	3.5	2 208	3.4	1 856	2.8	2.9	1 856
ΕΥ/ΕΕΑ	7 143	1.8	6 356	1.6	6 531	1.7	6 723	1.7	5 631	1.5	1.5	5 699

Πληροφορίες σχετικά με ταξίδια ήταν διαθέσιμες για το 60.8% των περιπτώσεων, με το 53,9% να σχετίζεται με ταξίδι στην Ινδία ή στο Μαρόκο. (Aslam A., 2020) Η *Shigella* αποτελεί συχνό αίτιο διάρροιας ταξιδιωτών, αλλά πιο συγκεκριμένα εμφανίζει επιπτώσεις σε ταξιδιώτες που επισκέπτονται αναπτυσσόμενες χώρες. Έχουν δηλωθεί 8,270 κρούσματα με εντερικά συμπτώματα στο FoodNet, που σχετίζονται με ταξίδια, με μόλις το 13% να αφορά μόλυνση από το παθογόνο βακτήριο *Shigella spp*, καθιστώντας το στην τρίτη θέση, μετά από το *Campylobacter spp.* (42%) και *Salmonella spp.* (32%) (Taneja N., 2014) Στην Ευρώπη παρατηρείται αύξηση των κρουσμάτων κατά τους θερινούς μήνες όπως απεικονίζεται και στο γράφημα. (Aslam A., 2020)



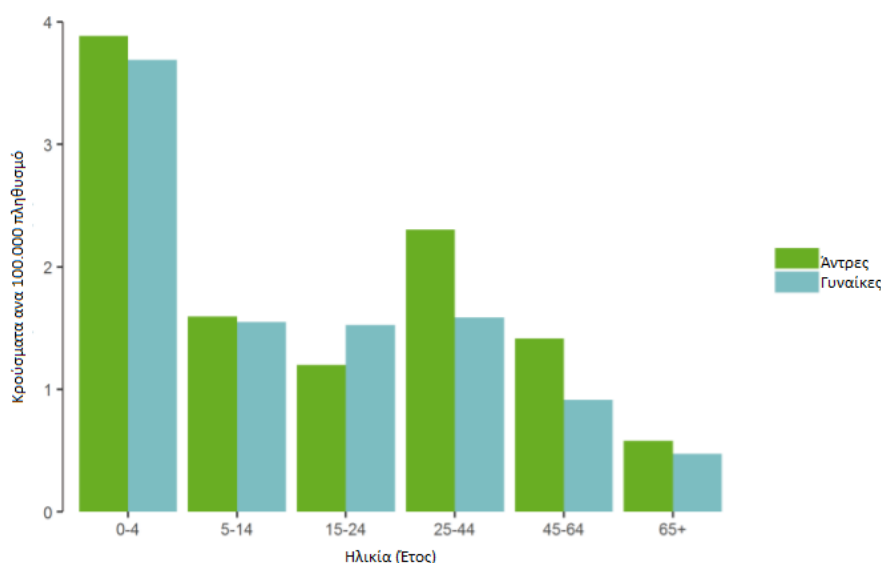
Γράφημα 2: Εποχικότητα κρουσμάτων στην Ευρώπη την περίοδο 2012-2016. (Χώρες που καταγράφηκαν: Αυστρία, Βέλγιο, Βουλγαρία, Κροατία, Κύπρος, Τσεχία, Δανία, Φιλανδία, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ισλανδία, Ιρλανδία, Ιταλία, Λιθουανία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Ολλανδία, Νορβηγία, Πολωνία, Πορτογαλία, Ρουμανία, Σλοβενία, Σλοβακία, Ισπανία, Σουηδία, Αγγλία) (ECDC, 2016)



Γράφημα 3: Εποχικότητα κρουσμάτων στην Ευρώπη την περίοδο 2012-2016. (Χώρες που καταγράφηκαν: Αυστρία, Βέλγιο, Βουλγαρία, Κροατία, Κύπρος, Τσεχία, Δανία, Φιλανδία, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ισλανδία, Ιρλανδία, Ιταλία, Λιθουανία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Ολλανδία, Νορβηγία, Πολωνία, Πορτογαλία, Ρουμανία, Σλοβενία, Σλοβακία, Ισπανία, Σουηδία, Αγγλία) (ECDC, 2016)

Στην Ευρώπη παρατηρείται, τα κρούσματα να είναι περισσότερο αυξημένα κατά την παιδική ηλικία (0-4 ετών) με 3,8 περιπτώσεις/100.000

πληθυσμό. Δεν υπάρχει καμιά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε άντρες και γυναίκες, ως αναφορά την επίπτωση της μόλυνσης σχετικά με το φύλο του ασθενούς. Εκτός από την ηλικιακή κλίμακα 25-44 των ανδρών που παρατηρείται μια μικρή αύξηση, με 2,3 περιπτώσεις/100.000 πληθυσμό. Στην ηλικιακή κλίμακα 0-4 ετών υπάρχουν πολύ υψηλά ποσοστά σε Βουλγαρία και Σλοβακία, αγγίζοντας τις 40,1 και 25,8 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό αντίστοιχα.



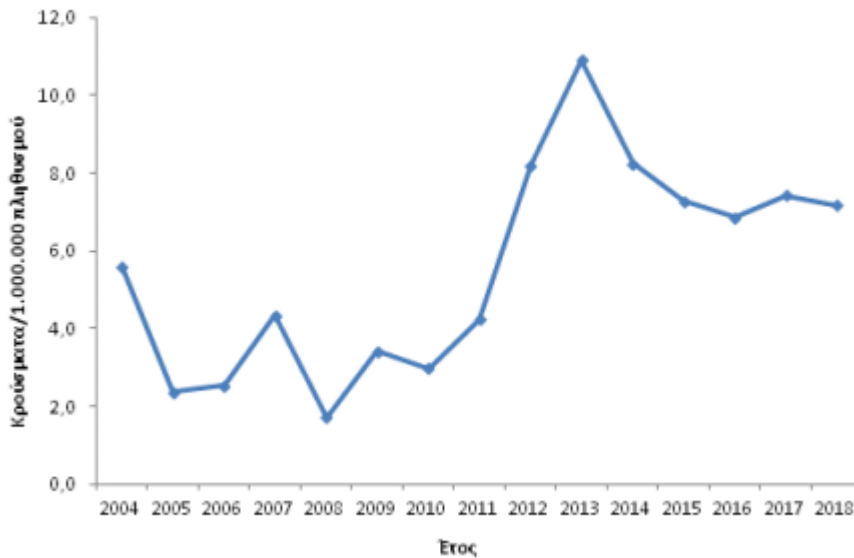
Γράφημα 4: Κρούσματα σε σύγκριση με ηλικιακές ομάδες και φύλο ανά 100.000 πληθυσμό, 2016 στις χώρες της Ευρώπης. (Χώρες που καταγράφηκαν: Αυστρία, Βέλγιο, Βουλγαρία, Κροατία, Κύπρος, Τσεχία, Δανία, Φιλανδία, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ισλανδία, Ιρλανδία, Ιταλία, Λιθουανία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Ολλανδία, Νορβηγία, Πολωνία, Πορτογαλία, Ρουμανία, Σλοβενία, Σλοβακία, Ισπανία, Σουηδία, Αγγλία) (ECDC, 2016)

1.2.2) Επιδημιολογικά Δεδομένα Ελλάδας

Στην Ελλάδα με βάση το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων και τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας, η μέση ετήσια επίπτωση ήταν 5,6 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμό για την περίοδο 2004-2018, με μέσο αριθμό δηλωθέντων κρουσμάτων το 60,8 (τυπική απόκλιση: 29,4)

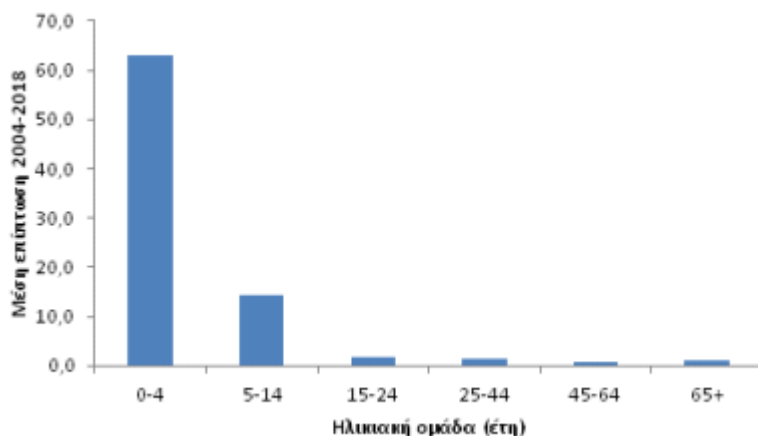
Πίνακας 9: Δήλωση κρουσμάτων από *Shigella* για την περίοδο 2004-2018 στην Ελλάδα με βάση το Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών 2004-2018

Έτος	Αριθμός κρουσμάτων	Ετήσια επίπτωση (ανά 1.000.000 πληθυσμού)
2004	61	5,6
2005	26	2,4
2006	28	2,5
2007	48	4,3
2008	19	1,7
2009	38	3,4
2010	33	3,0
2011	47	4,2
2012	91	8,2
2013	120	10,9
2014	90	8,2
2015	79	7,3
2016	74	6,9
2017	80	7,4
2018	78	7,2
Σύνολο	912	5,6*

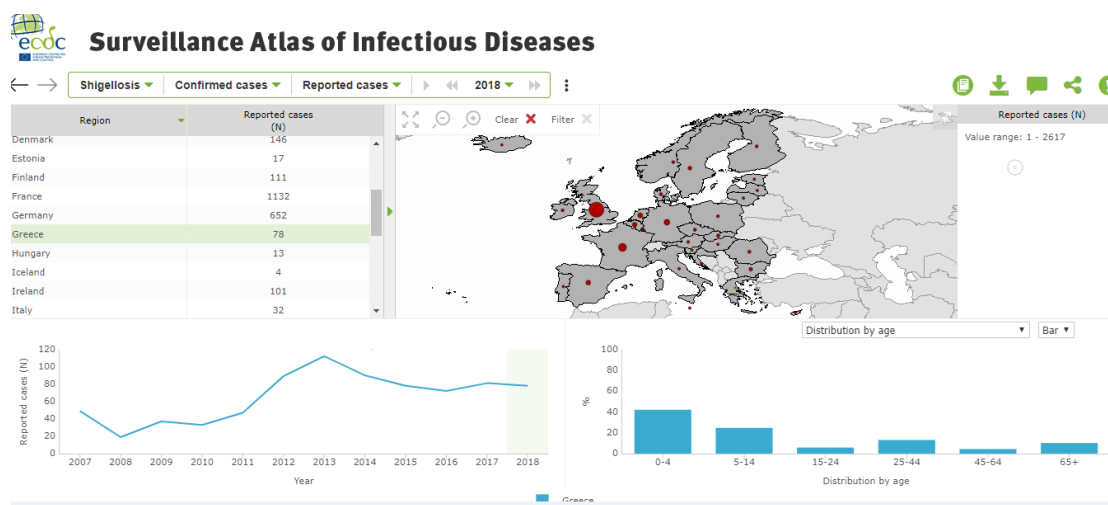


Γράφημα 5: Εξέλιξη δηλωμένης επίπτωσης από *Shigella* στην Ελλάδα ανά έτος με βάση το Σύστημα Δήλωσης και επιτήρησης υποχρεωτικών νοσημάτων μέσω του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών 2004-2018 (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

Με βάση την κατανομή που έγινε κατά φύλο και ηλικία, παρατηρήθηκε υψηλότερη μέση ετήσια επίπτωση σε ηλικίες 0-4 ετών (63 κρούσματα ανά 1.000.000) πληθυσμό και σε ηλικίες 5-14 έτη (14,4 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμό). (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Μεταξύ των δύο φύλων δεν υπάρχει διαφορά (Aslam A., 2020) (άνδρες 5,6 κρούσματα και γυναίκες 5,4 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμό). (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ) Σε χώρες που υπάρχουν καλές συνθήκες υγιεινής, όπως είναι η Ελλάδα, η κυριότερη πηγή εξάπλωσης της νόσου παρατηρείται σε παιδιά σχολικής ηλικίας, κυρίως σε παιδιά δημοτικού και νηπιαγωγείου που παραμελούν το καλό πλύσιμο χεριών, έπειτα από χρήση της τουαλέτας. (Greenwood, και συν., 2016)

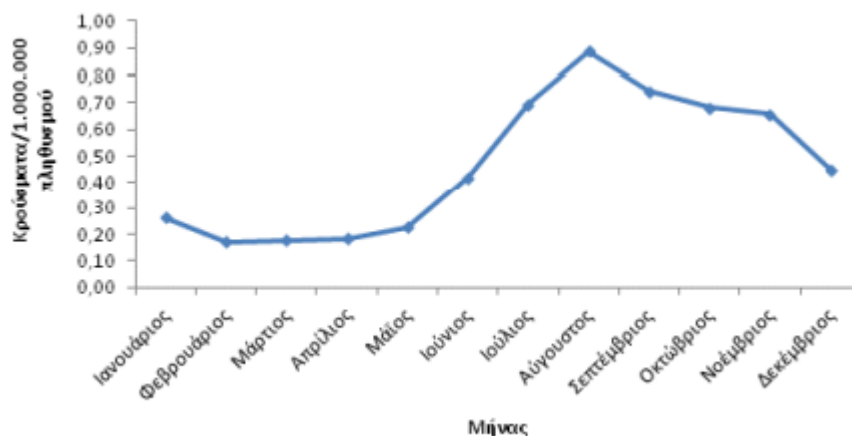


Γράφημα 6: Κατανομή των κρουσμάτων με βάση την ηλικία των ασθενών στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων και Σύστημα Επιτήρησης μέσω του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών-Σιγκελλών, 2004-2018 (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)



Εικόνα 17: ECDC, Surveillance Atlas of infectious Diseases, Καταγεγραμμένα κρούσματα ,2018, Ελλάδα (ECDC)

Όσο αναφορά την εποχικότητα και τη γεωγραφική κατανομή, η επίπτωση του νοσήματος στην Ελλάδα είναι δικόρυφη, παρουσιάζοντας αύξηση κατά τους θερινούς μήνες και ιδιαίτερα τον Αύγουστο αλλά και ένα δεύτερο κύμα το φθινόπωρο (Οκτώβριο- Νοέμβριο). (Greenwood, και συν., 2016) Τα κρούσματα που παρατηρήθηκαν ήταν αυξημένα στη Δυτική Ελλάδα (11,7 ανά 1.000.000 πληθυσμού) σε σχέση με το Νότιο Αιγαίο(0,2 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμό)



Γράφημα 7: Εποχικότητα νοσήματος στην Ελλάδα, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων & Σύστημα Επιτήρησης μέσω του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών-Σιγκελλών, 2004- 2018 (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

Κατά τον εργαστηριακό έλεγχο την περίοδο 2004-2018 απομονώθηκαν τα είδη *S.flexneri* και το *S. sonnei* συχνότερα, ενώ τη μικρότερη συχνότητα δήλωσης είχε το *S. dysenteriae*. Το 2010, 2013 και 2015 δηλώθηκαν δύο, ένα και δύο κρούσματα αντίστοιχα, αποτελώντας την πιο σπάνια εμφάνιση στην Ελλάδα. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

Πίνακας 10: Κατανομή κρουσμάτων με συχνότητα εμφάνισης κάθε στελέχους, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων και Επιτήρησης μέσω Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών-Σιγκελλών, 2004-2018 (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ)

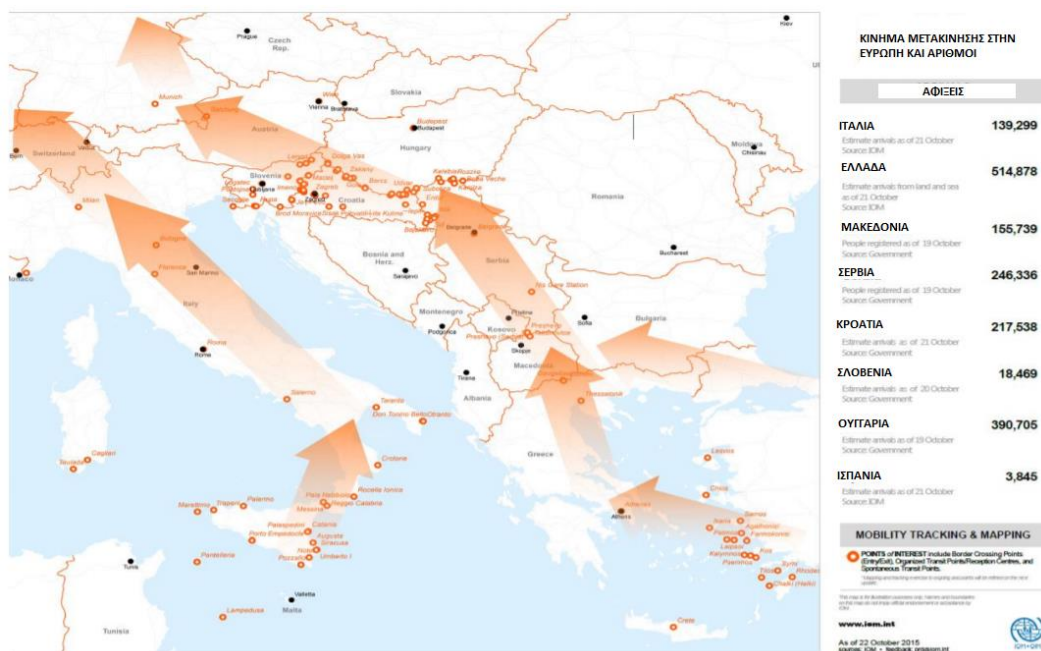
	<i>S. flexneri</i> n (%)	<i>S. sonnei</i> n (%)	<i>S. boydii</i> n (%)	<i>S. dysenteriae</i> n (%)	Άγνωστο n (%)	Σύνολο n (%)
2004	19 (31)	13 (21)	1 (2)	0 (0)	28 (46)	61 (100)
2005	8 (30)	11 (42)	1 (4)	0 (0)	6 (24)	26 (100)
2006	4 (15)	2 (7)	1 (4)	0 (0)	20 (74)	27 (100)
2007	4 (8)	23 (49)	0 (0)	0 (0)	20 (43)	47 (100)
2008	7 (50)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	6 (43)	14 (100)
2009	17 (50)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	15 (44)	34 (100)
2010	17 (63)	2 (8)	0 (0)	2 (7)	6 (22)	27 (100)
2011	16 (37)	1 (2)	1 (2)	0 (0)	26 (59)	44 (100)
2012	27 (30)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	63 (69)	91 (100)
2013	54 (49)	27 (25)	0 (0)	1 (1)	28 (25)	110 (100)
2014	37 (43)	19 (22)	1 (1)	0 (0)	30 (34)	87 (100)
2015	45 (61)	18 (24)	4 (5)	2 (3)	5 (7)	74 (100)
2016	29 (41)	12 (17)	4 (6)	0 (0)	25 (36)	70 (100)
2017	25 (33)	31 (41)	1 (1)	0 (0)	18 (24)	75 (100)
2018	25 (39)	21 (32)	2 (3)	0 (0)	17 (26)	65 (100)

1.2.3) Επίπτωση Μεταναστευτικού στην Δημόσια Υγεία

Η *Shigella spp.* αποτελεί συχνό αίτιο μόλυνσης όπως αναφέρθηκε και παραπάνω σε αναπτυσσόμενες χώρες του πλανήτη. Σήμερα, με τα ταξίδια και την μετανάστευση πληθυσμών λόγω οικονομικών προβλημάτων ή πολέμου, υπάρχει κίνδυνος για μόλυνση προσφύγων και κατ' επέκταση και των μόνιμων κατοίκων μιας χώρας. Η Ελλάδα αποτελεί μια από τις χώρες που δέχεται μαζική εισροή μεταναστών και προσφύγων από την Μέση Ανατολή. Η τόσο μεγάλη εισροή προσφύγων και μεταναστών σε συνδιασμό με έλλειψη υποδομών και μη κατάλληλη στήριξη για την διαβίωση αυτών των ανθρώπων, αποτελεί παράγοντα κινδύνου, για εκδήλωση μεταδοτικών ασθενειών, όπως η δυσεντερία.

