



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Παρακολούθηση των μεταβολών του πληθυσμού *Cronobacter sakazakii* σε παιδική τροφή εμπλουτισμένη με προβιοτικά κατά τη διάβαση του από εξομοίωση βρεφικού γαστρεντερικού συστήματος»

MSc Thesis

Population changes of *Cronobacter sakazakii* in infant formula enriched with probiotics during transition of an infant gut simulator system.

Διευθυντής

Καθ. Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΠΑ.Δ.Α)  
Βασιλεία Σινάνογλου

Όνομα φοιτητή: Γεωργία Σκαρμούτσου  
Name of student: Georgia Skarmoutsou

Όνομα εισηγητή: Σπυρίδων Κοντελής  
Name of supervisor: Spiridon Konteles

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023



**University of West Attica**  
**Faculty of Food Sciences**  
Department of Food Science and Technology

Master of Science  
**FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY**

MSc THESIS

**Population changes of Cronobacter sakazakii in infant formula enriched with  
probiotics during transition of an infant gut simulator system**

Name

Georgia Skarmoutsou

SUPERVISOR  
SPIRIDON KONTELES

AIGALEO 2023

## Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο “ **Παρακολούθηση των μεταβολών του πληθυσμού *Cronobacter sakazakii* σε παιδική τροφή εμπλουτισμένη με προβιοτικά κατά τη διάβαση του από εξομοίωση βρεφικού γαστρεντερικού συστήματος** ” που παρουσιάστηκε από την **Γεωργία Σκαρμούτσου**, υποψήφιας για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

### Όνομα επιβλέποντος

Κοντελές Σπύρος

Επίκουρος Καθηγητής - ΠαΔΑ

Ψηφιακή Υπογραφή

### Όνομα μέλους επιτροπής

Μπατρίνου Αικατερίνη-Ανθμία

Ψηφιακή Υπογραφή

### Όνομα μέλους επιτροπής

Τσάκαλη Ευσταθία

Ψηφιακή Υπογραφή

**Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright**

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

**ΣΚΑΡΜΟΥΤΣΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ**

.....

**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον Δρ. Σπυρίδων Κοντελέ, Επίκουρο καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΠΑΔΑ, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία αλλά και να χρησιμοποιήσω την υλικοτεχνική υποδομή του εργαστηρίου της Μικροβιολογίας Τροφίμων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου μικροβιολογίας τροφίμων για την υποστήριξη του στο πειραματικό μέρος της εργασίας, για το ευχάριστο κλίμα και την όλο καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της παραμονής μου. Η συμβολή όλων ήταν καθοριστική για την επίτευξη των στόχων της παρούσας εργασίας.

Θα ήταν επίσης παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής τα οποία δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της εργασίας μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους αλλά και την οικογένεια μου, που όλο αυτό το διάστημα στάθηκαν δίπλα μου και με βοήθησαν να ξεπεράσω τις όποιες δυσκολίες.