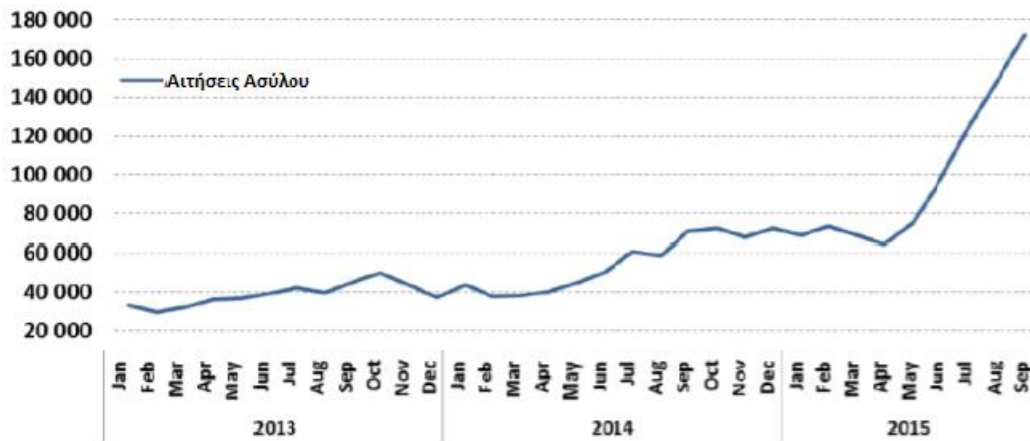
Από τους πρώτους μήνες του 2015 έχουν φτάσει στα παράλια των ευρωπαϊκών χωρών (Ελλάδα, Ιταλία), 900.000 πρόσφυγες και μετανάστες από στεριά και θάλασσα, τέσσερις φορές μεγαλύτερος αριθμός από το 2014.

Στην Ελλάδα μέχρι τα τέλη του 2015 είχαν φτάσει 768.916 πρόσφυγες και μετανάστες από την θάλασσα. (Georgakorouli T., 2016)



Εικόνα 18: Μετακινήσεις προσφύγων και μεταναστών προς τις Ευρωπαϊκές χώρες, 2015. (ECDC, 2015)

Τους πρώτους μήνες του 2015, υπήρχε κυρίως είσοδος προσφύγων και μεταναστών από Συρία, Αφγανιστάν, στα ευρωπαϊκά σύνορα, μέσω θαλάσσης, κατευθυνόμενοι στα παράλια των ελληνικών ακτών. Από τα μέσα του 2015, αρκετοί πρόσφυγες από Συρία, Σομαλία, Σουδάν, Νιγηρία (140.000) εισήρθαν στην Ευρώπη, φτάνοντας στην Ιταλία μέσω θαλάσσης. Από την Ελλάδα πολλοί κατευθύνονται προς Βόρεια Μακεδονία, όπου συνεχίζουν σε Σερβία, Κροατία, Σλοβενία έτσι ώστε να φτάσουν στην Βόρεια Ευρώπη, σε χώρες όπως Αυστρία, Γερμανία, Σουηδία. (ECDC, 2015)



Γράφημα 8: Ζήτηση ασύλου από Ιανουάριο 2013 έως Σεπτέμβριο 2015, (ECDC, 2015)

Η έλλειψη καταλλήλων συνθηκών διαβίωσης στα άτομα αυτά, είτε στα κέντρα μεταναστών, είτε σε σπίτια που υπάρχει υπερπληθυσμός κατοίκησης, οδηγεί σε κρούσματα δυσεντέριας. Η έλλειψη καθαρού πόσιμου νερού, καθαρών ειδών υγιεινής, ακόμα κ η έλλειψη πρόσβασης σε τακτικό πλύσιμο αποτελεί παράγοντα που ευνοεί την μόλυνση του ίδιου του ατόμου και των γύρων του. (ECDC, 2015)

Σε αυτήν την εργασία, θα περιγραφούν κρούσματα από *Shigella* spp. που απομονώθηκαν από μετανάστες και πρόσφυγες που διαμένουν σε Κέντρο Υποδοχής Προσφύγων της Σάμου και προσήλθαν στο Γενικό Νοσοκομείο Σάμου ‘Άγιος Παντελεήμων’ την περίοδο 2019 με συμπτώματα γαστρεντερίτιδας. Σημαντικό ζητήματα που θα αναλυθούν είναι: η αντοχή στα αντιβιοτικά, αν τα καλλιεργήματα που απομονώθηκαν αποτελούν ένα κοινό στέλεχος επιδημίας και τι πρέπει να προσέξει η κοινότητα για να αντιμετωπιστεί αυτό το υγειονομικό ζήτημα. Τα δείγματα των ασθενών απεστάλησαν από το Γενικό Νοσοκομείο Σάμου ‘Άγιος Παντελεήμων’ στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών και λοιπών εντεροπαθογόνων (ΕΚΑΣΣ) και δηλώθηκαν στο Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ), σύμφωνα με το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων.

1.3) Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων (ΣΥΔΝ)

Το σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων (ΣΥΔΝ) έχει ως στόχο την επιτήρηση λοιμωδών και μη νοσημάτων. Ανάλογα με το νόσημα τίθεται ο

χρόνος δήλωσης του κρούσματος και τι μέτρα θα ακολουθήσουν για την μελέτη και εντόπιση μιας μικρής συρροής. (Κέντρο Ελέγχου Ειδικών λοιμώξεων, 2004)

Οι στόχοι που έχουμε με την υποχρεωτική δήλωση νοσημάτων και επιτήρησή τους χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, ειδικοί και γενικοί στόχοι. Αρχικά ως γενικοί στόχοι για την επιτήρηση ενός νοσήματος θέτονται α) η εκτίμηση του νοσήματος και την διαχρονικότητα τάσεων που έχει, τόσο στην χώρα όσο και παγκόσμια, β) διερεύνηση συμμετοχής επιβλαβών παραγόντων στη νοσηρότητα, γ) παροχή πληροφοριών και ιδεών για μέτρα πρόληψης και ελέγχου ενός νοσήματος. Στη συνέχεια, ως ειδικοί στόχοι θέτονται α) η ανίχνευση μεμονομένων κρουσμάτων, έτσι ώστε να λαμβάνονται μέτρα προφύλαξης στο στενό περιβάλλον των ασθενών (προφύλαξη ατόμων και περιορισμός μετάδοσης νόσου) ή και στο περιβάλλον τους, β) ανίχνευση έξαρσης επιδημιών και κατεπέκταση πανδημιών και λήψη μέτρων για την προστασία της κοινότητας. (Κέντρο Ελέγχου Ειδικών λοιμώξεων, 2004)

Πίνακας 11: Νοσήματα υποχρεωτικής δήλωσης που μεταδίδονται τροφιμογενώς, υδατογενώς, ή από περιβαλλοντική πηγή και ζωνόσοι. (Κέντρο Ελέγχου Ειδικών λοιμώξεων, 2004)

<i>Νοσήματα που μεταδίδονται τροφιμογενώς, υδατογενώς ή από περιβαλλοντική πηγή, και ζωνόσοι</i>		
35	Συρροή κρουσμάτων τροφιμογενούς - υδατογενούς νοσήματος	24ωρο
36	Τυφοειδής πυρετός / παράτυφος	24ωρο
37	Σαλμονέλλωση	24ωρο
38	Σιγκέλλωση	24ωρο
39	Λοίμωξη από εντεροαιμορραγική <i>E. coli</i> (EHEC)	24ωρο
40	Τριχίνωση	24ωρο
41	Βρουκέλλωση	BT Εβδομάδα [9]
42	Λιστερίωση	Εβδομάδα
43	Πυρετός Q, οξεία λοίμωξη	BT Εβδομάδα [9]
44	Εχινokokκίαση	Εβδομάδα
45	Λεισμανίαση	Εβδομάδα
46	Λεπτοσπείρωση	Εβδομάδα

Η *Shigella* ανήκει στα τροφιμογενή νοσήματα που είναι υποχρεωτικώς δηλούμενα. Ο μέγιστος χρόνος που μεσολαβεί από την δήλωση των κρουσμάτων είναι 24 ώρες και η δήλωση γίνεται στα κέντρα αναφοράς σιγκελλών. (Κέντρο Ελέγχου Ειδικών λοιμώξεων, 2004)

1.4) Κέντρα Αναφοράς Σιγκελλών

Σύμφωνα με το Άρθρο 11 και απόφαση του υπουργείου Υγείας, κρίνεται απαραίτητο η δημιουργία Κέντρων Αναφοράς για θέματα Δημόσιας Υγείας, αναγνωρίζοντας Εργαστήρια, τμήματα Α.Ε.Ι, εργαστήρια Ε.Σ.Δ.Υ και μονάδες Νοσοκομείων ή άλλων επιστημονικών ή ερευνητικών φορέων του δημόσιου τομέα. (Υπουργείο Υγείας) Σύμφωνα με το Άρθρο 12 του Υπουργείου Υγείας, τα Κέντρα αναφοράς καθορίζονται για συγκεκριμένα νοσήματα. Ασκούν τις αρμοδιότητες τους για επιτήρηση, μελέτη και καταγραφή σύμφωνα με το άρθρο 20 του ν. 3370/2005 (Α 176)

Συλλέγονται τα δείγματα από *Shigella* από τις μονάδες υγείας και αποστέλλονται στα κέντρα αναφοράς της κάθε χώρας. Τα δείγματα επιβεβαιώνονται, τυποποιούνται και αναγνωρίζεται ο υπότυπος τους. Αν υπάρχει ορότυπος ασυνήθιστος που δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί αποστέλλεται σε Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Σιγκελλών, στο Enteric Diseases Laboratory Branch (EDLB), στο Κέντρο πρόληψης και ελέγχου νοσημάτων (CDC). (CDC) Στην Ευρώπη, ακολουθούν το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων στα κέντρα αναφοράς. Συλλέγουν τα δείγματα, τα ταυτοποιούν και πολλά εργαστήρια τα αποθηκεύουν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι χώρες Εσθονία, Ουγγαρία, Πολωνία, Ρουμανία, Σλοβακία και Ισπανία δεν αποθηκεύουν όλα τα δείγματα, παρά μόνο αυτά που είναι από επιδημίες και όποια άλλα ζητηθούν. Εννέα εργαστήρια αναφοράς (Βουλγαρία, Δανία, Φιλανδία, Ουγγαρία, Ιταλία, Λουξεμβούργο, Νορβηγία, Σλοβενία, Σουηδία) αποτελούν μέρη του Εθνικού οργανισμού Δημόσιας Υγείας, ενώ άλλα συνεργάζονται στενά με αυτό.

Έξι εργαστήρια αναφοράς από τις 24 χώρες της Ευρώπης (Ελλάδα, Αυστρία, Βέλγιο, Ισλανδία, Νορβηγία, Πολωνία), έχουν πρόγραμμα επιτήρησης αντοχής στα αντιβιοτικά. Για ερμηνεία αποτελεσμάτων τα

περισσότερα εργαστήρια χρησιμοποιούν τα κριτήρια CLSI, ενώ άλλα εργαστήρια χρησιμοποιούν κριτήρια EUCAST. Η Νορβηγία και η Γαλλία χρησιμοποιούν δικά τους κριτήρια και εθνικές οδηγίες. Για την έλεγχο της αντίστασης στα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 11 αντιβιοτικά, με το μικρότερο αριθμό τα 4 για Κύπρο και Εσθονία, και μέγιστο τα 21 για την Αυστρία. Αντιβιοτικά που ελέγχονται είναι αμοξυκιλλίνη, κεφοταξίμη, καρβαπενέμες, χλωραμφενικόλη, ναλιδιξικό οξύ, τετρακυκλίνη, γενταμυκίνη, τριμεθοπρίμη, σουλφομεθοξαζόλη, κεφαλοσπορίνες. (ECDC, 2012)

Στην Ελλάδα τα δείγματα από *Shigella*, από όλα τα εργαστήρια της χώρας, αποστέλλονται στον Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών, βεροτοξινογόνων *E. coli* και λοιπών εντεροπαθογόνων (ΕΚΑΣΣ) για περαιτέρω τυποποίηση, συνοδία με το παρακάτω δελτίο αναφοράς του δείγματος, όπου αναγράφονται το εργαστήριο απομόνωσης του δείγματος, πηγή απομόνωσης, ονοματεπώνυμο ασθενούς, είδος δείγματος, ημερομηνία λήψης δείγματος, ηλικία ασθενούς, φύλο, εμπλοκή ύποπτης τροφής ή ταξιδιού.



Τομέας Μικροβιολογίας της Δημόσιας Υγείας
Department of Public Health Microbiology

Καθηγητής Αικίβηδης Βασιλάκος/Professor Aikiviedis Vasilakos

www.esdy.edu.gr

Λ. Αλεξάνδρας 196, 115 21, Αθήνα
Τ. +30 213 2010364
Φ. +30 213 2010358
Ε. anastorou@esdy.edu.gr

196, Alexandras Avenue, 115 21 Athens, Greece
Τ. +30 213 2010364
Φ. +30 213 2010358
Ε. anastorou@esdy.edu.gr

«Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών,
Σιγκελλών και λοιπών εντεροπαθογόνων»,
Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας
Λ. Αλεξάνδρας 196
11521 Αμπελόκηποι-Αθήνα
Τηλ. 2132030353 / 2132010367
e-mail: gmandilara@esdy.edu.gr

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΝ – ΣΙΓΚΕΛΛΩΝ (ΕΚΑΣΣ)

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

(Παρακαλούμε συμπληρώστε όσο το δυνατόν πληρέστερα)

Εργαστήριο Απομόνωσης	
Πηγή Απομόνωσης (ανθρώπινη, άλλη, άγνωστη)	
Όνοματεπώνυμο ασθενούς (πλήρες)	
Νομός	
Είδος Δείγματος	
Ημερομηνία λήψης δείγματος	
Ηλικία ασθενούς	
Ηλικιακή κατηγορία ασθενούς (0-11 μηνών, 1-5 ετών, 6-14 ετών, 15-64 ετών, >64 ετών, άγνωστη)	
Φύλο (Α, Θ, άγνωστο)	
Εμπλοκή ύποπτης τροφής (αναφέρατε την ύποπτη τροφή)	
Τεκμηριωμένη τροφιμογενής αιτία (μικροβιολογική (Μ) ή επιδημιολογική (Ε) τεκμηρίωση, και τα δύο (Μ+Ε), απλή ένδειξη (Α))	
Εμπλοκή ταξιδιού (Ναι, Όχι, άγνωστο)	
1 ^η χώρα επίσκεψης	
2 ^η χώρα επίσκεψης	
Άλλες πληροφορίες	

Ο αποστέλλων:

Ημερομηνία:

Εικόνα 19: Φόρμα δήλωσης δείγματος *Shigella* στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Σιγκελλών, βεροτοξινογόνων και λοιπών εντεροπαθογόνων

Το ονοματεπώνυμο του ασθενούς είναι απαραίτητο για να ληφθούν μέτρα στο συγγενικό περιβάλλον, έτσι ώστε να μειωθεί η εξάπλωση της νόσου (χημειοπροφύλαξη, διευρένηση πηγής), και να αποφευχθεί η δήλωση εις διπλούν για κάποιον ασθενή. Η σημείωση της ηλικίας είναι βασική παράμετρος. Συστήνεται η συμπλήρωση της πλήρους ημερομηνίας γέννησης και έπειτα η ηλικία κατατάσσεται σε ηλικιακές κλίμακες (π.χ. 0-11 μηνών, 1-5 ετών, 6-14 ετών, 15-64 ετών, >64 ετών). Η δήλωση του τόπου που υπάρχει το

κρούσμα, εστιάζει στην εντόπιση μιας πιθανής επιδημίας. Πρέπει να δηλώνεται η εμπλοκή κάποιας ύποπτης τροφής ή ακόμα και άλλου κρούσματος, για περιορισμό της διασποράς της λοίμωξης. Άλλες πληροφορίες που είναι καλό να συμπληρώνονται, εθνικότητα ασθενούς, στοιχεία επικοινωνίας. (Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων, 2004)

Το ΕΚΑΣΣ συνεργάζεται με τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας για την διερεύνηση συρροών κρουσμάτων και την επιτήρηση των λοιμώξεων από *Shigella*. Το κέντρο αναφοράς πραγματοποιεί βιοχημική, μοριακή, οροτυπική τυποποίηση και μελέτη αντοχής στα αντιβιοτικά και διαθέτει τράπεζα στελεχών *Shigella* από το 1996 έως και σήμερα. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται και αποστέλλονται στον ΕΟΔΥ. (Τσιρώνη, 2015)

2) Σκοποί- Στόχοι Εργαστηριακής μελέτης

Σύμφωνα με την βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε στην Ενότητα 1, φαίνεται ότι η *Shigella* αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τροφιμογενείς λοιμώξεις, με υψηλό δείκτη μεταδοτικότητας και επικινδυνότητας. Σήμερα, με την αυξημένη εισροή μεταναστών και προσφύγων στα παράλια της Ευρώπης και η έλλειψη σωστών συνθηκών διαβίωσης, έχει οδηγήσει στην εμφάνιση κρουσμάτων σιγκέλλωσης μέσα στις δομές φιλοξενίας μεταναστών, δημιουργώντας ανησυχία στην κοινότητα για μια επιδημία της νόσου.

Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας είναι η εργαστηριακή μελέτη και παρουσίαση κρουσμάτων Σιγκέλλωσης σε ομάδα μεταναστών, στο κέντρο φιλοξενίας της Σάμου, με δείγματα να έχουν αποσταλθεί στο ΕΚΑΣΣ από το Γενικό Νοσοκομείο Σάμου «Άγιος Παντελεήμων», την περίοδο 2019.

Επιμέρους στόχοι της μελέτης είναι:

- Μελέτη και οροτυποποίηση των καλλιεργημάτων
- Να προσδιοριστούν τα επικρατέστερα στελέχη *Shigella spp.*
- Να γίνει εκτίμηση της αντοχής στα αντιβιοτικά
- Μελέτη για γονίδια που κωδικοποιούν για λακταμάσες, και αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς

3) Υλικά- Μέθοδοι Εργαστηριακής Επιτήρησης καλλιεργημάτων *Shigella spp.*

Το κέντρο φιλοξενίας της Σάμου έχει χωρητικότητα 648 ατόμων, ωστόσο φιλοξενούνται πάνω από 7000 άτομα. Από 1^η Οκτωμβρίου έως 12 Δεκεμβρίου καταγράφησαν 18 κρούσματα σιγκέλλωσης. Η μέση ηλικία των κρουσμάτων ανερχόταν στα 4,3 έτη (Κλίμακα 0-21 έτη) και δέκα περιπτώσεις ήταν άντρες (56%). 14 περιπτώσεις (78%) ήταν σε άτομα Αφγανικής καταγωγής, 2 Συριακής, 1 από Παλαιστίνη και σε ένα κρούσμα η εθνικότητα του ασθενούς παραμένει άγνωστη. Δεν βρέθηκε μόλυνση σε κάποιον από τους εργαζόμενους και εθελοντές μέσα στο κέντρο φιλοξενίας.

Θα γίνει παρουσίαση, καταγραφή και μελέτη των 18 κρουσμάτων από *Shigella spp.* σε μετανάστες-πρόσφυγες από το Κέντρο φιλοξενίας προσφύγων της Σάμου, την περίοδο μεταξύ Οκτώβριο με Δεκέμβριο 2019. Τα δείγματα αποστάλησαν στο ΕΚΑΣΣ, σύμφωνα με το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων, από το Γενικό Νοσοκομείο Σάμου «Άγιος Παντελεήμων».

3.1) Απομόνωση *Shigella spp.*- Ανακαλλιέργειες

Τρυβλία με απομονωμένες αποικίες βακτηρίου *Shigella spp.* στάλθηκαν στο ΕΚΑΣΣ για περαιτέρω τυποποίηση, στα πλαίσια της Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων και επιτήρησης τροφιμογενών λοιμώξεων για αποφυγή επιδημιών. Για να αρχίσει η τυποποίηση των στελεχών *Shigella*, πρέπει να γίνει ανακαλλιέργεια των καλλιεργημάτων που αποστάλησαν, για να ξεκινήσει η μελέτη τους και φύλαξη των στελεχών στη βαθιά κατάψυξη (-80 °C).

Ανακαλλιέργεια από τα δείγματα που αποστάλησαν κάναμε σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, όπως XLD και SS agar. Όταν γίνει χρήση τους, για κάποια καλλιέργεια, τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο από την ανάποδη και με μισάνοιχτο καπάκι, για 15 λεπτά να στεγνώσουν καλά, για αποφυγή υγρασίας.

Χρησιμοποιούμε ολόκληρο το τρυβλίο για την επίστρωση, έτσι ώστε να γίνει καλή απομόνωση μιας μεμονωμένης αποικίας, από το δείγμα που μας στείλανε. Στην πρώτη επίστρωση, ενοφθαλμίζεται αρχικά το δείγμα στην άκρη του τρυβλίου. Τραβάμε γραμμές που καλύπτουν το ¼ του τρυβλίου, από το

σημείο 1 στο σημείο 2 για αραίωση του δείγματος και καλύτερη απομόνωση καθαρών αποικιών. Ο στείλεός ακουμπά πάντα το άγαρ. Προσέχουμε να μην πληγωθεί το θρεπτικό υλικό. Γυρνάμε το τρυβλίο 90° και χωρίς να ληφθεί άλλο δείγμα, περνάμε τον στείλεό από το σημείο 2 στο σημείο 3. Συνεχίζουμε από το σημείο που σταματήσαμε νωρίτερα την επίστρωση. Οι γραμμές που κάνουμε είναι λιγότερες και τα κύτταρα είναι λιγότερα. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, για ένα 24ωρο για να αναπτυχθούν οι αποικίες. Αν δεν έχουμε απομονώσει μια καθαρή αποικία, επαναλαμβάνουμε την διαδικασία σε άλλο τρυβλίο, έτσι ώστε να απομονώσουμε μία.

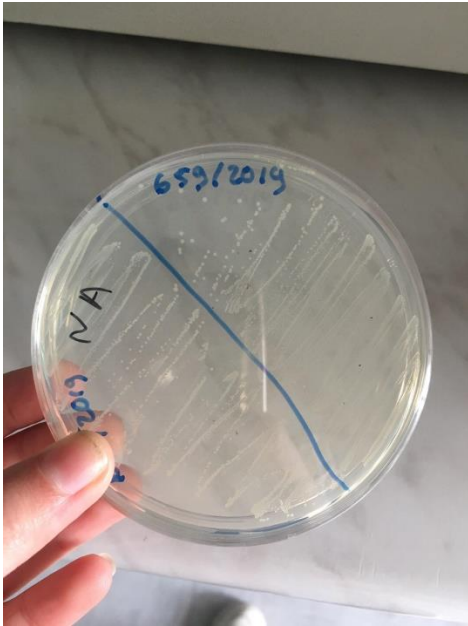
Πίνακας 12: Αρίθμηση δειγμάτων *Shigella spp.*

658/2019
659/2019
660/2019
661/2019
696/2019
697/2019
698/2019
699/2019
708/2019
744/2019
745/2019
746/2019
747/2019
748/2019
778/2019
779/2019
793/2019
794/2019

Κάναμε ανακαλλιέργειες σε 18 δείγματα από το Γενικό Νοσοκομείο Σάμου σε XLD και SS agar. Μετά την απομόνωση μιας καθαρής αποικίας, έγινε ανακαλλιέργεια σε Nutrient agar, έτσι ώστε να συνεχίζουμε σε περαιτέρω τυποποίηση των δειγμάτων. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία επίστρωσης και επώασης στον επωαστικό κλίβανο. Μετά την ανάπτυξη των αποικιών σε Nutrient agar, μπορούσε να γίνει διαδικασία τυποποίησης και φύλαξη των στελεχών σε βαθιά κατάψυξη. Για φύλαξη των δειγμάτων, τοποθετούνται μέσα σε cryovials 1ml θρεπτικό υλικό Brain heart Infusion Growth με γλυκερόλη 20%. Η γλυκερόλη είναι απαραίτητη για να προστατευτούν τα κύτταρα μέσα στην βαθιά κατάψυξη (-80 °C). Συλλέγουμε με ένα στυλαϊό πολλές αποικίες από το τρυβλίο και τις τοποθετούμε μέσα στα cryovials. Γίνεται καλή ανάμιξη με vortex και τοποθετούνται στην κατάψυξη.



Εικόνα 20: Ανακαλλιέργεια *Shigella spp.* σε SS agar



Εικόνα 21: Ανακαλλιέργεια *Shigella spp* σε Nutrient agar

3.2) Kligler- Τυποποίηση- Οροτυποποίηση

Από τις ανακαλλιέργειες που έχουμε σε Nutrient agar, μπορούμε να προχωρήσουμε σε τυποποίηση με Kligler και αντιβιογράμματα, καθώς επίσης και να απομονώσουμε DNA για να χρησιμοποιηθεί στην PCR και PFGE. Αρχικά πραγματοποιήσαμε τυποποίηση με θρεπτικό υλικό Kligler. Συλλέχθηκαν αποικίες με έναν στυλαίο από την ανακαλλιέργεια σε Nutrient agar. Τραβήχτηκε μια γραμμή ευθεία στην κεκλιμένη επιφάνεια του υλικού και μετά σε όλη την επιφάνεια πλάγιες γραμμές για να απλωθεί το βακτήριο καλά μέσα στο υλικό. Τέλος βουτήχτηκε ο στυλαίος μέχρι μέσα στο θρεπτικό υλικό. Αποστειρώνουμε καλά τον στυλαίο. Μετά την επίστρωση, το Kligler τοποθετείται μέσα στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες στους 37°C. Την επόμενη μέρα ελέγχεται για ανάπτυξη. Κοιτάμε τα βιοχημικά χαρακτηριστικά που μας έχει δώσει το υλικό. Αν παράγει γλυκόζη, λακτόζη, H₂S και αέριο. Μια τυπική εικόνα *Shigella* είναι μη ζύμωση λακτόζης, ζύμωση γλυκόζης, με αποτέλεσμα δημιουργίας κίτρινου πυθμένα με κόκκινη κεκλιμένη επιφάνεια. Παραγωγή υδρόθειου και αερίου δεν παρατηρείται. Έπειτα για την οροτυπία,

σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούμε μια σταγόνα φυσιολογικό ορό, μια σταγόνα αντιορό και ελέγχουμε για σιγκώλληση.



Εικόνα 22: Ανακαλλιέργεια *Shigella spp.* σε Kligler agar

3.3) Απομόνωση Γενετικού υλικού- Extraction DNA

Για να συνεχίσουμε περαιτέρω τυποποίηση με μοριακές μεθόδους, θα χρειαστούμε γενετικό υλικό από τα δείγματα. Από τις ανακαλλιέργειες που κάναμε στα δείγματα σε Nutrient agar, θα πάρουμε υλικό για να απομονώσουμε γενετικό υλικό. Αρχικά βάζουμε νερό για βρασμό. Προσέχουμε πολύ που ακουμπάμε στο χώρο, γίνεται χρήση γαντιών για αποφυγή επιμόλυνσης δείγματος. Με αποστειρωμένα eppendorf, τοποθετούμε 200 μl water for injection ή TE Buffer. Με ένα tip, εισάγουμε μέσα στο eppendorf 3-5 αποικίες από την ανακαλλιέργεια. Γίνεται καλή ανάμιξη με vortex. Ακολουθεί βρασμός για 15 λεπτά. Μετά τον βρασμό, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 10.000 στροφές. Με τον βρασμό σπάει το κύτταρο. Μετά τη φυγοκέντρηση συλλέγουμε το εναιώρημα που περιέχει το γενετικό υλικό. Το ίζημα περιέχει ακαθαρσίες και το απορρίπτουμε. Έπειτα φύλαξη του DNA μπορεί να γίνει στους -20 °C.

3.4) Αντιβιογράμματα

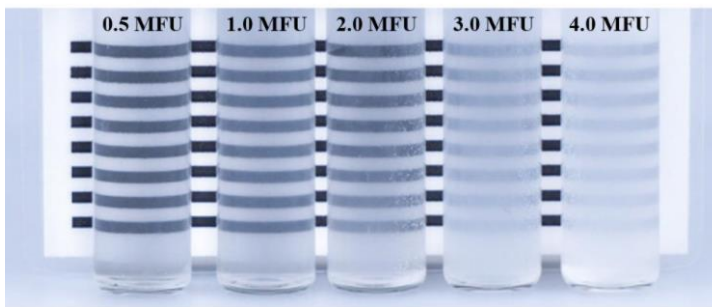
Ο έλεγχος αντοχής στα αντιβιοτικά έγινε με τη μέθοδο Διάχυσης Δίσκων Αντιβιοτικών σε άγαρ (Disk Diffusion Method κατά Kirby Bauer) και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε βάσει EUCAST (European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) Για να ξεκινήσουμε τα αντιβιογραμμάτα ελέγχουμε πρώτα για σωστή λειτουργία των αντιβιοτικών, που πρόκειται να χρησιμοποιήσουμε. Αυτό μπορεί να γίνει με μια πρότυπη καλλιέργεια, όπου σε ένα αντιβιογράμμα της, περιμένουμε συγκεκριμένες τιμές ζώνης αναστολής σε κάθε αντιβιοτικό. Χρησιμοποιήσαμε το *E. coli* ATCC 25922. Καλλιεργούμε σε McConkey και έπειτα ανακαλλιέργεια σε Nutrient agar. Αφού πάρουμε καθαρές αποικίες στο Nutrient agar, ακολουθεί η διαδικασία του αντιβιογράμματος.



Εικόνα 23: Καλλιέργεια *E.coli* ATCC 25922 σε MacConkey agar

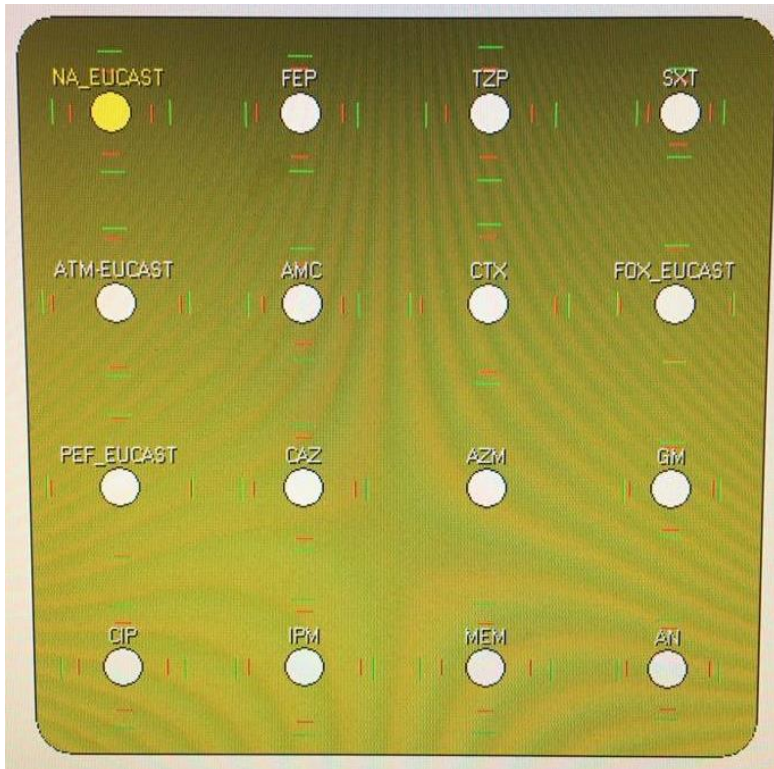
Φτιάχνουμε εναιώρημα φυσιολογικού ορού με αποικίες του μικροβίου σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα. Γίνεται καλή ανάδευση με Vortex και ακολουθεί έλεγχος της θολερότητας του δείγματος με τη μέθοδο MacFarland. Θέλουμε η θολερότητα να είναι στο 0,5, μετρημένη με θολοσίμετρο. Σε περίπτωση θολερότητας >0.5 αραιώνουμε με φυσιολογικό ορό, ενώ σε περίπτωση θολερότητας <0.5 , προσθέτουμε περισσότερες αποικίες με βαμβακοφόρο στυλαίο.

McFarland Standards



Εικόνα 24: Κλίμακα McFarland, για την εκτίμηση της θολερότητας του εναιωρήματος. Η επιθυμητή κλίμακα για την δημιουργία αντιβιογραμμάτων είναι το 0,5. (notes)

Για τα αντιβιογράμματα χρησιμοποιείται το Muller Hinton ως θρεπτικό υλικό. Αφήνουμε το τρυβλίο μέσα στον κλίβανο δεκαπέντε λεπτά για αποφυγή υγρασίας. Έπειτα γίνεται καλή, ομοιόμορφη επίστρωση και στις 4 κατευθύνσεις με το εναιώρημα που έχουμε φτιάξει και την χρήση βαμβakoφόρου στυλαιού. Στο αντιβιογράμμα χρησιμοποιήσαμε ναλιδιξικό οξύ (Na), κεφεπίμη (Fer), ταζομπακτάμη (TZP), σουλφομεθοξαζόλη (SXT), Αστρονάμη (ATM), αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC), Κεφοταξίμη (CTX), Κεφοξιτίν (FOX), πεφλοξασίν (PEFL), κεφταζιδίμη (CAZ), ιμιπενέμη (IPM), μεροπενέμη (MEM), αμικασίνη (AN/AK).



Εικόνα 25: Plate αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη αντιβιογραμμάτων στα δείγματα από *Shigella*. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν: ναλιδιξικό οξύ (Na), κεφεπίμη (Fep), ταζομπακτάμη (TZP), σουλφομεθοξαζόλη (SXT), Αστρονάμη (ATM), αμιξυκιλίνη-κλαβουλανικό (AMC), Κεφοταξίμη (CTX), Κεφοξιτίν (FOX), πεφλοξασίν (PEFL), κεφταζιδιμη (CAZ), ιμιπενέμη (IPM), μεροπενέμη (MEM), αμικασίνη (AN/AK).

Γίναν αντιβιογράμματα και για τα 18 δείγματα, για έλεγχο αντοχής στα αντιβιοτικά, για προσδιορισμό μηχανισμών αντοχής, για παρουσία γονιδίων CTX-M β λακταμάσων και συνέργεια ESBL.

Σε ένα δείγμα έγινε και μελέτη, για μηχανισμό αντοχής AmpC. Έγινε το τεστ Κεφοτετάνης CTT. Έγινε επίστρωση του στελέχους σε θρεπτικό υλικό Muller-Hinton, τοποθετήθηκαν δισκία κεφοτετάνης και κεφοξιτίνης (FOX). Έγινε προσθήκη 20μl φαινυλ-βορικού οξέος πάνω στο δισκίο κεφοτετάνης. Το φαινυλ-βορικό οξύ αναστέλλει τον AmpC μηχανισμό.

3.5) Μοριακή Ανίχνευση με τη Μέθοδο PCR- Ηλεκτροφόρηση

Με την μέθοδο της PCR, έγινε ανίχνευση για γονίδια CTX-M β-λακταμασών. Χρησιμοποιήσαμε πρωτόκολλο για multiplex PCR, για ανίχνευση αλληλίων bla_{ctx-m}. Χρησιμοποιήσαμε primers για τα CTX-M group 1,2,9. Τα ζευγάρια των primers F και R είναι:

- GROUP 1: 5'-AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC-3'(F) και 5'-AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT-3' (R) (415 bp)
 - GROUP 2: 5'- CGA CGC TAC CCC TGC TAT T-3' (F) 5'-CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG-3' (R) (552 bp)
 - GROUP 9: 5'CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG-3' (F) 5'-ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC-3' (R) (205 bp)
- (Woodford, et al., 2005)

Πίνακας 13: Πρωτόκολλο PCR, Ποσότητες αντιδραστηρίων για ένα δείγμα και για 22 δείγματα.

	λ/δείγμα	λ/ 22 δείγματα
DNA	3	3
MgCl ₂ (1,5mM) + Buffer (1M)	2,5	55
dNTPs 0,2 mM	0.5	11
Primer 1F 10Mμ (cluster 1)	1	22
Primer 1R 10μM (cluster 1)	1	22
Primer 2F 10μM (cluster 2)	1	22
Primer 2R 10μM (cluster 2)	1	22
Primer 9F 10μM (cluster 9)	1	22
Primer 9R 10μM (cluster 9)	1	22
Taq 5U/λ (Dream Taq)	0.2	4,4
Νερό	12.8	344,6
Τελικός όγκος	25	550

Στον παραπάνω πίνακα φαίνονται οι ποσότητες αντιδραστηρίων για ένα δείγμα. Πολλαπλασιάζουμε τις ποσότητες επί τον αριθμό των δειγμάτων, 18 στην προκειμένη περίπτωση έτσι ώστε να είναι αρκετό το μίγμα για τα δείγματα. Επιπλέον προσθέτουμε θετικό και αρνητικό μάρτηρα για κάθε

group. Συνολικά έχουμε 22 δείγματα, 18 που θέλουμε να μελετήσουμε, 3 θετικούς μάρτηρες και έναν αρνητικό. Στην 3^η στήλη φαίνεται η ποσότητα των αντιδραστηρίων για τα 22 δείγματα.

Αφού φτιάξουμε το Master Mix με όλα τα αντιδραστήρια, τελευταία προστίθεται η Dream Taq πολυμεράση, επειδή είναι θερμοευαίσθητη. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο PCR, πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά γι' αυτήν, να αποστειρώνονται για να αποφευχθούν επιμολύνσεις. Αφού έχουμε έτοιμο το Master Mix, διαμοιράζουμε σε μικρά PCR eppendorf, προσθέτουμε DNA και τα δείγματα είναι έτοιμα για να εισαχθούν στον θερμό κυκλοποιητή. Τοποθετούνται μέσα στο μηχάνημα της PCR και ρυθμίζουμε τις συνθήκες για να κυκλοποιηθεί το DNA.

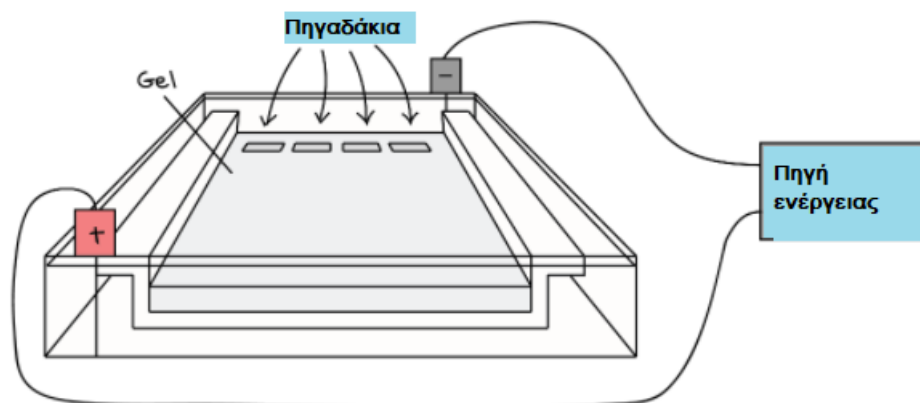
Πίνακας 14: Συνθήκες κυκλοποίησης PCR (Woodford, και συν., 2005)

Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
5 min	94 °C	
25 sec	94 °C	30
40 sec	52 °C	30
50 sec	72 °C	30
6 min	72 °C	

Αφού ολοκληρωθεί η υβριδοποίηση του DNA, ακολουθεί η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης, που μας επιτρέπει τον διαχωρισμό θραυσμάτων μακρομορίων, με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους. Με βάση του μεγέθους και του φορτίου τους τα μόρια μετακινούνται μέσω του πυκτώματος σε διαφορετικές κατευθύνσεις και ταχύτητες. (Academy) Αρχικά παρασκευάζουμε αγαρόζη για την ηλεκτροφόρηση μας. Χρειαζόμαστε αγαρόζη 2%. Για 50ml TBE θέλουμε 1gr αγαρόζη. Διαλύουμε την αγαρόζη μέσα στο TBE, την βάζουμε να βράσει. Μόλις παρατηρήσουμε ότι βράζει, την απομακρύνουμε από το μάτι και την αφήνουμε λίγο να κρυώσει. Την ελέγχουμε συνεχώς για να μην πήξει μέσα στην κωνική φυάλη. Μόλις κρυώσει λίγο, προσθέτουμε 3ml xpert Green DNA stain. Φτιάχνουμε την φόρμα του gel.

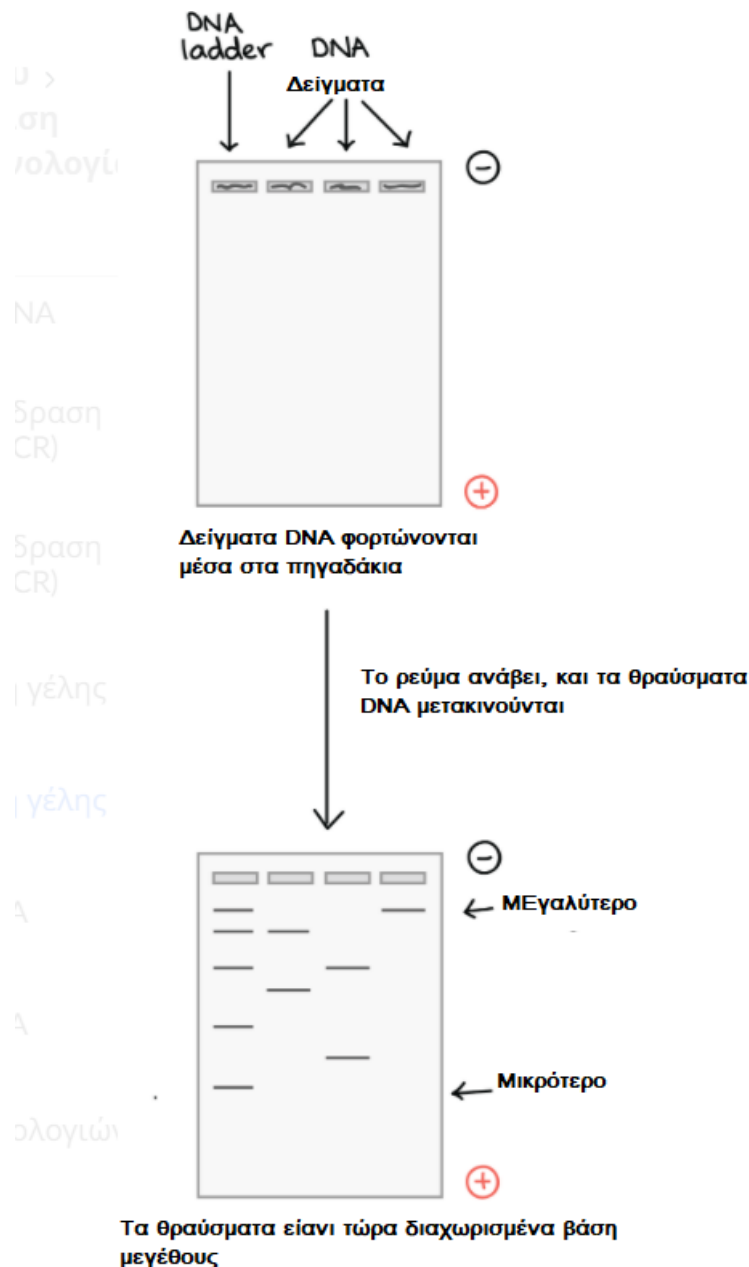
Τοποθετούμε τα χτένια και έπειτα προσθέτουμε την αгарόζη και την αφήνουμε να πήξει.