Αθήνα, Αύγουστος 2023

## Περίληψη

Το δυνητικά παθογόνο βακτήριο *Cronobacter sakazakii* εξακολουθεί να αποτελεί κίνδυνο για την υγεία το βρεφών κυρίως της 1<sup>ης</sup> βρεφικής ηλικίας – έως 6 μηνών. Στην συγκεκριμένη εργασία εμπορικά διαθέσιμη βρεφική τροφή εμπλουτίστηκε με εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα που περιείχε προβιοτικά βακτήρια. Η πειραματική πορεία είχε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο διαπιστώθηκε ότι σε ανασυσταμένη παιδική τροφή η οποία επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου (20 h) για 24 h ο πληθυσμός του *C. sakazakii* μειώθηκε κατά 4 λογαριθμικούς κύκλους ενώ κατά την διάρκεια των πρώτων 12 ωρών επώασης η αντίστοιχη μείωση ήταν περίπου 1 λογαριθμικός κύκλος σε σύγκριση με τον μάρτυρα – *C. sakazakii* σε μονοκαλλιέργεια στην βρεφική τροφή. Στα δεύτερο πειραματικό στάδιο παρασκευάστηκαν εκ νέου βρεφικές τροφές χρησιμοποιώντας 10% w/w από τις βρεφικές τροφές του πρώτου σταδίου και 90% w/w νέας βρεφικής τροφής. Τα δείγματα αυτά μελετήθηκαν ως προς την εξέλιξη των πληθυσμών *C. sakazakii* και προβιοτικών βακτηρίων κατά το πέρασμά τους από απλοποιημένο σύστημα εξομοίωσης γαστρικής τροφής με πρώτο στάδιο το γαστρικό υγρό (2 h) και σε δεύτερο στάδιο από εντερικό υγρό (4 h). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κατά την παραμονή της βρεφικής τροφής για 2 h στο εντερικό υγρό υπάρχει μείωση του αρχικού μικροβιακού φορτίου κατά 1 λογαριθμικό περίπου. Κατόπιν κατά την διάρκεια της παραμονής του γαστρικού μίγματος σε εντερικό υγρό ο πληθυσμός του *C. sakazakii* παραμένει πρακτικά σταθερός και δεν επηρεάζεται από τα χολικά άλατα. Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι κατά το πέρασμα βρεφικής τροφής από εξομοίωση γαστρεντερικού συστήματος υπάρχει μεν μείωση του αρχικού φορτίου αλλά όχι εξάλειψη.

**Λέξεις – Κλειδιά:** Βρεφική φόρμουλα, προβιοτικά, *C. sakazakii*, εξομοίωση γαστρεντερικού συστήματος

## Abstract

The opportunistic pathogen bacterium *Cronobacter sakazakii* continues to pose a health risk to infants, especially infants up to 6 months of age. In this work commercially available baby formula was fortified with commercially available formulation containing probiotic bacteria (..). The experimentation consisted of two stages. In the first stage it was found that in reconstituted baby formula which was incubated at room temperature (20 h) for 24 h the population of *C. sakazakii* decreased by 4 logarithmic cycles while during the first 12 hours of incubation the corresponding decrease was about 1 logarithmic cycle compared to the control – *C. sakazakii* single cultured in baby formula. In the second experimental stage baby formulas were prepared using 10% w/w of the baby foods of the first stage and 90% w/w of fresh formula. In these samples the populations of *C. sakazakii* and probiotic bacteria were counted during their passage through a simplified gastric food simulation system with first stage be the gastric fluid (2 h) and second stage intestinal fluid (4 h). The results showed that during the stay of the baby formula for 2 h in the stomach fluids there is a reduction of the initial microbial load by approximately 1 logarithm. Then, during the stay of the gastric mixture, in intestinal fluid the population of *C. sakazakii* remains practically stable and is not affected by bile salts. The final conclusion is that during the passage of infant food through a simulated gastrointestinal tract there is a reduction in the initial load but not elimination.