Αφού πήξει προσέχουμε πως θα την βγάλουμε από την φόρμα για να μην σπάσουν τα πηγαδάκια, και την τοποθετούμε μέσα στο μηχάνημα της ηλεκτροφόρησης. Όταν τελειώσει ο κυκλοποιητής και βγάλουμε τα δείγματα, προσθέτουμε σε όλα 2μl loading Buffer. Κάνουμε καλή ανάδευση με την πιπέττα και προσθέτουμε 8μl από το δείγμα μέσα σε κάθε πηγαδάκι, προσεκτικά να τοποθετηθεί το δείγμα μέσα στο πηγαδάκι, να μην το τρυπήσουμε και να μην βγει όλο το δείγμα εκτός. Επίσης στο gel προσθέτουμε 2μl ladder με 2μl loading buffer, για να έχουμε γνωστά μήκη κύματος. Δεν ξεχνάμε να προσθέσουμε θετικούς και αρνητικούς μάρτηρες, για σύγκριση με τα προς εξέταση δείγματα.



Εικόνα 26: Σύστημα ηλεκτροφόρησης (Academy)

Μετά την φόρτωση των δειγμάτων στο gel ηλεκτροφόρησης, κλείνουμε το μηχάνημα, ενώνουμε τον θετικό και αρνητικό πόλο για να περάσει το ρεύμα. Ελέγχουμε πάντα την φορά του ρεύματος, τα πηγαδάκια να είναι στον αρνητικό πόλο. Μόλις τρέξουν αρκετά τα δείγματα, τοποθετούμε την αгарόζη σε UV ακτινοβολία για να δούμε το αποτέλεσμα και συγκρίνουμε με μάρτηρες και ladder.



Εικόνα 27: Μέθοδος ηλεκτροφόρησης γενετικού υλικού (Academy)

3.6) Μέθοδος PFGE

Χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της PFGE για να ελέγξουμε το μοριακό αποτύπωμα DNA κάθε δείγματος. Ακολουθήσαμε την μέθοδο με βάση το Πρωτόκολλο “Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*”. (CDC, 2017) Στη μέθοδο χρησιμοποιήσαμε τα δείγματα που διαπιστώσαμε ότι είναι *Shigella flexneri* 1b.

Πίνακας 15: Δείγματα *Shigella flexneri* 1b, που μελετήθηκαν με την μέθοδο PFGE

659/2019
660/2019
661/2019
696/2019
697/2019
698/2019
699/2019
708/2019
794/2019
745/2019
747/2019
748/2019
778/2019
793/2019

Η διαδικασία της PFGE θέλει 5 μέρες για να ολοκληρωθεί. Αρχικά την πρώτη μέρα καλλιεργούμε τα στελέχη μας σε XLD. Επιπλέον καλλιεργούμε το βακτήριο *Salmonella Braenderup*, όπου θα αποτελέσει το μάρτυρα-δείγμα προς σύγκριση με τα προς εξέταση δείγματα. Αφήνουμε στον κλίβανο, στους 37°C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα κάνουμε ανακαλλιέργεια σε *Nutrient agar*, και τοποθετούμε πάλι τα τρυβλία για 24 ώρες στον κλίβανο για επώαση.



Εικόνα 28: Καλλιέργεια *Salmonella braenderup* σε XLD

Την Τρίτη μέρα, φτιάχνουμε παρασκευάζουμε τα TE Buffer και Seakem Gold agarose (SKG). Για το TE Buffer προσθέτουμε 10ml Tris (1M), 2 ml EDTA (0,5M) και προσθέτουμε ως τα 1000ml Ultrapure Clinical Laboratory Reagent Water (CLRW). Το TE buffer χρειάζεται για να φτιάξουμε τα plugs και για την λύση. Για 1% Seakem Gold agarose, προσθέτουμε 50ml TE buffer και 0,5gr SKG. Βάζουμε την αгарόζη να βράσει και την τοποθετούμε σε μικρά μπουκαλάκια, έτσι ώστε κάθε φορά να χρησιμοποιούμε και από ένα, με μια θέρμανση της. Μόλις βράζει, την βγαζουμε από το μάτι να ηρεμήσει και την επανατοποθετούμε πάλι πάνω για βρασμό. Κάνουμε αυτή τη διαδικασία δέκα φορές έως ότου είναι έτοιμη. Η αгарόζη τοποθετείται μέσα στο υδατόλουτρο για να παραμένει σε υγρή μορφή, μέχρι να χρησιμοποιηθεί γιατί πήζει πολύ γρήγορα.

Φτιάχνουμε πυκνά εναιωρήματα των υπο εξέταση δειγμάτων με το Cell Suspension Buffer (CSB). Παίρνουμε με βαμβακοφόρο συλαιοί αρκετή ποσότητα αποικιών και τοποθετούνται μέσα στο CSB. Ανακατεύουμε με Vortex και φωτομετρούμε στα 610nm. Θέλουμε η οπτική πυκνότητα σε κάθε δείγμα να κυμαίνεται μεταξύ 0,8-1.

Για να φτιάξουμε τα plugs, τοποθετούμε 200μl εναιωρημάτων σε erpendorf. Προσθέτουμε 10 μl Πρωτεϊνάση K και 200 μl SKG. Δεν πιπετάρουμε υπερβολικά, για να μην γίνει διάτμηση του DNA. Διαμοιράζουμε

γρήγορα σε επαναχρησιμοποιούμενες φόρμες για plugs, το διάλυμα μας, πριν πήξει. Φτιάχνουμε 2 plugs για κάθε δείγμα. Αφήνουμε έπειτα τα plugs να πήξουν για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή για 5 λεπτά στο ψυγείο στους 4°C.

Για την λύση του DNA στα plugs , αρχικά παρασκευάζουμε το Cell Lysis Buffer (CLB) 200ml, με 10ml Tris, 20 ml EDTA και 20ml Sarcosyl και προσθέτουμε απεσταγμένο νερό ως τα 200ml. Σε tubes βάζουμε τα plugs που φτιάξαμε, προσθέτουμε 5ml CLB και 25μl Πρωτεΐνάση K. Ελέγχουμε τα plugs να είναι μέσα στα αντιδραστήρια και να μην έχουν μείνει στα τοιχώματα των tubes. Τα βάζουμε μέσα στο υδατόλουτρο για όλο το βράδυ. Το DNA έτσι είναι ελεύθερο μέσα στην αгарόζη.

Μετά την λύση, εκτελούμε 6 πλύσεις. Οι δύο γίνονται με 4ml απεσταγμένο νερό και οι άλλες τέσσερις με 4ml TE Buffer. Τα βάζουμε να ανακατεύονται για 15 λεπτά μέσα σε κλίβανο, την κάθε πλύση.

Από τα δυο plugs που έχουμε χρησιμοποιούμε μικρό τμήμα για να κάνουμε την ανάλυση. Τα υπολοιπα διατηρούνται σε TE Buffer για επόμενη ανάλυση. Τα τμήματα από τα plugs πέπτονται με δύο ένζυμα κατάλληλα για την *Shigella flexneri*, τα XbaI ως πρωταρχικό και το NotI ως δευτερεύον. Τα πόσα δείγματα από την *S. Braunderup* θα χρησιμοποιήσουμε εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων. Βάζουμε στις άκρες και στην μέση των δειγμάτων στην αгарόζη που θα φτιάξουμε. Φτιάχνουμε διάλυμα για Pre-cut πέψη.

Πίνακας 16: Διάλυμα για Pre-cut πέψη

	1 Δείγμα	*15	
dH ₂ O	20μl		2700 μl
Buffer	180μl		300 μl
XBaI	-		-
Σύνολο	200μl		3000μl

Τοποθετούμε τα plugs σε τρυβλίο petri, κόβουμε 2-2,5mm από κάθε δείγμα. Τοποθετούμε αυτά τα κομμάτια σε eppendorf με 200μl diluted

restriction buffer (1X). Τα τοποθετούμε στο υδατόλουτρο στους 37°C για 5-10 λεπτά ή σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά. Μετά αφαιρούμε το buffer με μία πιπέττα. Προσέχουμε να μην καταστρέψουμε τα πηγαδάκια. Ετοιμάζουμε το διάλυμα για την πέψη στη συνέχεια.

Πίνακας 17: Διάλυμα για πέψη

		*15	
dH ₂ O	175μl		2625μl
Buffer	20μl		300μl
XBal	5μl (10U/μl)		75μl
Σύνολο	200μl		3000μl

Βάζουμε σε κάθε σωλήνα 200μl από το διάλυμα που φτιάξαμε, κλείνουμε και ανακατεύουμε ελαφρώς, ελέγχοντας να είναι τα plugs μέσα στο διάλυμα. Τα βάζουμε στο υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες.

Για να φτιάξουμε την αгарόζη για να φορτωθούν τα δείγματα ακολουθούμε την ίδια διαδικασία για την SKG. Αφού είναι έτοιμη την τοποθετούμε σε φόρμα και βάζουμε το χτένι για να βγουν τα plugs. Αφήνουμε να πήξει. Μόλις περάσουν δύο ώρες με τα δείγματα στο υδατόλουτρο, αφαιρούμε το διάλυμα με το ένζυμο και βάζουμε πάλι μέσα 200μl TBE. Αφήνουμε 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε τα plugs από τους σωλήνες, και τα τοποθετούμε μέσα στα πηγαδάκια του gel. Στις άκρες και ενδιάμεσα τοποθετούμε δείγμα της *S. Braunderup*. Τοποθετούμε προσεκτικά την αгарόζη μέσα στον μηχανήμα της PFGE.

Οι συνθήκες που θέσαμε στο μηχανήμα ήταν:

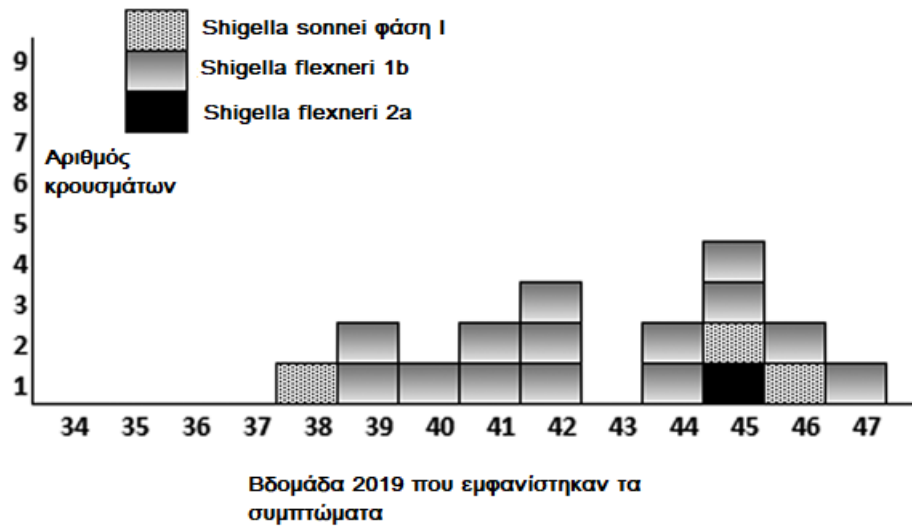
- Αρχικός χρόνος: 5 sec
- Τελικός χρόνος: 35 sec
- Start ratio: 1.0
- Volt: 200V
- Χρόνος τρέξιμου μεθόδου: 20 ώρες

4. Αποτελέσματα

Όπως αναφέρθηκε απομονώθηκαν 18 δείγματα *Shigella spp.* Αυτά τυποποιήθηκαν ως: 14 *Sh. flexneri 1b*, 1 *Sh. flexneri 2a*, 3 *S. sonnei* φάση I.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα τυποποίησης βακτηρίων *Shigella spp.*

Δείγματα	<i>S. flexneri 2a</i>	<i>S. flexneri 1b</i>	<i>S. sonnei</i> (I)
659/2019		√	
660/2019		√	
661/2019		√	
696/2019		√	
697/2019		√	
698/2019		√	
699/2019		√	
708/2019		√	
745/2019		√	
743/2019			√
744/2019	√		
746/2019			√
747/2019		√	
748/2019		√	
778/2019		√	
779/2019			√
793/2019		√	
794/2019		√	



Γράφημα 9: Κατανομή εργαστηριακών επιβεβαιωμένων κρουσμάτων σιγκέλλωσης στους πρόσφυγες/μετανάστες στο κέντρο φιλοξενίας στην Σάμο, ανά βδομάδα έναρξης των κρουσμάτων, Ελλάδα, Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2019 (n=18) (Public health and clinical implicationsof multidrug-resistant shigellosis cases in a reception centre for refugees/ migrants, Greece, October-December 2019, 2020)

Αφού βρέθηκαν οι ορότυποι των καλλιεργημάτων έγιναν τα αντιβιογράμματα.

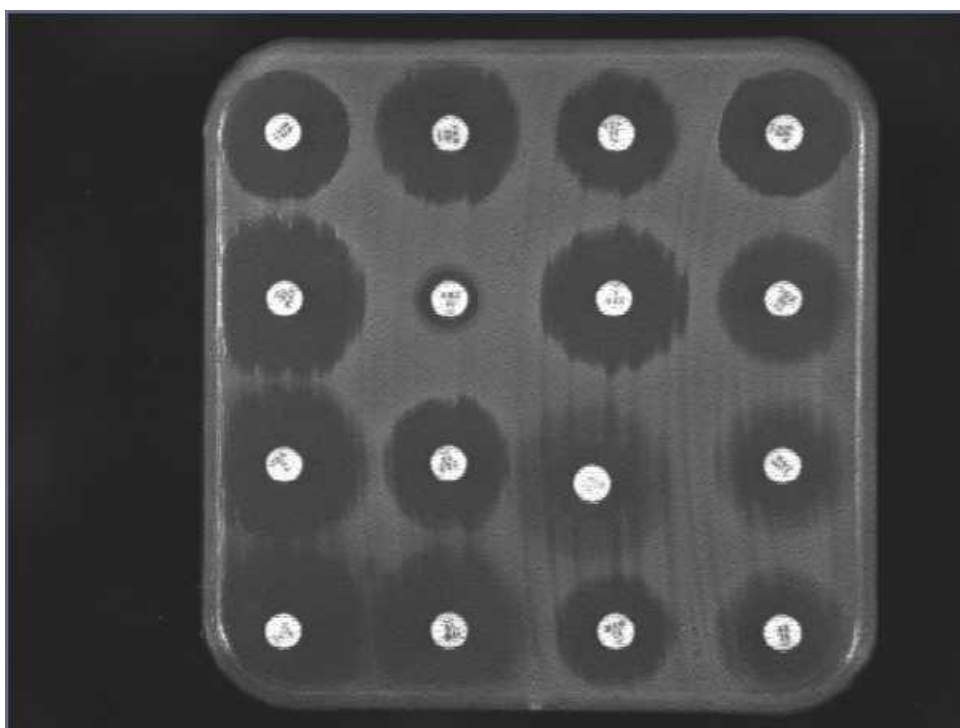
Πίνακας 19: Διάμετροι ζωνών αναστολής στα αντιβιοτικά, σε κάθε στέλεχος που μελετάμε, καθώς και ο χαρακτηρισμός του στελέχους ως ευαίσθητο (S) , μετρίως ευαίσθητο (I) και ανθεκτικό (R) σε κάθε αντιβιοτικό.

Δείγματα	Ορότυπος	AMC	Na	FEP	TZP	SXT	ATM	CTX	FOX	PEFL	CAZ	AZM	GM	Cip	IPM	AN	MEM
658/2019	Sh. sonnei S(I)	S (21)	S (21)	S (24)	S (25)	S (17)	-	R (16)	S (27)	S (28)	S (24)	S (15)	S (16)	S (25)	S (25)	S (30)	S (31)
659/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	S (25)	I (17)	S (21)	R (6)	-	R (6)	S (25)	R (21)	R (15)	S (21)	S (19)	S (26)	S (35)	S (22)	S (32)
660/2019	Sh. flexneri 1b	I (15)	S (22)	I (17)	S (21)	R (6)	-	R (7)	S (22)	R (18)	I (18)	S (19)	S (19)	S (25)	S (30)	S (19)	S (30)
661/2019	Sh. flexneri 1b	R (13)	S (22)	R (11)	I (17)	R (6)	-	R (6)	S (20)	R (20)	R (11)	S (22)	S (19)	S (23)	S (30)	S (18)	S (30)
696/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	S (23)	S (18)	S (21)	R (6)	-	R (6)	S (27)	R (21)	R (17)	S (17)	S (17)	S (27)	S (32)	S (19)	S (31)
697/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	S (20)	I (17)	S (22)	R (6)	-	R (6)	S (27)	R (20)	R (14)	S (20)	S (18)	S (25)	S (30)	S (20)	S (32)
698/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	S (19)	I (15)	I (18)	R (6)	R (12)	R (6)	R (18)	R (17)	R (14)	S (17)	S (17)	S (22)	S (28)	I (16)	S (33)
699/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	I (16)	I (17)	S (23)	R (6)	R (19)	R (12)	S (20)	R (17)	I (19)	-	S (17)	S (21)	S (30)	S (19)	S (30)
708/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	I (16)	S (19)	S (22)	R (6)	R (14)	R (11)	S (20)	R (17)	R (16)	S (18)	S (19)	S (24)	S (29)	S (17)	S (31)
744/2019	Sh. flexneri 2a	R (6)	S (20)	S (20)	I (20)	R (6)	S (26)	I (17)	R (6)	R (21)	R (16)	R (6)	S (17)	S (25)	S (24)	I (16)	S (30)
745/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	I (16)	R (6)	I (16)	R (6)	R (8)	R (6)	S (20)	R (17)	R (14)	-	S (17)	I (19)	S (29)	S (17)	S (30)
746/2019	Sh. sonnei S(I)	S (23)	R (6)	S (20)	S (30)	R (6)	S (25)	R (12)	S (26)	R (15)	S (24)	R (7)	S (22)	S (23)	S (30)	S (20)	S (30)
747/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	S (20)	I (15)	I (19)	R (6)	R (8)	R (6)	S (27)	R (17)	R (11)	S (17)	S (17)	S (21)	S (32)	I (16)	S (31)
748/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	S (19)	I (15)	I (17)	R (6)	R (8)	R (8)	S (27)	R (16)	R (14)	S (20)	S (22)	I (19)	S (30)	I (16)	S (32)
778/2019	Sh. flexneri 1b	I (16)	S (24)	R (14)	S (21)	R (6)	R (19)	R (7)	S (23)	R (23)	R (14)	S (18)	S (17)	S (26)	S (30)	S (26)	S (30)
779/2019	Sh. sonnei S(I)	S (20)	S (21)	S (23)	S (22)	S (14)	-	R (10)	S (22)	S (24)	S (23)	S (17)	S (17)	S (24)	S (26)	S (18)	S (32)
793/2019	Sh. flexneri 1b	I (14)	S (20)	I (15)	I (18)	R (6)	R (8)	R (6)	S (22)	R (19)	R (13)	S (18)	S (16)	I (20)	S (28)	I (16)	S (30)
794/2019	Sh. flexneri 1b	R (6)	S (19)	R (13)	I (18)	R (6)	-	R (6)	S (25)	R (19)	R (10)	S (19)	S (17)	I (20)	S (28)	S (17)	S (31)

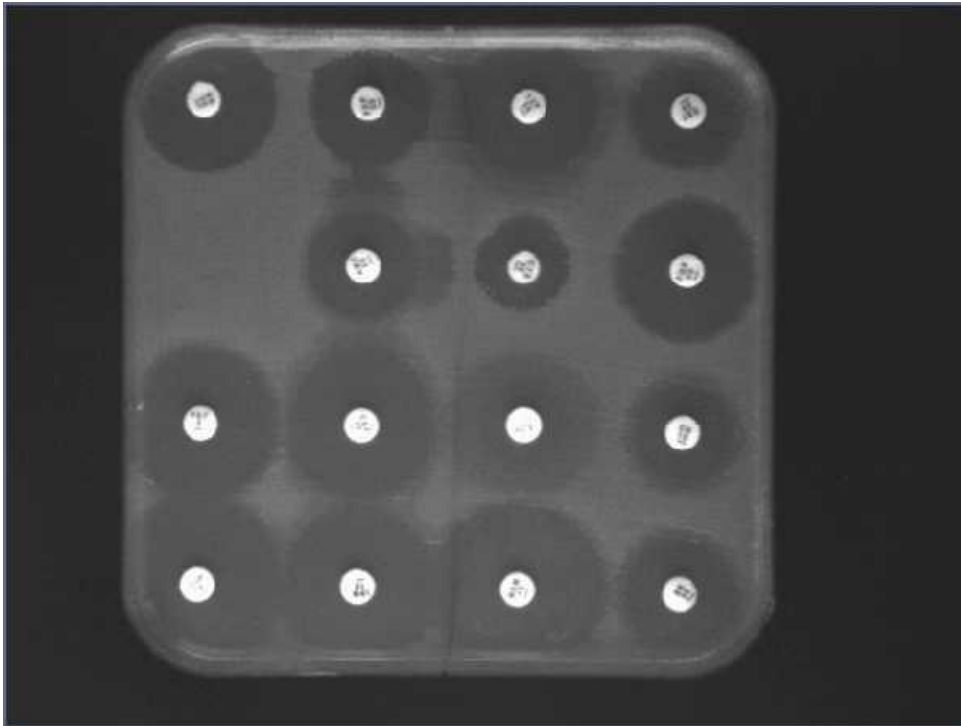
Παρατηρήθηκε ότι τα *Sh. flexneri 1b* ήταν ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς όπως, κεφταζιδίμη (ceftazidime-CAZ) και κεφοταξίμη (cefotaxime- CTX). Επίσης εμφάνιζαν αντοχή σε αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ (amoxicillin-clavulanic acid- AMC) και σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη (sulfamethoxazole-trimethoprim SXT). Όλα τα στελέχη εκτός του *Sh. flexneri 2a*, παρουσιάζουν ευαισθησία, με ζώνη αναστολής μεγαλύτερη από 12 mm για την αζιθρομικίνη AZM. (MIC), ενώ όλα τα στελέχη, εκτός από ένα *Sh. sonnei S (I)* είναι ανθεκτικά σε φθοροκινολόνες, πεφλοξασίνη (pefloxacin-PEFL). Τα στελέχη *Sh. sonnei S (I)* παρουσίαζαν ευαισθησία σε κεφταζιδίμη (ceftazidime-CAZ) και σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη (sulfamethoxazole-trimethoprim SXT).