## Περιεχόμενα

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright .....	4
Ευχαριστίες .....	5
Περίληψη .....	6
Abstract .....	7
Κατάλογος εικόνων .....	10
Κατάλογος Πινάκων.....	10
Κατάλογος διαγραμμάτων .....	10
Εισαγωγή.....	11
1.1 Υφιστάμενο Ερευνητικό Πλαίσιο .....	11
1.2 Σκοπός της έρευνας.....	13
1.3 Καινοτομία εργασίας.....	14
1.4 Δομή εργασίας.....	14
Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> .....	16
Μικροοργανισμοί .....	16
2.1 Γενικά .....	16
2.2 Ταξινόμηση μικροοργανισμών .....	17
2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών .....	19
2.4 Ο μικροοργανισμός <i>Cronobacter sakazakii</i> .....	20
2.4.1 Ταξινόμηση .....	20
2.4.2 Γενικά χαρακτηριστικά .....	21
2.4.3 Επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά.....	23
2.5 Συσχέτιση εμφάνισης <i>C. sakazakii</i> σε προϊόντα βρεφικής θρέψης .....	24
2.5.1 Ιστορικό εμφανίσεων <i>C. sakazakii</i> .....	24
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> .....	26
Εντερικός μικροβιόκοσμος.....	26
3.1 Η έννοια του μικροβιώματος .....	26
3.1.1 Σημασία και εμπορικά μεγέθη.....	26
3.1.2 Ορισμοί ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος .....	27
3.2 Βασικά χαρακτηριστικά του ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος .....	28
3.2.1 Ομοιότητα .....	28
3.2.2 Σύσταση ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος.....	28
3.2.3 Διασύνδεση εντερικού μικροβιώματος με άλλα όργανα.....	30
3.3 Βασικές λειτουργίες μικροβιώματος .....	31
3.4 Εντερικό μικροβίωμα και τα πρώτα στάδια της ζωής.....	33
3.5 Προσομοίωση εντερικού συστήματος.....	35
Κεφάλαιο 4 <sup>ο</sup> .....	38



Πειραματικός Σχεδιασμός - Υλικά και Μέθοδοι.....	38
4.1 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	38
4.2 Αντιδραστήρια.....	38
4.3 Εξοπλισμός και Οργανολογία .....	39
4.4 Μέθοδοι.....	40
4.4.1 Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων και διαλυμάτων .....	40
4.4.2 Μεθοδολογία καταμέτρησης των μικροοργανισμών.....	41
4.5 Ανάπτυξη συστήματος προσομοίωσης .....	42
4.5 Πειραματική πορεία.....	44
Κεφάλαιο 5 <sup>ο</sup> .....	46
Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	46
5.1 Μεταβολές πληθυσμού <i>C. sakazakii</i> σε ανασυσταμένη βρεφική τροφή με και χωρίς συγκαλλιέργεια πρεβιοτικών βακτηρίων.....	46
5.2 Μεταβολές πληθυσμού <i>C. sakazakii</i> σε βρεφική τροφή με και χωρίς συγκαλλιέργεια πρεβιοτικών βακτηρίων κατά το πέρασμά τους από εξομοίωση γαστρεντερικού υγρού .	48
5.3 Συσχέτιση αποτελεσμάτων με το υφιστάμενο ερευνητικό πλαίσιο .....	51
5.4 Συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές .....	52
Αναφορές.....	54
Ξενόγλωσση .....	54

## Κατάλογος εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Ταξινόμηση βακτηρίων βάσει των επιμέρους χαρακτηριστικών τους .....	17
<b>Εικόνα 2:</b> Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη .....	20
<b>Εικόνα 3:</b> Απεικόνιση αποικιών <i>Cronobacter sakazakii</i> και η ταξινόμηση του .....	21
<b>Εικόνα 4:</b> Παγκόσμια αγορά σχετιζόμενη με το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα για τα έτη 2021-2030 .....	27
<b>Εικόνα 5:</b> Σχηματική αναπαράσταση των εννοιών της εντερικής μικροχλωρίδας ( <i>microbiota</i> ) και του μικροβιώματος .....	28
<b>Εικόνα 6:</b> Απεικόνιση της ποικιλομορφίας και της αφθονίας των βακτηριακών πληθυσμών στα διαφορετικά σημεία της γαστρεντερικής οδού .....	29
<b>Εικόνα 7:</b> Σχηματική αναπαράσταση των βασικών λειτουργιών στις οποίες εμπλέκεται το εντερικό μικροβίωμα .....	31
<b>Εικόνα 8:</b> Σχηματική αναπαράσταση των δυο πιο χρησιμοποιούμενων μοντέλων προσομοίωσης: TIM-1 (A) και SHIME (B) .....	37
<b>Εικόνα 9:</b> Σχηματική απεικόνιση παρασκευής των δειγμάτων βρεφικής τροφής .....	41
<b>Εικόνα 10:</b> Φωτογραφία του συστήματος εξομοίωσης γαστρικού και εντερικού συστήματος σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C .....	42
<b>Εικόνα 11:</b> Σχηματική απεικόνιση του συστήματος γαστρεντερικής εξομοίωσης καθώς και των εισροών/ εκροών .....	43

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 2-1:</b> Περιστατικά (μαζικά-σποραδικά) σχετιζόμενα με λοίμωξη νεογνών από <i>C. sakazakii</i> .....	25
<b>Πίνακας 3-1:</b> Διαφοροποιήσεις εντερικού μικροβιώματος κατά τα πρώτα στάδια της ζωής .....	33
<b>Πίνακας 4-1:</b> Παράμετροι του <i>in vitro</i> συστήματος προσομοίωσης .....	43

## Κατάλογος διαγραμμάτων

<b>Διάγραμμα 5-1:</b> (α) Μεταβολές βακτηριακών πληθυσμών ( $\log cfu/mL$ ) και (β) των τιμών pH σε παρασκεύασμα βρεφικής τροφής υπό επώαση στους 20°C για 24h .....	46
<b>Διάγραμμα 5-2:</b> Μεταβολές βακτηριακών πληθυσμών σε δείγματα (A και B) βρεφικής τροφής κατά τη διάβασή τους από εξομοίωση γαστρικού (γαστρική φάση) και εντερικού υγρού (εντερική φάση) σε θερμοκρασία 37°C .....	50

# Κεφάλαιο 1.

## Εισαγωγή

### 1.1 Υφιστάμενο Ερευνητικό Πλαίσιο

Επί του παρόντος, όλο και περισσότεροι ερευνητές ασπάζονται την άποψη ότι τα μικρόβια είναι εξίσου σημαντικά με τα κύτταρα για την εύρυθμη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Μεταξύ των συστημάτων που «φιλοξενούν» μικρόβια (δέρμα, αναπνευστική και ουρογεννητική οδός), το έντερο περιλαμβάνει το πιο πυκνοκατημένο μικρο-περιβάλλον που αποτελείται από περισσότερους από  $3.8 \cdot 10^{13}$  μικροοργανισμούς (Sender et al., 2016). Έτσι, ως εντερικό μικροβίωμα ή εντερική χλωρίδα (*gut microbiota*) ορίζεται το σύνολο των μικροοργανισμών που εποικίζουν τον εντερικό σωλήνα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού-ξενιστή μέσω μηχανισμών, που δεν έχουν ακόμα πλήρως διαλευκανθεί (Berg et al., 2020).

Στις μέρες μας, η μελέτη της σύνθεσης, της δομής και των λειτουργικών ιδιοτήτων του ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος είναι ένα ταχέως εξελισσόμενο πεδίο, γεγονός που αποτυπώνεται και από το ρυθμό δημοσιεύσεων που προκύπτουν τη τελευταία πενταετία. Αξίζει να αναφερθεί πως η αλληλεπίδραση μεταξύ των κοινώς απαντώμενων βακτηρίων και του ξενιστή είναι ένα εξαιρετικά δυναμικό σύστημα πάνω στο οποίο εγκαθιδρύεται μια αμοιβαία και ευεργετική σχέση γνωστή και ως συμβίωση (Thursby and Nuge, 2020). Η σημασία δε αυτού δυναμικού οικοσυστήματος είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με διάφορες βασικές ή δευτερογενείς βιολογικές λειτουργίες όπως: ο μεταβολισμός τροφών και φαρμάκων, η επικοινωνία με το ανοσοποιητικό σύστημα, η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του φραγμού του επιθηλίου, η βιοσύνθεση βιταμινών, η προστασία έναντι παθογόνων και η ρύθμιση του εντερικού νευρικού συστήματος (Jandhyala et al., 2015). Αντίθετα, η διατάραξη αυτής της αρμονικής ισορροπίας και ομοιόστασης της μικροχλωρίδας του εντέρου μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες καταστάσεις γνωστές και ως δυσβίωση η οποία σχετίζεται με νοσήματα μεγάλου κοινωνικοοικονομικού ενδιαφέροντος (χρόνια φλεγμονώδεις καταστάσεις συμπεριλαμβανομένης της ελκώδους κολίτιδας και της νόσου του Chron).