Από τα αντιβιογράμματα παρατηρήθηκε συνέργεια DDST (+) θετική σε 9 στελέχη, ανάμεσα στους αναστολείς και τα γύρω αντιβιοτικά κεφαλοσπορινών. Θετική θεωρείται η δοκιμασία όταν αυξάνεται η ζώνη αναστολής του αντιβιοτικού προς τον αναστολέα. Συγκεκριμένα στο δείγμα 658/2019 (Εικ.30) παρατηρείται συνέργεια μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό με την κεφεπίμη. Στο δείγμα 660/2019 (Εικ.32) παρατηρείται συνέργεια μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό με την κεφεπίμη, κλαβουλανικό με κεφοταξίμη και κλαβουλανικό με κεφταζιδίμη. Στο δείγμα 661/2019 (Εικ.33) παρατηρείται συνέργεια μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό με την κεφεπίμη, κλαβουλανικό με κεφοταξίμη, κλαβουλανικό με κεφταζιδίμη και κεφεπίμη με αναστολέα ταζομπακτάμη. Στο δείγμα 696/2019 (Εικ.34) παρατηρείται συνέργεια μεταξύ του αναστολέα ταζομπακτάμη με κεφεπίμη. Στο δείγμα 697/2019 (Εικ.35) παρατηρείται συνέργεια μεταξύ του αναστολέα ταζομπακτάμη με την κεφεπίμη. Στο δείγμα 708/2019 (Εικ.37) παρατηρείται συνέργεια μεταξύ του αναστολέα ταζομπακτάμη με κεφοταξίμη και κεφεπίμη. Στο δείγμα 746/2019 (Εικ.40) παρατηρείται συνέργεια μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό με την κεφεπίμη, κεφοταξίμη και κεφταζιδίμη και επιπλέον αναστολέας ταζομπακτάμη με κεφεπίμη και κεφοταξίμη. Στο δείγμα 778/2019 (Εικ.43) παρατηρείται συνέργεια μεταξύ του αναστολέα ταζομπακτάμη με κεφοταξίμη και κεφεπίμη. Στο δείγμα 779/2019 (Εικ.44) παρατηρείται συνέργεια μεταξύ

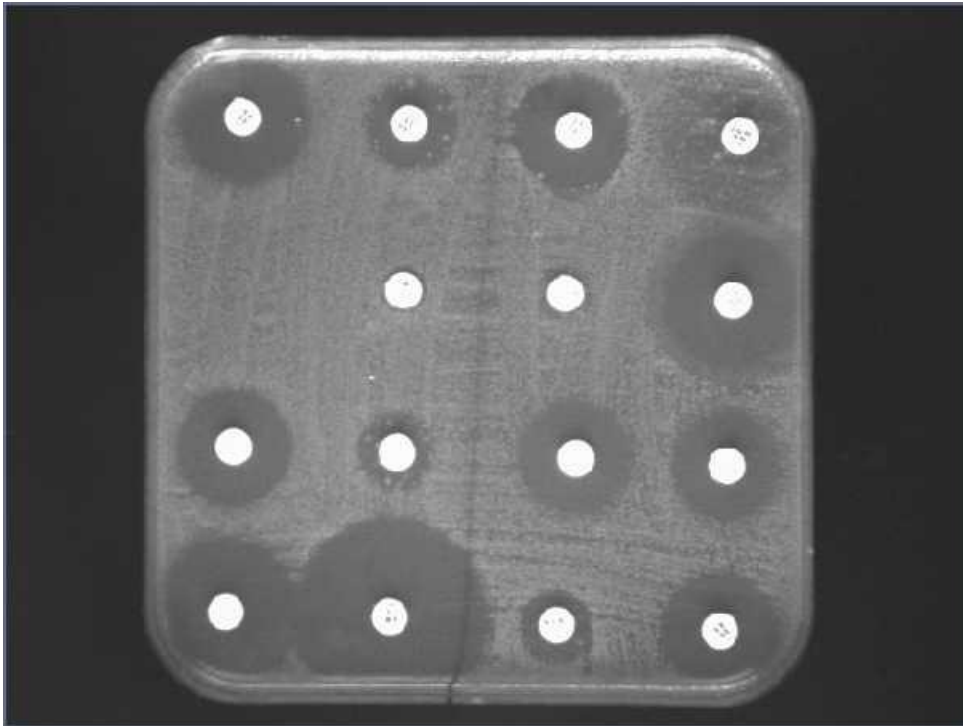
του αναστολέα κλαβουλανικό με την κεφεπίμη, κεφοταξίμη και κεφαζιδίμη και επιπλέον αναστολέας ταζομπακτάμη με κεφεπίμη και κεφοταξίμη.



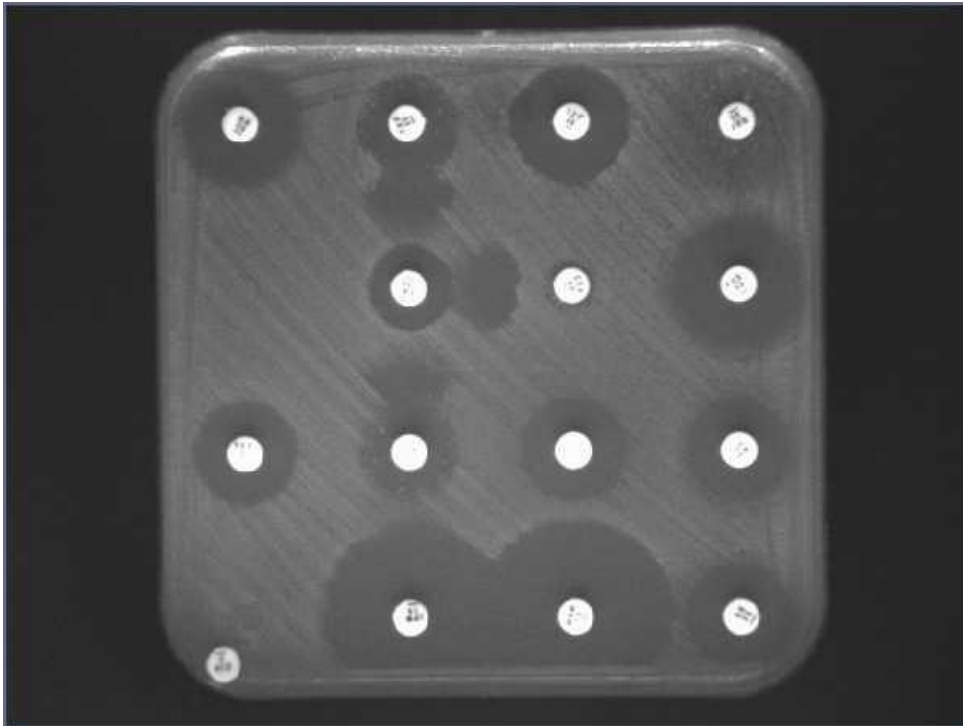
Εικόνα 29: Εικόνα αντιβιογράματος για το E. coli ATCC 25922. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Έλεγχος για σωστή λειτουργία των αντιβιοτικών μας δίσκων. Σύγκριση ζωνών αναστολής με τις τιμές που έχουν δωθεί για το πρότυπο βακτήριο. Πρόβλημα με τους αντιβιοτικούς δίσκους MEM και AMC. Έγινε αλλαγή του αντιβιοτικού δίσκου AMC.



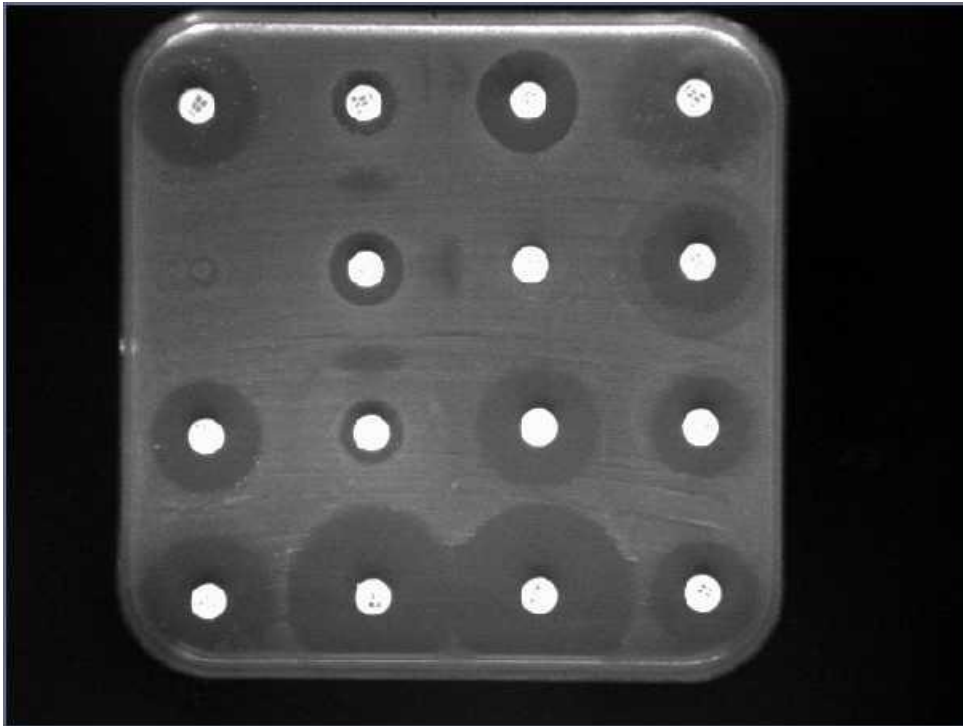
Εικόνα 30: Αντιβιογράμμα Δείγματος 658/2019 με ορότυπο *Sh. sonnei*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Εδώ έχει γίνει και αλλαγή του αντιβιοτικού δίσκου MEM. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στο κεφοταξίμη (CTX). Όπως φαίνεται εδώ η αμοξικιλίνη- κλαβουλανικό αναστέλλει την αντοχή [έχει συνέργεια (DDST+)] με την κεφεπίμη (FEP). Επίσης υπάρχει μια συνέργεια μεταξύ αναστολέα κλαβουλανικό με την κεφοταξίμη, παρ'όλα αυτά είναι ανθεκτικό σε αυτό το αντιβιοτικό το βακτήριο. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για μηχανισμό CTX-M.



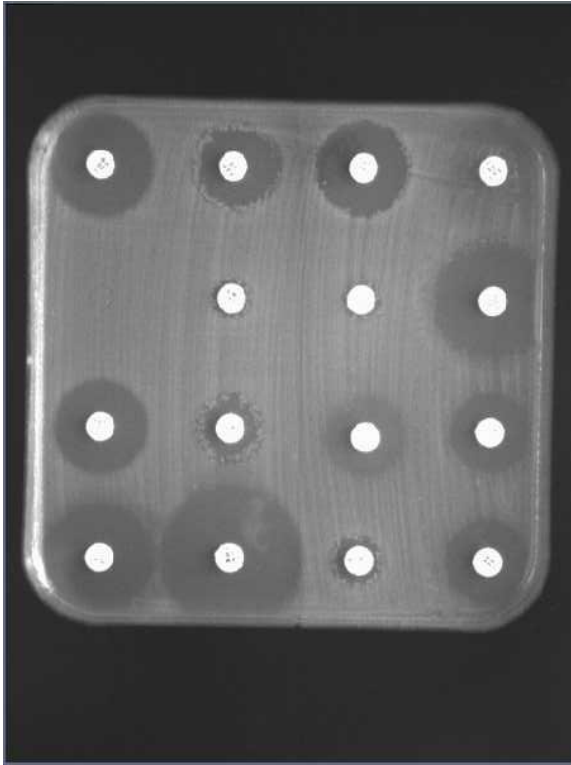
Εικόνα 31: Αντιβιογράμμα Δείγματος 659/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στο κεφοταξίμη (CTX), στην αμοξικιλίνη- κλαβουλανικό (AMC), σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδικμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται μια πολύ μικρή συνέργεια μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό και κεφεπίμης. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.



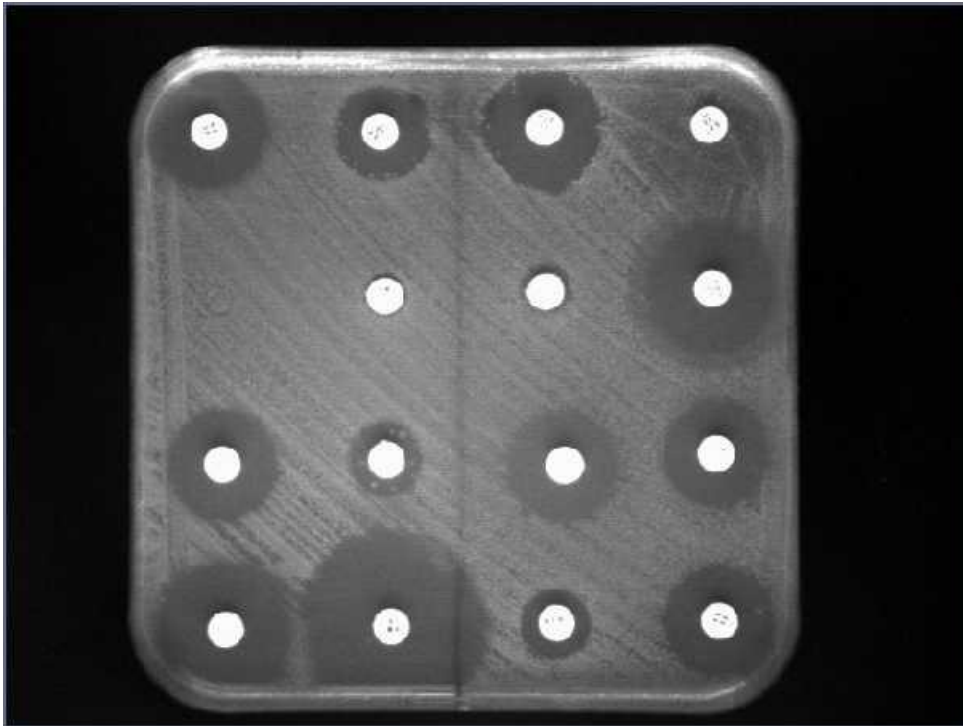
Εικόνα 32: Αντιβιογράμμα Δείγματος 660/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fep, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στο κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό και κεφεπίμης, με την FEP να είναι μετρίως Ευαίσθητη , αναστολέα κλαβουλανικό με CTX, με την κεφοταξίμη να παραμένει ανθεκτική και αναστολέα κλαβουλανικό με CAZ, με την κεφταζιδιμη να είναι μετρίως ευαίσθητη. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.



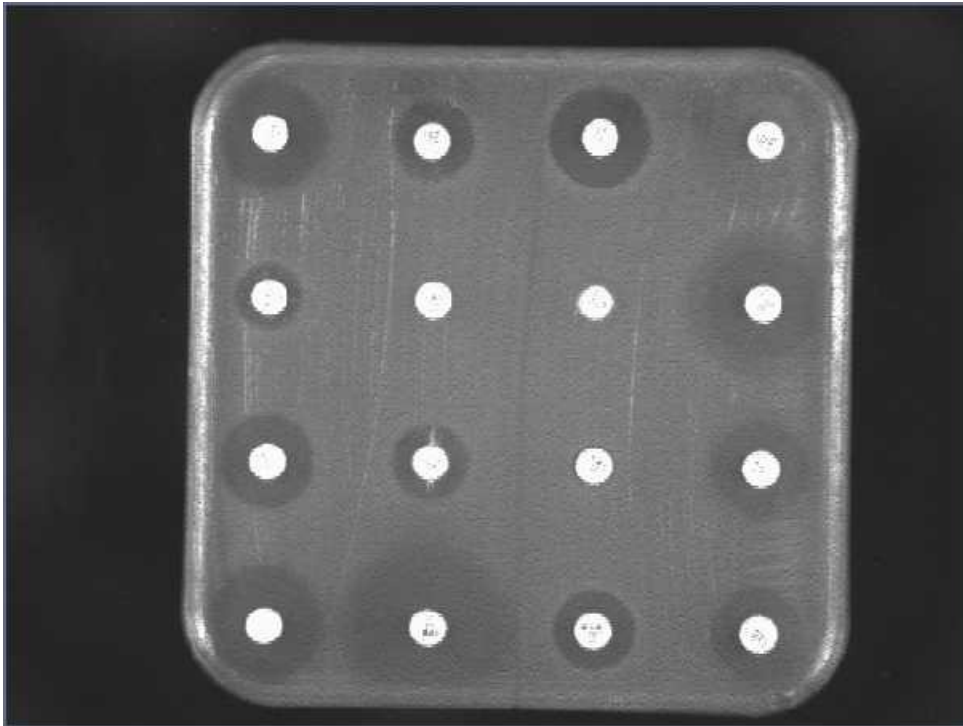
Εικόνα 33: Αντιβιογράμμα Δείγματος 661/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), κεφεπίμη(FEP). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ του αναστολέα κλαβουλανικό και κεφεπίμης, με την FEP να είναι ανθεκτική , αναστολέα κλαβουλανικό με CTX, με την κεφοταξίμη να παραμένει ανθεκτική, αναστολέα κλαβουλανικό με CAZ, με την κεφταζιδιμη να είναι ανθεκτική και αναστολέα ταζομπακτάμη (TZP) με κεφεπίμη(FEP), με κεφεπίμη να παρουσιάζει αντοχή. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό, με εκτεταμένο φάσμα ESBL β-λακταμασών.



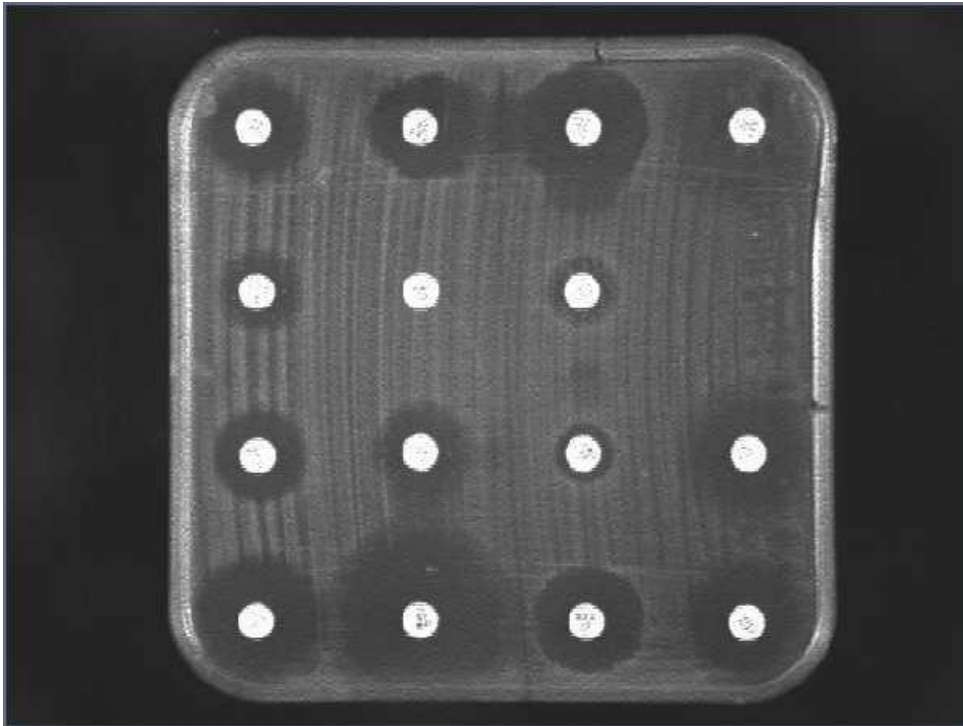
Εικόνα 34: Αντιβιογράμμα Δείγματος 696/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fep, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται μια πολύ μικρή συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ του αναστολέα TZP με κεφεπίμη(FEP), με κεφεπίμη να παρουσιάζει ευαισθησία. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.



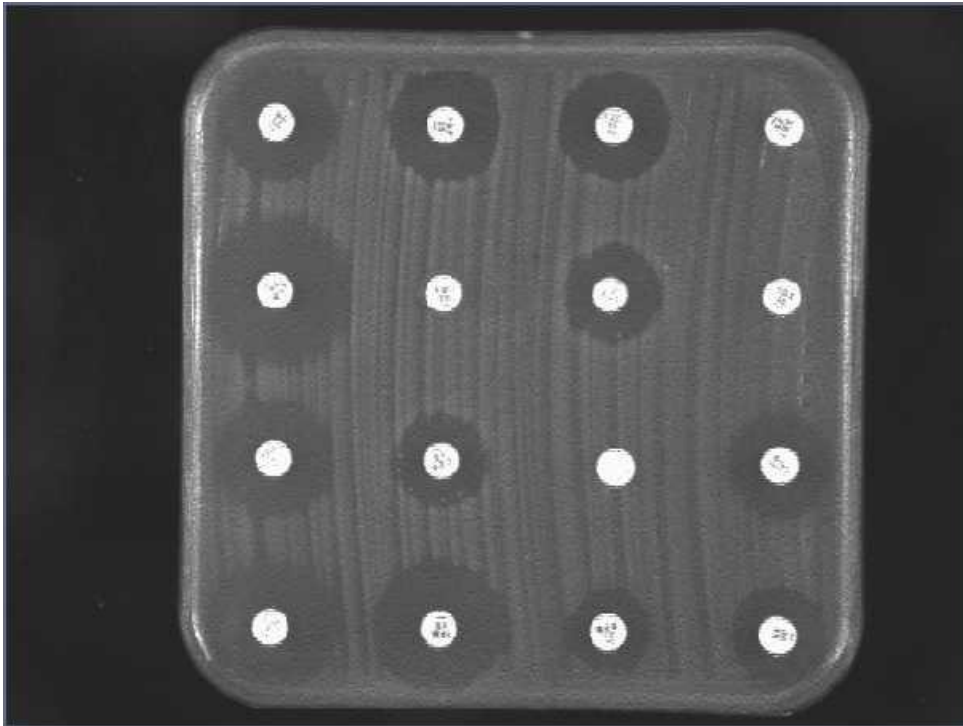
Εικόνα 35: Αντιβιογράμμα Δείγματος 697/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδικμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται μια πολύ μικρή συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ του αναστολέα TZP με κεφεπίμη(FEP), με την κεφεπίμη να παρουσιάζει μέτρια ευαισθησία. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.



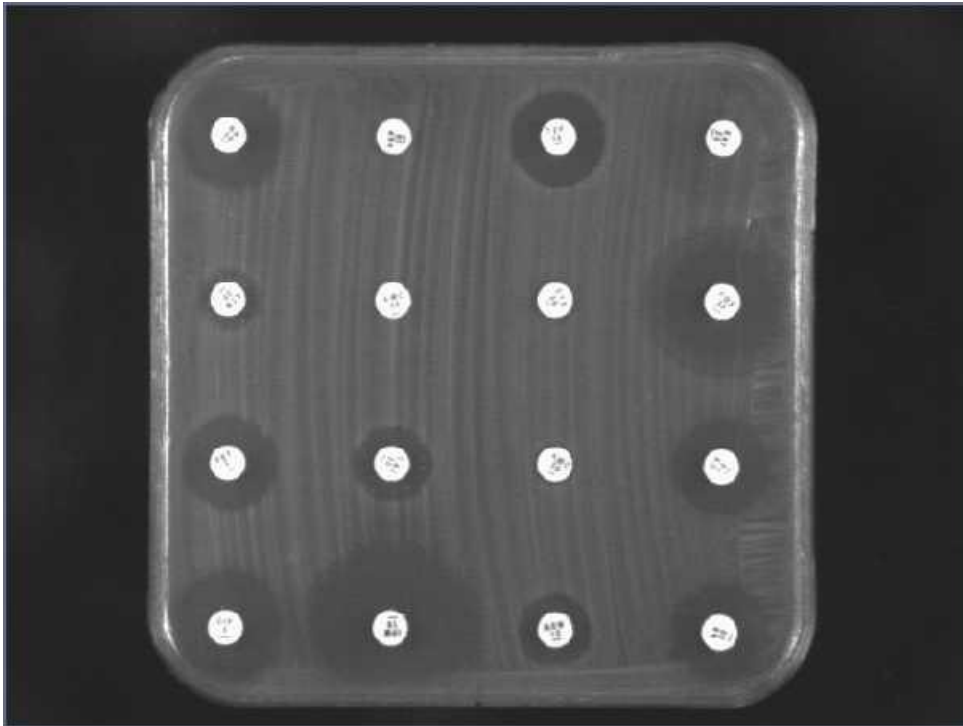
Εικόνα 36: Αντιβιογράμμα Δείγματος 698/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεοναμη (ATM), κεφοξιτιν (FOX). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.



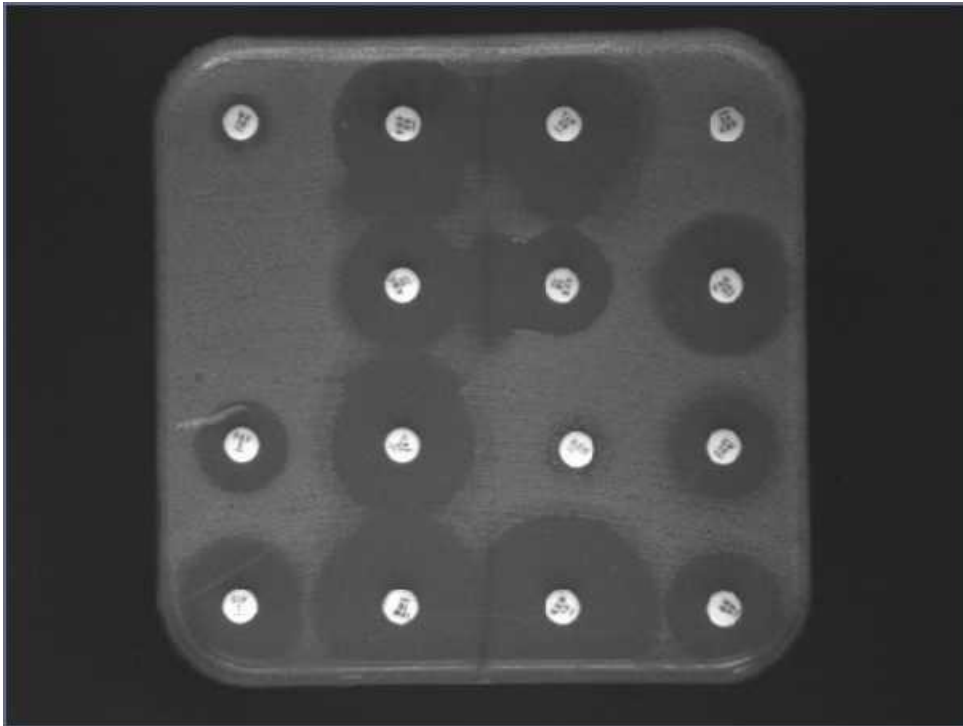
Εικόνα 37: Αντιβιογράμμα Δείγματος 708/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεοναμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ (TZP) ταζομπακτάμης με κεφοταξίμης (CTX) και κεφεπίμης (FEP), με κεφεπίμη να παρουσιάζει ευαισθησία . Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.



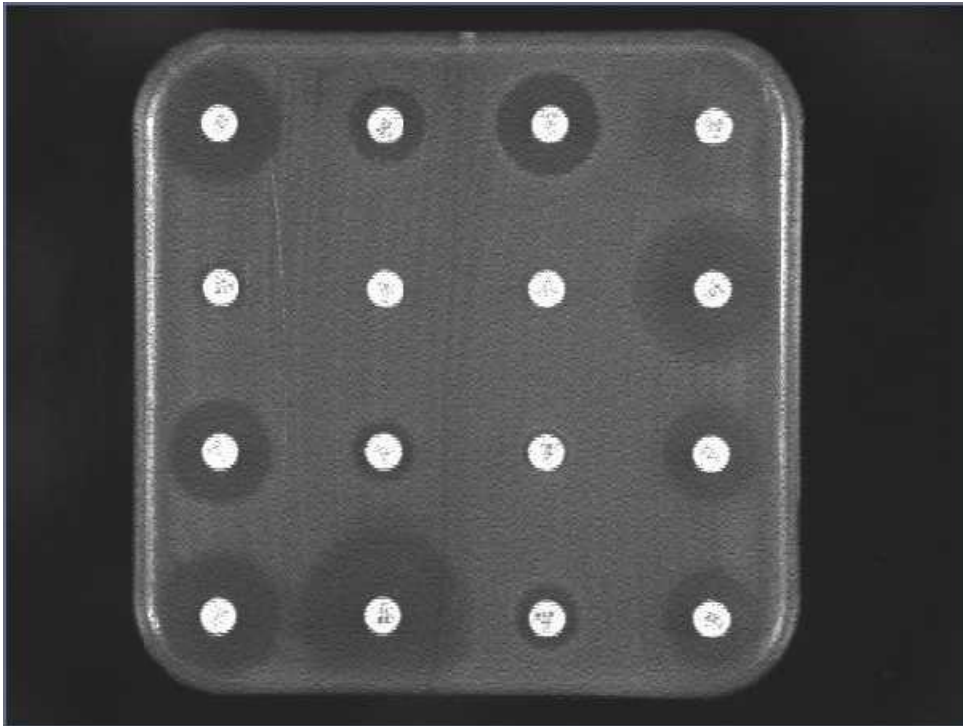
Εικόνα 38: Αντιβιογράμμα Δείγματος 744/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri* 2a. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή σε σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), κεφοξιτιν (FOX) και αζιθρομυκίνη (AZM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Η CTX είναι μετρίως ευαίσθητη. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.



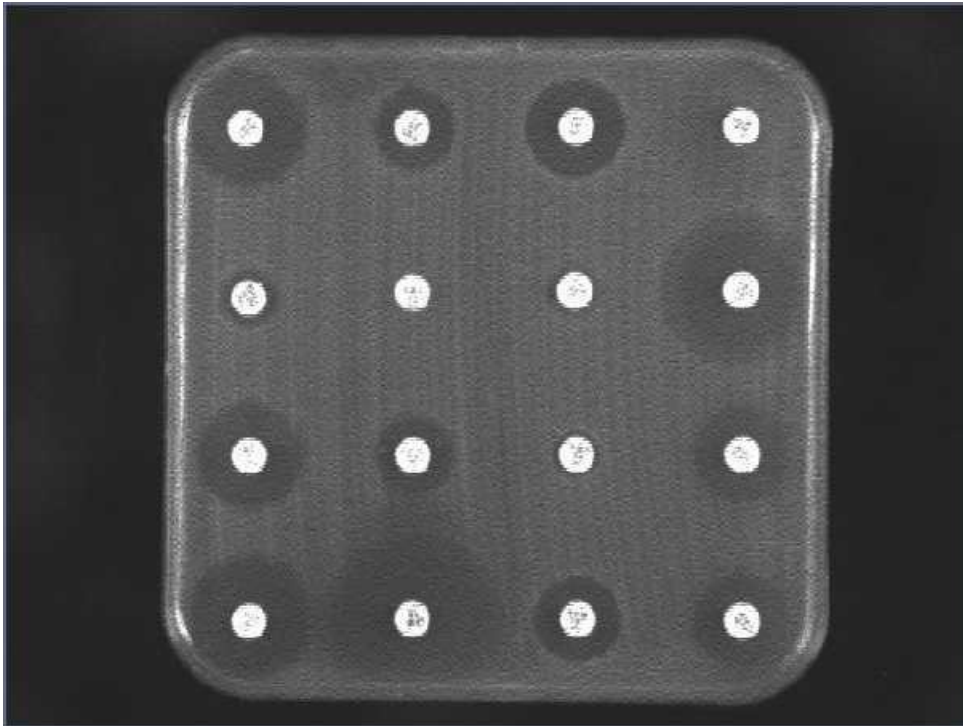
Εικόνα 39: Αντιβιογράμμα Δείγματος 745/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , κεφεπίμη (FEP), σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεοναμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Με FOX ευαίσθητο και FEP ανθεκτική, συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για ESBL εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.



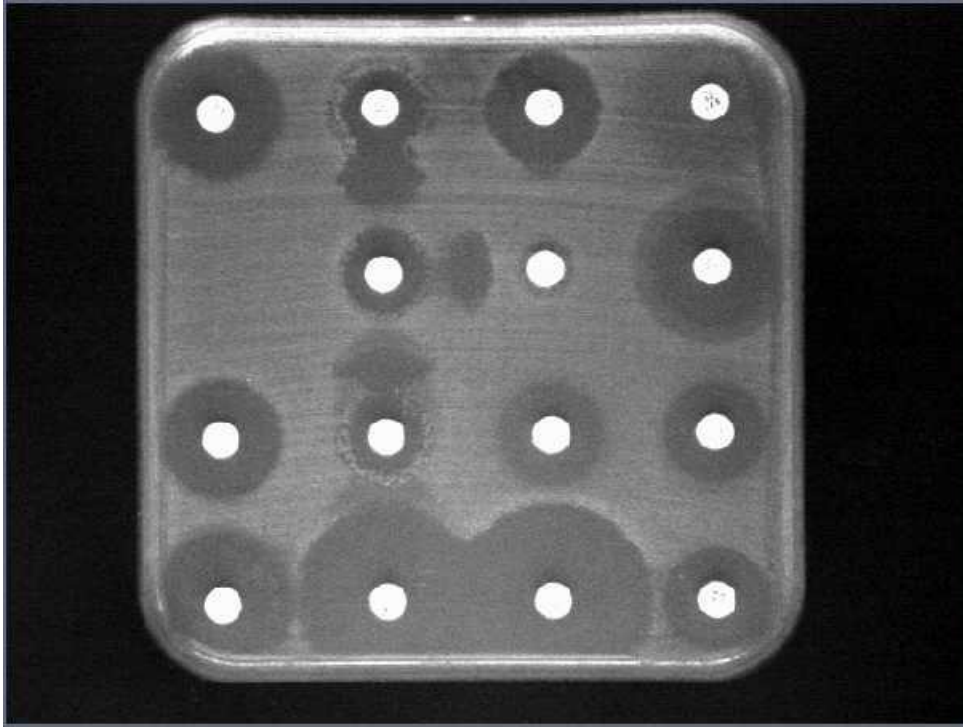
Εικόνα 40: Αντιβιογράμμα Δείγματος 746/2019 με ορότυπο *Sh. sonnei* S (I). Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), Ναλιδιξικό (Na) Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικο test DDST+) μεταξύ αναστολέα κλαβουλανικο με κεφεπίμη, κεφοταξιμη και κεφταζιδιμη. Επιπλέον υπάρχει συνέργεια μεταξύ αναστολέα ταζομπακτάμης με κεφεπίμη και κεφοταξίμης. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.



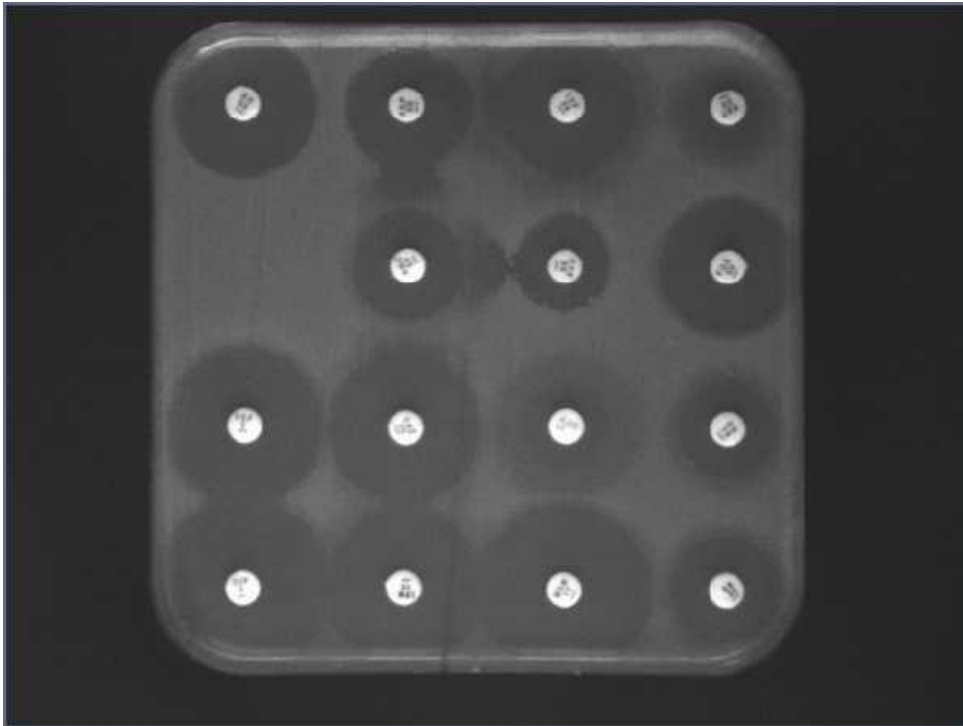
Εικόνα 41: Αντιβιογράμμα Δείγματος 747/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδικμη(CAZ) και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.



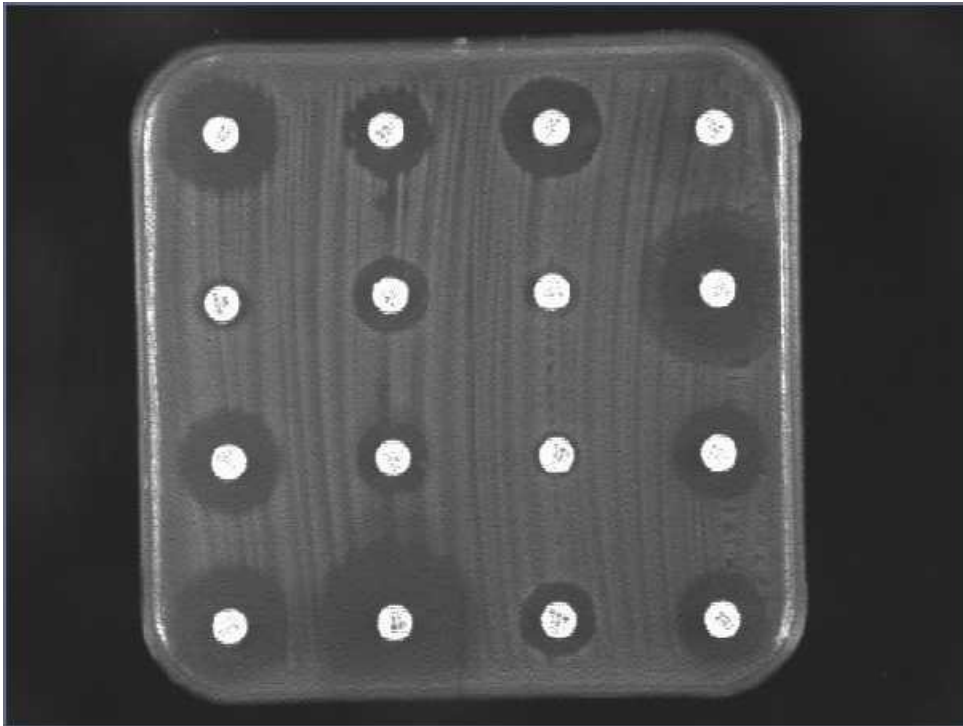
Εικόνα 42: Αντιβιογράμμα Δείγματος 748/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδιμη(CAZ) και πεφλοξασίνη (PEFL), αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό. Η MEM εδώ δεν λειτουργεί σωστά, έγινε επανάληψη της, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία.