Εμβαθύνοντας, η σύνθεση της μικροχλωρίδας της γαστρεντερικής οδού αποτελείται από βακτήρια, μύκητες, ζύμες, αρχαία και ιούς. Αξιοσημείωτο είναι πως κάθε τμήμα της χαρακτηρίζεται από διαφορετικές συνθήκες pH, διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών ή οξυγόνου και ως εκ τούτου, επιτρέπει την ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Παράλληλα, παρά το γεγονός πως κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού διαβιούν επτά κυρίαρχες φυλές (*Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, and *Cyanobacteria*) η ποικιλομορφία της είναι περιορισμένη αφού πάνω από το 85% του συνολικού πληθυσμού αποτελείται από *Bacteroides* και *Firmicutes* (Rinninela et al., 2019). Ωστόσο, παρά τα διάφορα βακτήρια που αποικίζουν το γαστρεντερικό σύστημα, ακόμη και παθογόνοι μικροοργανισμοί (*E. coli*, *H. pylori*, *C. jejuni*, *S. enterica*, and *B. Fragili*) μπορούν να βρεθούν μέσα σε αυτό.

Επιπλέον, το γεγονός ότι τα *Firmicutes* και τα *Bacteroides* είναι τα κυρίαρχα βακτήρια δεν πρέπει να θεωρείται ως απόλυτη άποψη καθώς το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα κάθε ενός είναι ξεχωριστό και μεταβάλλεται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του. Άλλοι παράγοντες που ενδεχομένως επηρεάζουν τη σύσταση του μικροβιώματος αφορούν: (α) τη τρέχουσα φυσιοπαθολογική κατάσταση του ατόμου (έχει βρεθεί πως η εκδήλωση ασθενειών συχνά συνοδεύεται από μια διαφοροποιημένη εντερική χλωρίδα), (β) το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή, (γ) γεωγραφικούς παράγοντες (π.χ τα επίπεδα *Firmicute* και *Proteobacteria* ήταν υψηλότερα στα παιδιά της Ευρώπης, ενώ τα *Firmicutes* απουσίαζαν σε παιδιά της Δυτικής Αφρικής), (δ) τη διατροφή (μια μεσογειακού τύπου διατροφή φαίνεται ότι ενισχύει τη συμβίωση και ποικιλομορφία του εντέρου) (Hasan and Wang, 2019).

Εστιάζοντας στην ηλικία, η ανάπτυξη της εντερικής μικροχλωρίδας ξεκινά από τη γέννηση ενώ πολλές αναφορές τονίζουν ότι η σωστή ανάπτυξη της παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού, στη παροχή και μεταβολισμό θρεπτικών συστατικών αλλά και τη προστασία από παθογόνα. Μάλιστα πρόσφατες έρευνες συσχετίζουν τον τρόπο γέννησης (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική τομή) με την αρχική σύσταση της χλωρίδας (Vandenplas et al., 2020). Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τον εντερικό μικροβιόκοσμο των νεογνών αφορά τη διατροφή τους. Πιο συγκεκριμένα, το

μητρικό γάλα θεωρείται η ιδανικότερη τροφή, ενώ σύμφωνα και με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (ΠΟΥ), κατά του πρώτους έξι μήνες συνίσταται αυστηρά ο αποκλειστικός θηλασμός των νεογνών. Για παράδειγμα, πιστεύεται πως το μητρικό γάλα περιέχει ωφέλιμα βακτήρια με προβιοτικές ιδιότητες για αυτό και πλεονεκτεί έναντι των εμπορικά διαθέσιμων φόρμουλων (Jost et al., 2015).

Ωστόσο πολλές φορές, για πολλούς λόγους ο αποκλειστικός θηλασμός είναι αδύνατος. Στη σημερινή εποχή, ένα μεγάλο ποσοστό μητέρων επιλέγει να χορηγήσει στο παιδί του βρεφική φόρμουλα. Έχοντας μεγαλύτερη γνώση σε σχέση με παλαιότερα, η ανάπτυξη βρεφικών φόρμουλων τείνει να προσομοιάζει σε σύσταση αυτή του μητρικού γάλακτος. Ωστόσο, το τι πραγματικά γίνεται σε επίπεδο βιοδιαθεσιμότητας συστατικών ή και αλληλεπίδρασης με το εντερικό μικροβίωμα παραμένει ακόμη υπό διερεύνηση. Όπως όλες οι τροφές που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, έτσι και οι φόρμουλες εκτός από ποιοτικές πρέπει να είναι και ασφαλής. Σύμφωνα με τον οργανισμό φαρμάκων της Αμερικής, ο μεγαλύτερος κίνδυνος που μπορεί να προκύψει κατά τη παραγωγή μιας φόρμουλας αφορά την εμφάνιση του παθογόνου βακτηρίου *Cronobacter sakazakii*, το οποίο μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις σε βρέφη και ειδικά αυτά που γεννήθηκαν πρόωρα καθώς είναι πιο ευάλωτα (Jaffe, 2022). Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός βρίσκεται φυσικά στο περιβάλλον και είναι ιδιαίτερα ικανός στο να επιβιώνει σε ξηρές τροφές χαμηλής υγρασίας όπως τα προϊόντα βρεφικής διατροφής (προστιθέμενα άμυλα ή γάλατα σε σκόνη). Ενώ οι λοιμώξεις του *Cronobacter* έχουν περιοριστεί, μπορεί να είναι θανατηφόρες σε μικρά βρέφη ή ακόμη και άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό.

## **1.2 Σκοπός της έρευνας**

Μέσα από τη παρούσα έρευνα θα διερευνηθεί κατά το δυνατόν περισσότερο η αλληλεπίδραση του παθογόνου μικροοργανισμού *Cronobacter sakazakii* με προβιοτικά σε παιδικές τροφές της α' βρεφικής ηλικίας. Η σύγχρονη παρασκευή βρεφικών τροφών (*infant formula*) επιβάλλει την ενσωμάτωση τέτοιων προβιοτικών έτσι ώστε αυτές να προσομοιάζουν τις ευεργετικές ιδιότητες του μητρικού γάλακτος. Το κυριότερο ερευνητικό ερώτημα είναι το εξής:

Υφίσταται μεταβολές πληθυσμός *Cronobacter sakazakii* παρουσία ανταγωνιστικών προβιοτικών βακτηρίων σε βρεφική τροφή καθώς και σε περιβάλλον εξομοίωσης του βρεφικού εντερικού συστήματος ;

### 1.3 Καινοτομία εργασίας

Με δεδομένο ότι η παρουσία του βακτηρίου *Cronobacter sakazakii* εξακολουθεί να αποτελεί κίνδυνο για την υγεία των βρεφών τους πρώτους μήνες της ζωής τους, το βασικό καινοτομικό στοιχείο της εργασίας αυτής είναι:

Η εισαγωγή προβιοτικών βακτηρίων σε βρεφική τροφή ως μια εναλλακτική μορφή αντιμετώπισης του δυνητικά παθογόνου βακτηρίου *Cronobacter sakazakii* η οποία είναι φιλικότερη προς τον οργανισμό και ειδικά στα βρέφη

Η μεγαλύτερη ωστόσο καινοτομία αφορά πως όλα τα παραπάνω θα μελετηθούν προσομοιάζοντας τις συνθήκες του βρεφικού γαστρεντερικού συστήματος έτσι ώστε να υπάρξει μια πραγματική αξιολόγηση των μεταβολών του πληθυσμού *Cronobacter sakazakii*.