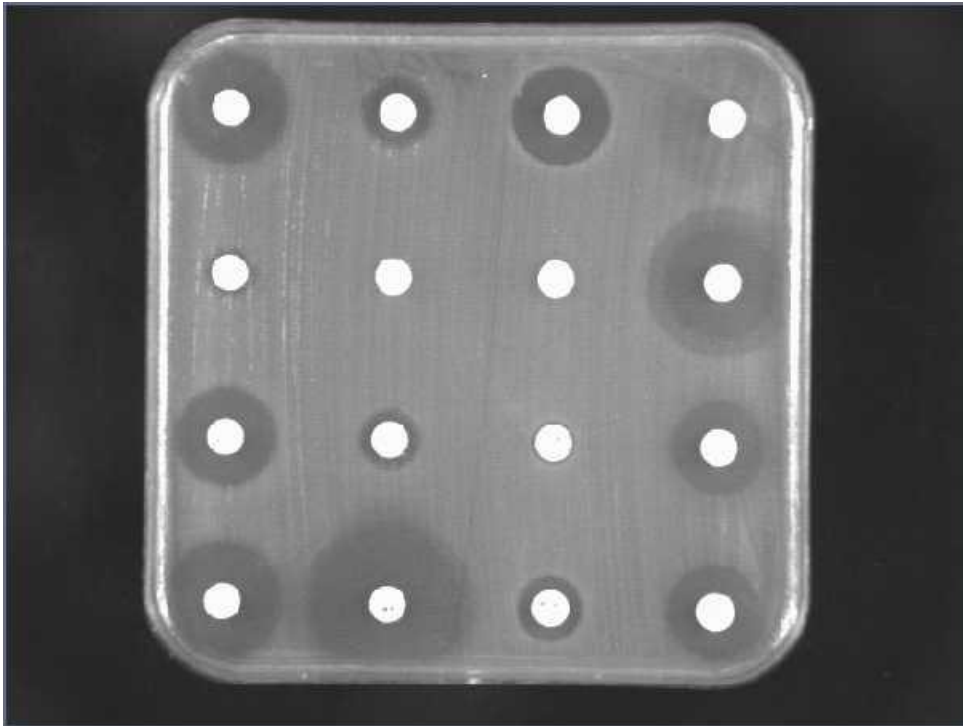
Εικόνα 43: Αντιβιογράμμα Δείγματος 778/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fep, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδικμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), κεφεπίμη (FEP), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ αναστολέα κλαβουλανικό με FEP και CAZ, καθώς επίσης αναστολέα TZP με FEP και CTX. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό, με FOX ευαίσθητο και FEP ανθεκτικό, άρα με εκτεταμένο φάσμα β-λακταμασών ESBL.



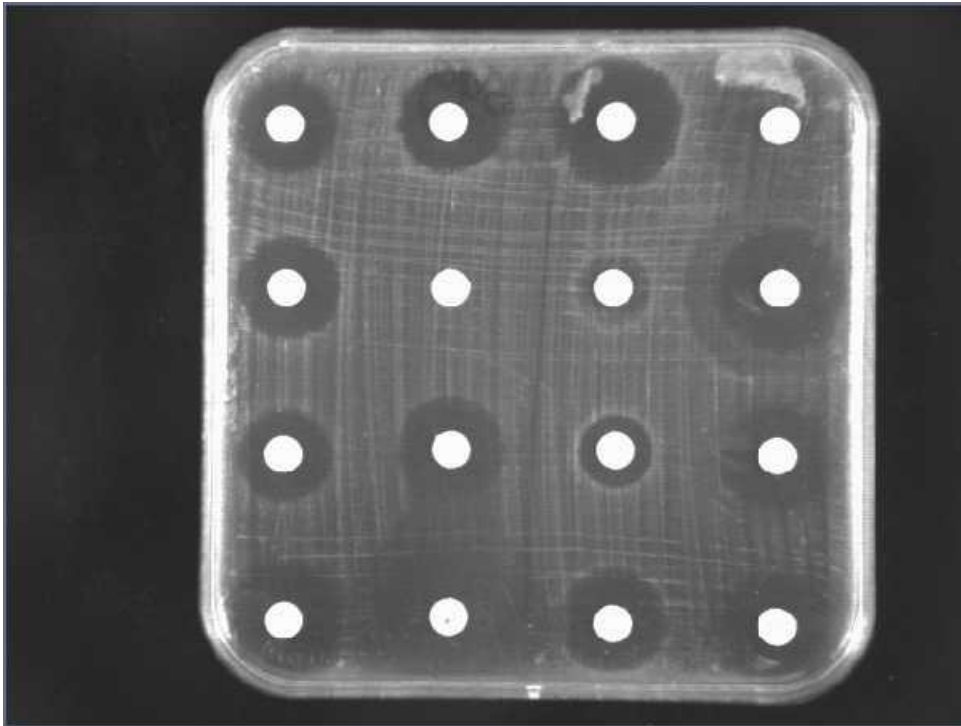
Εικόνα 44: Αντιβιογράμμα Δείγματος 779/2019 με ορότυπο *Sh. sonnei* S(1). Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fep, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία. Παρατηρείται συνέργεια (φαινοτυπικό test DDST+) μεταξύ αναστολέα κλαβουλανικό με FEP, CAZ και CTX, καθώς επίσης αναστολέα TZP με FEP και CTX. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.



Εικόνα 45: Αντιβιογράμμα Δείγματος 793/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφαζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.



Εικόνα 46: Αντιβιογράμμα Δείγματος 794/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, ATM, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), κεφταζιδιμη(CAZ), και πεφλοξασίνη (PEFL), κεφεπίμη (FEP), αμοξικυλλίνη-κλαβουλανικό (AMC). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό, με FOX ευαίσθητο και FEP ανθεκτικό, άρα με εκτεταμένο φάσμα β-λακταμασών ESBL.

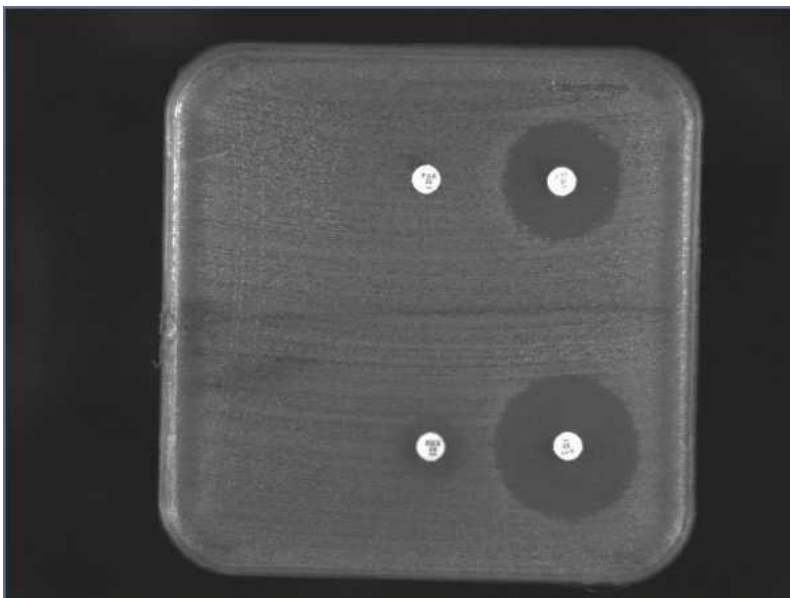


Εικόνα 47: Αντιβιογράμμα Δείγματος 699/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 1b*. Αντιβιοτικοί δίσκοι με τη σειρά από πάνω αριστερά προς τα δεξιά, Na, Fer, TZP, SXT, AMC, CTX, FOX, PEFL, CAZ, AZM, GM, Cip, IPM, MEM, AN. Το βακτήριο εμφανίζει αντοχή στη κεφοταξίμη (CTX) , σουλφομεθοξαζόλη(SXT), πεφλοξασίνη (PEFL),αμοξικυλλίνη-κλαβουλανικό (AMC), αστρεονάμη (ATM). Στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρατηρείται ευαισθησία και μέτρια ευαισθησία. Δεν παρατηρείται συνέργεια. Η εικόνα μας παραπέμπει ότι πρόκειται για CTX-M μηχανισμό.

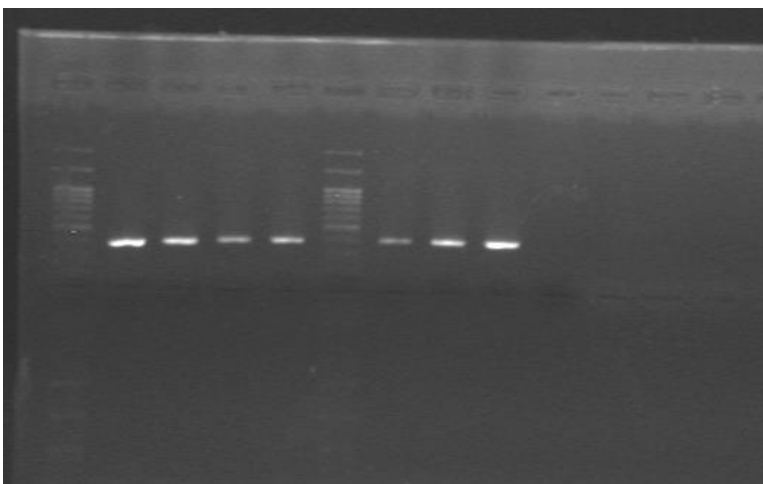
Αφού ελέγξαμε όλα τα αντιβιογράμματα, υπολογίζαμε ότι όλα τα στελέχη *Sh. flexneri 1b* και *Sh. sonnei S (I)* έχουν CTX-M μηχανισμό, κάτι που θα διαπιστωθεί και με την μέθοδο PCR. Το *Sh. flexneri 2a* δεν παρουσίαζε εικόνα αντιβιογράμματος για μηχανισμό CTX-M. Έτσι, προχωρήσαμε με μελέτη για μηχανισμό AmpC, καθώς η φαινοτυπική του εικόνα με FEP ευαίσθητη και FOX ανθεκτική, μας παρέπεμπε εκεί.

Το φαινυλ-βορικό οξύ αναστέλλει την αντοχή σε CAZ, FOX,CTT (30mg ανά δισκίο) στα περισσότερα στελέχη AmpC. Ελάττωση της αντοχής σε CAZ, FOX, CTT από το φαινυλ-βορικό οξύ είναι ενδεικτική παραγωγής AmpC ενζύμου. (αύξηση κατά >5mm της ζώνης αναστολής). (Ερμηνεία

αντιβιογράμματος, φαινοτυπικές δοκιμασίες και μηχανισμοί αντοχής) (Βούλγαρη, 2014) Οι ζώνες αναστολής έχουν αυξηθεί >5mm στην περίπτωση με το φαινυλ-βορικό οξύ, οπότε συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για AmpC μηχανισμό αντοχής

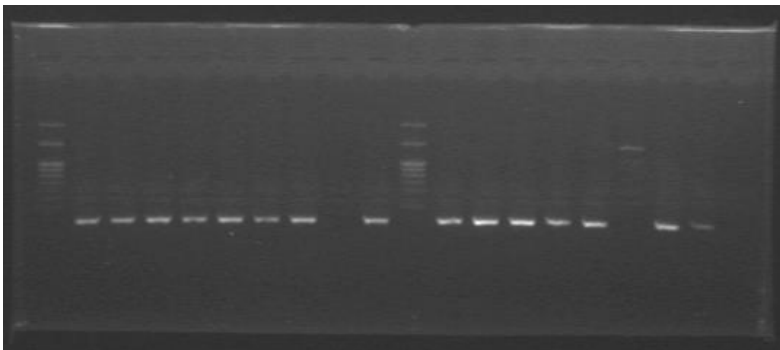


Εικόνα 48: Τεστ κεφοτετάνης για ανίχνευση AmpC μηχανισμού στο δείγμα 744/2019 με ορότυπο *Sh. flexneri 2a A*) Πάνω αριστερά δισκίο κεφοξιτίν με ζώνη αναστολής 6mm (ανθεκτικό) και δεξιά δισκίο κεφοτετάνης με ζώνη αναστολής 26mm (ευαίσθητο), Β) Κάτω δισκία με προσθήκη 20μL φαινυλ-βορικού οξέος, αριστερά δισκίο κεφοξιτίν με ζώνη αναστολής 12mm (ανθεκτικό) και δεξιά δισκίο κεφοτετάνης με ζώνη αναστολής 31mm (ευαίσθητο), όρια κεφοτετάνης σύμφωνα με CLSI, < 12mm ανθεκτικό.



Εικόνα 49: Εικόνα αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης για τα στελέχη *Sh. flexneri 1b*

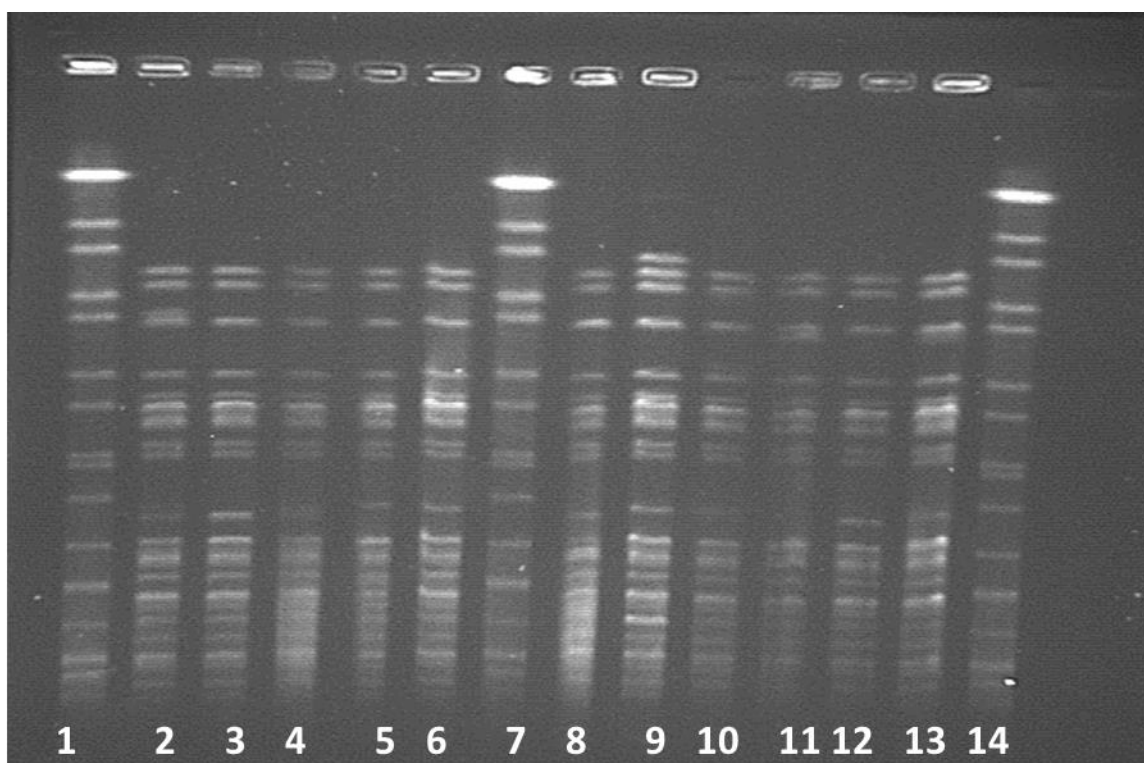
Ακολούθησε η διαδικασία της Multiplex PCR- Ηλεκτροφόρησης. Όπως φαίνονται παραπάνω στην εικόνα, στα πηγαδάκια είχαν φορτωθεί με την σειρά από αριστερά προς τα δεξιά τα εξής δείγματα: ladder για γνωστά MB , 696/2019, 697/2019, 698/2019, 699/2019, ladder, 793/2019, θετικός μάρτυρας για γκρουπ CTX-M-1 (υποομάδα CTX-15), θετικός μάρτυρας CTX-M-1 (υποομάδα CTX-M-3), τυφλό διάλυμα. Όπως φαίνεται στην εικόνα του gel, όλα τα δείγματα είναι στο ίδιο ύψος μήκους κύματος. Όπως γνωρίζουμε τα Cluster 1: 415 bp, cluster 2: 552 bp, cluster 9: 205 bp. (N., και συν., 2005). Σε σύγκριση με το ladder, σε όλα τα δείγματα φαίνεται το μήκος κύματος να είναι λίγο πιο κάτω από τις 500bp, οπότε συμπερένουμε ότι πρόκειται για το cluster-1, δηλαδή CTX-M-1 μηχανισμό αντοχής, συγκρίνοντας τα και με τους δύο θετικούς μάρτυρες που έχουμε για το cluster-1. Το τυφλό που είναι κενό, μας βοηθά να γίνει έλεγχος για σωστή λειτουργία μεθόδου (έλεγχος επιμολύνσεων).



Εικόνα 50: Εικόνα αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης μεθόδου PCR για στελέχη *Sh. flexneri 1b* και *Sh. sonnei S(I)*

Όπως φαίνονται παραπάνω στην εικόνα, στα πηγαδάκια είχαν φορτωθεί με την σειρά από αριστερά προς τα δεξιά τα εξής δείγματα: ladder για γνωστά μήκη κύματος, 659/2019, 660/2019, 661/2019, 708/2019, 745/2019, 747/2019, 748/2019, 778/2019, 794/2019, ladder, 658/2019, 743/2019(δεν αποτελεί μέρος της μελέτης μας), 746/2019, 779/2019, 82/2020(δεν αποτελεί

μέρος της μελέτης μας), 744/2019 θετικός μάρτυρας για γκρουπ CTX-M-1 (υποομάδα CTX-15), θετικός μάρτυρας CTX-M-1 (υποομάδα CTX-M-3), τυφλό διάλυμα. Σε σύγκριση με το ladder, στα δείγματα 659/2019, 660/2019, 661/2019, 708/2019, 745/2019, 747/2019, 748/2019, 794/2019, 658/2019, 746/2019, 779/2019, φαίνεται το μήκος κύματος να είναι λίγο πιο κάτω από τις 500bp, οπότε συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για το cluster-1, δηλαδή CTX-M-1 μηχανισμό αντοχής, συγκρίνοντας τα και με τους δύο θετικούς μάρτυρες που έχουμε για το cluster-1. Το τυφλό που είναι κενό, μας βοηθά να γίνει έλεγχος για σωστή λειτουργία μεθόδου. Το 778/2019 δεν έδωσε εικόνα ούτε σε επανάληψη της μεθόδου PCR. Το 744/2019 που συμπεράναμε ότι πρόκειται για AmpC μηχανισμό αντοχής φαίνεται ξεκάθαρα να διαφέρει η εικόνα του στην ηλεκτροφόρηση από τα άλλα δείγματα, που πρόκειται για CTX-M-1 μηχανισμό αντοχής.