### 1.4 Δομή εργασίας

Για την επίτευξη των αντικειμενικών στόχων της παρούσας πειραματικής εργασίας αρχικά ακολούθησε εκτεταμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση έτσι ώστε να περιγραφεί πλήρως το υφιστάμενο ερευνητικό πλαίσιο. Έτσι, το θεωρητικό ουσιαστικά μέρος της εργασίας περιλαμβάνει τα παρακάτω δυο κεφάλαια.

- Στο **Κεφάλαιο 2** επισημαίνονται κάποια βασικά και εισαγωγικά χαρακτηριστικά για τους μικροοργανισμούς (ταξινόμηση, παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη τους καθώς και αλληλεπιδράσεις τους με τον ξενιστή) ενώ γίνεται σύντομη περιγραφή του μικροοργανισμού ενδιαφέροντος δηλαδή του *Cronobacter sakazakii*
- Το **Κεφάλαιο 3** πραγματεύεται την έννοια του εντερικού μικροβιώματος, τα βασικά χαρακτηριστικά και λειτουργίες που εμπλέκεται, τη συσχέτιση του με την βρεφική ηλικία αλλά και τις σύγχρονες τάσεις προσομοίωσης του σε διάφορα πειραματικά μοντέλα

- Στο **4<sup>ο</sup> Κεφάλαιο** περιγράφονται αναλυτικά ο πειραματικός σχεδιασμός της εργασίας, τα υλικά και αντιδραστήρια καθώς και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία
- Στο **5<sup>ο</sup> Κεφάλαιο** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα καθώς και η συζήτηση αυτών, καταλήγοντας στα βασικότερα συμπεράσματα

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

### Μικροοργανισμοί

#### 2.1 Γενικά

Οι μικροοργανισμοί, είναι μικροσκοπικοί ζωντανοί με κοινό τους γνώρισμα το εξαιρετικά μικρό τους μέγεθος (μικρότερο του 0,1mm), το οποίο αποτελεί και το βασικό λόγο που δεν μπορούν να παρατηρηθούν με «γυμνό» μάτι. Ετυμολογικά, χρησιμοποιείται ένας ακόμη όρος για να περιγράψει τους μικροοργανισμούς γνωστός και ως μικρόβια, ο οποίος προέρχεται από τις ελληνικές «μικρός» και «βίος» υποδηλώνοντας την έννοια της μικροσκοπικής ζωής. Ιστορικά, από τις αρχές του 17<sup>ου</sup> αιώνα και την εφεύρεση του μικροσκοπίου από τον Antonie van Leeuwenhoek, παρατηρήθηκαν μικροοργανισμοί για πρώτη φορά. Αξιοσημείωτο είναι πως στην αρχή πιστεύονταν πως τα μικρόβια μπορούσαν να προκύψουν αυθόρμητα από μη ζωντανή ύλη (Spontaneous Generation Theory), κάτι που ωστόσο άλλαξε όταν διακεκριμένοι επιστήμονες της τότε εποχής (Francesco Redi, Lazzaro Spallanzani και Louis Pasteur) απέδειξαν το αντίθετο. Σταδιακά, φανερώθηκαν και άλλες σημαντικές πτυχές των μικροοργανισμών όπως η συσχέτιση ασθενειών με μικρόβια αλλά και η ανάπτυξη ενός ενιαίου τρόπου κατηγοριοποίησης τους (Gest, 2004).

Στις μέρες μας, αξιοσημείωτες τεχνολογικές εξελίξεις ενίσχυσαν σημαντικά την ικανότητα μελέτης και ορισμού των μικροοργανισμών. Τέτοιες εξελίξεις περιλαμβάνουν την ανάπτυξη ηλεκτρονικών πλέον μικροσκοπίων, την ανάπτυξη τεχνικών προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA (next generation sequencing – NGS) αλλά και την εφαρμογή άλλων ακόμη πιο εξειδικευμένων μεταγονιδιωματικών και μοριακών εργαλείων, δημιουργώντας ευκαιρίες τόσο για την αναγνώριση άγνωστων μέχρι στιγμής μικροοργανισμών όσο και την κατανόηση της σημασίας διάφορων μικροβιακών κοινοτήτων που συμβιώνουν στον ανθρώπινο οργανισμό (Cole et al., 2014).