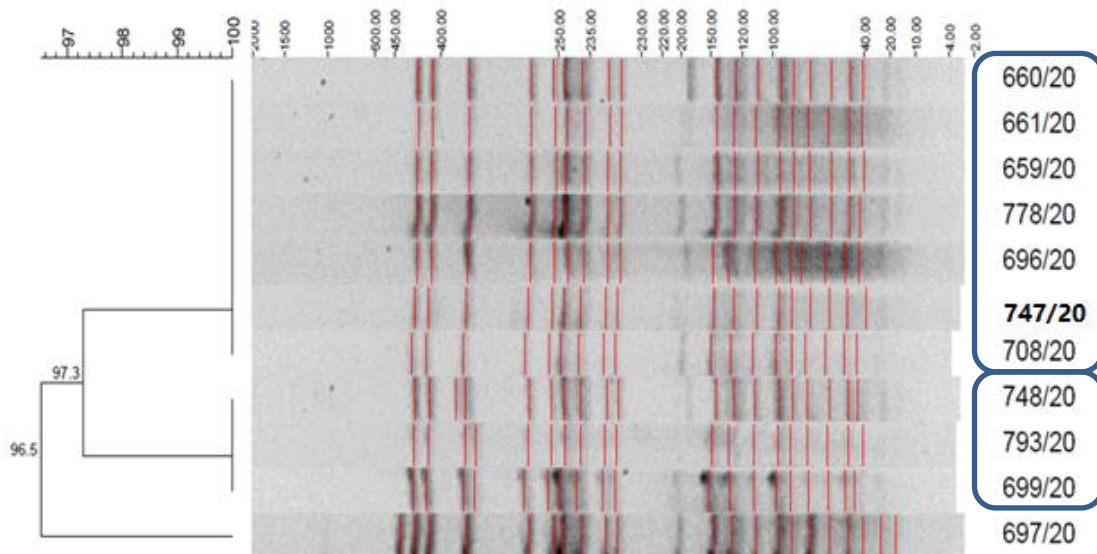


Εικόνα 51: Εικόνα αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης μετά από πέψη του DNA με XbaI (μεθόδος PFGE) για τα στελέχη *Sh. flexneri* 1b

Ακολούθησε η διαδικασία της PFGE. Όπως φαίνονται παραπάνω στην εικόνα, στα πηγαδάκια είχαν φορτωθεί με την σειρά από αριστερά προς τα δεξιά τα εξής δείγματα:

- 1, Ladder S. Braunderup H9810 για γνωστά μοριακά βάρη/ζώνη,
2. 748/2019, ,
3. 660/2019,
4. 661/2019,
5. 659/2019,
6. 778/2019
7. Ladder S. Braunderup H9810 για γνωστά μοριακά βάρη/ζώνη,
8. 696/2019,
9. 697/2019,
10. 747/2019,
11. 793/2019,
12. 708/2019,
13. 699/2019
- 14.Ladder S. Braunderup H9810 για γνωστά μοριακά βάρη/ζώνη

Το Δενδρόγραμμα που προέκυψε από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το Πρόγραμμα Bionumerics παρουσιάζεται στην Εικόνα 50



Εικόνα 52: Το Δενδρόγραμμα που προέκυψε από την επεξεργασία των μοριακών προφίλ ύστερα από την πέψη του DNA των καλλιεργημάτων με την περιοριστική ενδονουκλεάση XbaI και ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το Πρόγραμμα Bionumerics

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 51-52, τα καλλιεργήματα, 660/2019, 661/2019, 659/2019, 778/2019, 696/2019, 747/2019, 708/2019, συγκρινόμενα μεταξύ τους έχουν πανομοιότυπο μοριακό προφίλ (100% ομοιότητα) συμπεραίνοντας ότι πιθανά αποτελούν το στέλεχος Α. Τα καλλιεργήματα 748/2019, 793/2019 και 699/2020 συγκρινόμενα μεταξύ τους έχουν πανομοιότυπο μοριακό προφίλ (100% ομοιότητα) συμπεραίνοντας ότι πιθανά αποτελούν το στέλεχος Β. Το μοριακό προφίλ των δυο στελεχών έχει ομοιότητα 97,3%. Το δείγμα 697/2019, παρουσιάζει τελείως διαφορετική εικόνα από τα υπόλοιπα στελέχη, αποτελώντας το στέλεχος Γ.

Πίνακας 20: Προφίλ αντοχής *Sh. flexneri 1b* σε σύγκριση με μοριακό προφίλ PFGE.

Δείγμα	Ορότυπος	AMC	Na	FEP	TZP	SXT	ATM	CTX	FOX	PEFL	CAZ	AZN	GM	Cip	IPM	AN	MEN	PFGE strains
659/2019	Sh. flexneri	R (6)	S (25)	I (17)	S (21)	R (6)	-	R (6)	S (25)	R (21)	R (15)	S (21)	S (19)	S (26)	S (35)	S (22)	S (32)	A
660/2019	Sh. flexneri	I (15)	S (22)	I (17)	S (21)	R (6)	-	R (7)	S (22)	R (18)	I (18)	S (19)	S (19)	S (25)	S (30)	S (19)	S (30)	A
661/2019	Sh. flexneri	R (13)	S (22)	R (11)	I (17)	R (6)	-	R (6)	S (20)	R (20)	R (11)	S (22)	S (19)	S (23)	S (30)	S (18)	S (30)	A
696/2019	Sh. flexneri	R (6)	S (23)	S (18)	S (21)	R (6)	-	R (6)	S (27)	R (21)	R (17)	S (17)	S (17)	S (27)	S (32)	S (19)	S (31)	A
697/2019	Sh. flexneri	R (6)	S (20)	I (17)	S (22)	R (6)	-	R (6)	S (27)	R (20)	R (14)	S (20)	S (18)	S (25)	S (30)	S (20)	S (32)	Γ
699/2019	Sh. flexneri	R (6)	I (16)	I (17)	S (23)	R (6)	R (19)	R (12)	S (20)	R (17)	I (19)		S (17)	S (21)	S (30)	S (19)	S (30)	B
708/2019	Sh. flexneri	R (6)	I (16)	S (19)	S (22)	R (6)	R (14)	R (11)	S (20)	R (17)	R (16)	S (18)	S (19)	S (24)	S (29)	S (17)	S (31)	A
747/2019	Sh. flexneri	R (6)	S (20)	I (15)	I (19)	R (6)	R (8)	R (6)	S (27)	R (17)	R (11)	S (17)	S (17)	S (21)	S (32)	I (16)	S (31)	A
748/2019	Sh. flexneri	R (6)	S (19)	I (15)	I (17)	R (6)	R (8)	R (8)	S (27)	R (16)	R (14)	S (20)	S (22)	I (19)	S (30)	I (16)	S (32)	B
778/2019	Sh. flexneri	I (16)	S (24)	R (14)	S (21)	R (6)	R (19)	R (7)	S (23)	R (23)	R (14)	S (18)	S (17)	S (26)	S (30)	S (26)	S (30)	A
793/2019	Sh. flexneri	I (14)	S (20)	I (15)	I (18)	R (6)	R (8)	R (6)	S (22)	R (19)	R (13)	S (18)	S (16)	I (20)	S (28)	I (16)	S (30)	β

5. Συζήτηση-Συμπέρασμα

Έγινε αναφορά για εμφάνιση κρουσμάτων *Shigella spp.* στη δομή προσφύγων στη Σάμο, την περίοδο Οκτώβριο με Δεκέμβριο του 2019. Οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούσαν παιδιά, που είτε λόγω κακής υγιεινής, είτε έλλειψης σωστής περίθαλψης μολύνθηκαν με *Shigella*. Το Γενικό Νοσοκομείο Σάμου «Άγιος Παντελεήμων», έστειλε δείγματα προς μελέτη, στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών-Σιγκελλών και λοιπών βεροτοξινογόνων. Η εργαστηριακή μελέτη του ΕΚΑΣΣ, έδειξε 3 κρούσματα *Shigella sonnei* S (I), 14 *Shigella flexneri* 1b και 1 *Shigella flexneri* 2a. Τα *Shigella flexneri* 1b, παρουσίαζαν αντοχή σε κεφαλοσπορίνες 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς, στην αμοξυκιλλίνη κλαβουλανικό, στην αστρεονάμη, στις φθοροκινολόνες (πεφλοξασίν). Η *Shigella sonnei* S (I) παρουσίαζε αντοχή στην κεφοταξίμη. Η *Shigella flexneri* 2a παρουσίαζε αντοχή στην αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό, σουλφομεθοξαζόλη, κεφοξιτίνη, πεφλοξασίνη, αστρεονάμη και κεφταζιδίμη. Παρατηρήθηκε σε 5 καλλιεργήματα η παρουσία γονιδίου μηχανισμού αντοχής CTX-M-1 που προσδίδει αντοχή σε εκτεταμένο φάσμα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Επιπλέον έγινε μελέτη των μηχανισμών αντοχής που προσδίδει αντοχή σε β-λακταμικά αντιβιοτικά στα υπόλοιπα καλλιεργήματα, με τις *Shigella sonnei* S (I) και *Shigella flexneri* 1b να έχουν CTX-M-1 μηχανισμό αντοχής και το *Shigella flexneri* 2a να έχει AmpC μηχανισμό αντοχής σε β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Όσον αφορά στη συρροή κρουσμάτων από *Shigella flexneri* 1b, φαίνεται ότι τουλάχιστον 3 διαφορετικά στελέχη αυτού του ορότυπου κυκλοφορούσαν στο κέντρο υποδοχής προσφύγων. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος ορότυπος απομονώνεται κυρίως σε χώρες όπου δεν επικρατούν καλές συνθήκες υγιεινής και πιθανά οι πρόσφυγες καθώς μετακινούνται μεταφέρουν τα διαφορετικά στελέχη με τα οποία έχουν μολυνθεί (είτε στις χώρες τους είτε στις ενδιάμεσες χώρες).

Η επιδημιολογική και εργαστηριακή επιτήρηση των παθογόνων μικροβίων είναι απαραίτητη προκειμένου να προσδιοριστεί όσο το δυνατόν συντομότερα η διασπορά συγκεκριμένων στελεχών σε έναν πληθυσμό και έτσι η έγκαιρη λήψη μέτρων θα μπορέσει να προστατέψει τη δημόσια υγεία. Επίσης το γεγονός ότι οι σιγκέλλες μπορούν να λαμβάνουν και να ενσωματώνουν στο κύτταρό τους μηχανισμούς αντοχής (γονίδια) για αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως, επιτείνει την ανάγκη επιτήρησής τους.

Τα κρούσματα αντιμετωπίστηκαν από το Γενικό Νοσοκομείο Σάμου, ανάλογα με τα αποτελέσματα των αντιβιογραμμάτων. Δόθηκαν συστάσεις στον πληθυσμό του νησιού, καθώς επίσης και στους εργαζόμενους της δομής, για την σημασία των μέτρων υγιεινής. Η πρόληψη της μετάδοσης σιγκέλλωσης ήταν δύσκολη, λόγω συνεχών αφίξεων μεταναστών στη δομή και του υπερπληθυσμού που υπήρχε. Λόγω των περιορισμένων πόρων του νοσοκομείου του νησιού, ενδέχεται να μην έχουν καταγραφεί όλα τα κρούσματα, παρά μόνο αυτά που παρουσίασαν πιο βαριά κλινική εικόνα και παραπέμπτηκαν στο νοσοκομείο.

Ο πληθυσμός των δομών δεν πρέπει να ξεπερνάει την ικανότητα φιλοξενίας του χώρου και η διάρκεια διαμονής πρέπει να είναι όσο το δυνατόν συντομότερη, για να αποφευχθούν μολυσματικές ασθένειες. Απαιτείται βελτίωση των συνθηκών στις τοπικές υγειονομικές μονάδες καθώς επίσης και βελτίωση συνθηκών υγιεινής για να αποφευχθεί εμφάνιση νέων κρουσμάτων.

Τα Αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμπεριλήφθηκαν στη δημοσίευση:

Public health and clinical implications of multidrug-resistant shigellosis cases in a reception centre for refugees/migrants, Greece, October-December 2019.

*Mellou K, Mandilara G, Chrysostomou A, Tryfinopoulou K, Sideroglou T, Karadimas K, **Agiassoti VT**, Lamprou D, Zampeta E, Antoniou G, Maltezu HC, Panayiotakopoulos G.*

Eur J Public Health. 2020 Dec 12:ckaa220. doi: 10.1093/eurpub/ckaa220. Online ahead of print.

Βιβλιογραφία

(WHO), Global Foodborne Infections Network- World Health Organization. 2015. *Laboratory Protocol: "Biochemical Identification of Salmonella and Shigella Using an Abbreviated Panel of Tests"*. Γαλλία, Κόστα Ρίκα : s.n., 2015.

Academy, Khan. *Gel electrophoresis*.

Angela , R. και Melton- Celsa. 2014. *Shiga Toxin (STX) Classification, Structure and Function*. Ιούλιο 2014.

Aslam A., Okafor C.N. 2020. *Shigella (Shigellosis)*. 2020.

Aslam, A. και Okafor, C. N. 2019. *Shigella (Shigellosis)*. Νοέμβριος 2019.

Bohn, E., και συν. 2019. *Bacterial adhesion and host cell factors leading to effector protein injection by type III secretion system*. Ιούλιος 2019.

Canton, R., Gonzalez-Alba, J. M. και Galan, J. C. 2012. *CTX-M Enzymes: Origin and diffusion*. 2012.

CDC. <https://www.cdc.gov/shigella/surveillance.html>.

— *PFGE - PulseNet*.

— *Shigellosis*.

— **2017.** *Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri*. 2017.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 1999. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera*. Atlanta, Georgia : s.n., 1999.

D.P. Muthurandhi Sethuvel, N.K. Devanga Ragupathi, S. Anandan, B. Veeraraghavan. 2016. *Shigella new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance*. 2016.

diagnostica, SSI. *Antiserums* .

ECDC. 2015. *Communicable disease risks associated with the movement of refugees in Europe during the winter season*. 2015.

— **2016.** *Shigellosis*. 2016.

— *Surveillance Atlas of Infectious Diseases* . [Ηλεκτρονικό]

—. **2012.** *Survey of National Reference Laboratory (NRL) capacity for six food- and waterborne diseases in EU/ EEA countries.* 2012.

Epidemic Shiga Dysentery in Central America II. Epidemiologic Studies in 1969. **Gangarosa. E.J., Perera D. R., Mata L. J., Mendizabal-Morris C., Guzman Guillermo, Reller L. B. 1970.** 1970.

Georgakopoulou T., Mandilara G., Mellou K., Tryfinopoulou K, Chrisostomou A., Lillakou H., Hadjichristodoulou C., Vatoroulos A. 2016. *Resistant Shigella strains in refugees, August- October 2015, Greece.* 2016.

Greenwood, D., και συν. 2016. *Ιατρική Μικροβιολογία.* 2nd. s.l. : Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, Broken Hill, 2016. σ. 338.

Kenneth R., Rayan και Ray, C. George. 2014. *Sherris medical Microbiology.* 6th . 2014. Chapter 33.

Kluwer academic/ plenum publishers. 2003. *Microorganisms in foods 5- Characteristics of microbial pathogen.* 2003. σ. 283. chapter 16.

Lluque, A., και συν. 2015. *Virulence factors and mechanisms of antimicrobial resistance in Shigella strains from periurban areas of Lima (Peru).* Αύγουστος 2015.

MIC EUCAST. [Ηλεκτρονικό] <https://mic.eucast.org/>.

Mims, C., και συν. 2010. *Μικροβιολογία.* 1st. s.l. : Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, 2010. σσ. 221, 253.

Minakshi, P., Mohan, S. και Pankaj, C. 2018. *Emergence of antibiotic resistant Shigella species: A matter of concern.* India : s.n., 2018. σσ. 451-600.

Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital In Northern Italy. **Pagani, L., και συν. 2003.** September 2003, Journal of Microbiology.

Murray, Rosenthal και Pfaller. 2016. *Ιατρική Μικροβιολογία.* 3rd. s.l. : Παρισιάνος Α.Ε, 2016. σσ. 294, 302.

N., Woodford, E.J., Fagan και M.J., Ellington. 2005. *Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases.* 2005.

Niyogi, S.K. 2005. *Shigellosis.* Korea : s.n., 2005. σσ. p. 133-143.

notes, Online Microbiology and Biology. *Microbe Note.* [Ηλεκτρονικό] <https://microbenotes.com/mcfarland-standards/>.

Percival, S. L., και συν. 2013. *Microbiology of Waterborne Diseases- Microbiological aspects and risks.* 2nd. s.l. : AP, 2013. σ. 223.

Public health and clinical implicationsof multidrug-resistant shigellosis cases in a reception centre for refugees/ migrants, Greece, October- December 2019. **Mellou, Kassiani, και συν. 2020.** s.l. : Oxford academic, 12 December 2020, European Journal Of Public Health.

Public Health, England. 2013. *UK Standards for Microbiology Investigations- Identification of Shigella species.* England : s.n., 2013.

Rao, P.N. Sridhar. 2012. *CTX-M β-lactamases.* 2012.

Reza Ranjbar, Abbas Farahani. 2019. *Shigella: Antibiotic- Resistance Mechanisms And new Horizons for treatment.* 2019.

Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development.
Jennison, A. V. και Verma, N.K. 2004. 1, 1 February 2004, FEMS Microbiology Reviews, Τόμ. 28, σσ. 43-58.

Shigellosis. **Niyogi, Swapan Kymar. 2005.** 2005, Journal of Microbiology, σσ. 133-143.

Singh, Jyoti, Sharma, Shivesh και Nara , Seema. 2015. Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food an water. *Food chemistry.* 1 Μάρτιος 2015, σσ. 470-483.

Smith, J. L. 1986. *Shigella as a Foodborne Pathogen.* 1986. σσ. 788-801.

Steele, D., και συν. 2014. *Vaccines for enteric diseases: a meeting summary.* 2014.

Taneja N., Mewara A. 2014. *Shigellosis: Epidimiology in India.* 2014.

Tang, Y., και συν. 2015. *Molecular Medical Microbiology.* 2nd. 2015. σ. 1147.

Tegmeyer N., Rohde M., Backert S. 2012. *Clinical Presentations and pathogenecity mechanisms of bacterial Foodborne Infections In: Microbial Food Safety: An Introduction.* 2012.

The spread of CTX-M-type extended-prectrum β-lactamases. **Rossolini, G.M., D'Andrea, M.M. και Mugnaioli, C. 2008.** January 2008, Clinical Microbiology and Infection, Τόμ. 14, σσ. 33-41.

Tortora, Funke και Case. 2017. *Εισαγωγή στη Μικροβιολογία.* 2nd. s.l. : Broken Hill, Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, 2017. σ. 326.

Trofa, AF, και συν. 1999. *Dr. kiyoshi ShigaQ discoverer of the dysentery bacillus.* Νοέμβριος 1999.

Vaccines for the 21st Century: A tool for Decisionmaking. **KR, Stratton, JS, Durch και RS, Lawrence. 2000.** USA : National Academies Press, 2000, Τόμ. 23.

Warren, B.R., Parish, M.E. και Schneider, K.R. 2007. *shigella as a Foodborne Pathogen and current Methods for Detection in Food.* 2007.

Woodford, N., E.J., Fagan και M.J., Ellington. 2005. *Multiplex PCR for rapid detection of genes ancoding CTX-M extended-sprectrum β -lactamases.* 2005.

Βιβλιοθήκη εικόνων Δημόσιας Υγείας CDC. Ph.D, Todd Parker. 2014. s.l. : Εργαστήριο Επιστημών, ετοιμότητας και αναδυόμενων λοιμώξεων, 2014.

Βούλγαρη, Ευαγγελία. 2014. Επιδημιολογική μελέτη και διερεύνηση πλασμαδιακών AmpC β -λακταμασών και καρβαπενεμεσών στα εντεροβακτηριοειδή στην ελληνική επικράτεια. [Ηλεκτρονικό] 2014.

Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- ΕΟΔΥ. Σιγκέλλωση Γενικές Πληροφορίες, Περιγραφή Νοσήματος. *ΕΟΔΥ- Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας.* [Ηλεκτρονικό]

Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. 2008. *Απόφαση της επιτροπή 28/IV/2008.* 2008.

Ερμηνεία αντιβιογράμματος, φαινοτυπικές δοκιμασίες και μηχανισμοί αντοχής. **Κωνσταντίνα, Τζανέτου.** 3, Τόμ. 56, σσ. 132-137.

Κέντρο Ελέγχου Ειδικών λοιμώξεων, Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης. 2004. *Εγχειρίδιο. Ορισμός κρούσματος για υποχρεωτική δήλωση νοσημάτων.* 2004.

Λεγάκης, Ν. και Χατζηπαναγιώτου, Σ. 2013. *Ένα βιβλίο γνωριμία και με τον κόσμο των μικροβίων, για όλους ο άνθρωπος.* 2nd. s.l. : Αικατερίνη Λουκίσα και Αιμιλία Λεγάκη, 2013. σσ. 54-63.

Μαυρίδου Θ.Μ., Καμπούρης Μ.Ε., Νικολαΐδου Α. Λ. 2012. *Γενική Μικροβιολογία- Θεωρία και εργαστηριακές Ασκήσεις.* Αθήνα : Π. Χ. Πασχαλίδης, 2012. σσ. 353-358, 409-420.

Σκεπαστιανός Π., Καραμητρούσης Ε. 2012. *Θρεπτικά υποστρώματα και μεταβολισμός μικροοργανισμών.* Θεσσαλονίκη : University studio press, 2012. σσ. 86-92, 137-140, 270-271, 298-300, 308-311, 326-330, 354-355, 372-374.

Τσιρώνη, Θεοφανία. 2015. *Shigella spp. στην Ελλάδα.* 2015.

Υπουργείο Υγείας, Ελλάδα. <http://www.opengov.gr/yyka/?p=2669>.