## 2.2 Ταξινόμηση μικροοργανισμών

Πράγματι, η κατανόηση του κόσμου των μικροβίων από την επιστημονική κοινότητα έχει καλύψει ένα μεγάλο μέρος σχετικά με την ταξινόμηση τους. Ωστόσο, η πλειοψηφία των μικροβίων που υπάρχουν σε διάφορα περιβάλλοντα παραμένει άγνωστη ή ακαλλιέργητη, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ακριβή εκτίμηση της συνολικής ποικιλομορφίας τους. Εξάλλου, όσο αναπτύσσονται πιο ευαίσθητες τεχνικές ή πιο εκλεκτικά υποστρώματα, τόσο περισσότερα είδη θα ταυτοποιούνται. Γενικά, τα μικρόβια μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες ομάδες βάση των χαρακτηριστικών τους ή και των εξελικτικών σχέσεων τους. Έτσι, οι βασικές κατηγορίες τους αφορούν τα βακτήρια, τα αρχαία, τους μύκητες και τα πρωτόζωα. Παράλληλα μια πρώτη βασική διάκριση τους αφορά την ύπαρξη ή όχι πυρήνα. Έτσι, τα μικρόβια χωρίζονται σε προκαρυωτικούς ή μη οργανισμούς.

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που δεν έχουν πυρήνα και άλλα οργανίδια που περικλείονται αποκλειστικά από τη κυτταρική μεμβράνη (προκαρυωτικοί οργανισμοί). Πρόκειται για τη πιο ευρέως διαδεδομένη μορφή ζωής που βρίσκεται σε κάθε περιβάλλον στη Γη. Εμβαθύνοντας, εντός της ίδιας ομάδας τα βακτήρια μπορούν να καταταχθούν σε επιμέρους κατηγορίες βάση των απαιτήσεων τους σε θρεπτικά συστατικά όπως το οξυγόνο (αερόβια ή αναερόβια) αλλά και βάση των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους όπως το σχήμα (κόκκους, σπειροειδές, ραβδώσεις) ή η σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος (Gram θετικά ή αρνητικά) (Εικόνα 1).

Gram positive		Gram Negative	
Cocci	Rods	Cocci	Rods
<i>Abiotrophia</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Desulfobacter</i>
<i>Stomatococcus</i>			<i>Desulfovibrio</i>
	<i>Lactobacillus</i>		<i>Eubacterium</i>
	<i>Propionibacterium</i>		<i>Eikenella</i>
	<i>Pseudoramibacter</i>		<i>Fusobacterium</i>
	<i>Rothia</i>		<i>Haemophilus</i>
			<i>Leptotrichia</i>

**Εικόνα 1.** Ταξινόμηση βακτηρίων βάσει των επιμέρους χαρακτηριστικών τους (Πηγή: Chaturvedi and Punj., 2018)

Από την άλλη μεριά ενώ τα αρχαία παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τα βακτήρια (μονοκύτταροι-προκαρυωτικοί), χαρακτηρίζονται και από σημαντικές διαφορές. Αυτός ήταν και ο κύριος λόγος που το 1977 ο Αμερικανός βιολόγος πρότεινε το διαχωρισμό της ενιαίας τότε ομάδας βακτηρίων και αρχαίων. Ετυμολογικά, η κατηγορία πήρε το όνομα της από την ελληνική λέξη «αρχαίος» που σημαίνει πρωτόγονος. Πράγματι, πολλά είδη παρουσιάζουν αντάξια ιστορία του ονόματός τους. Βασική τους διαφορά από τα βακτήρια είναι η ικανότητα τους να επιβιώνουν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Για παράδειγμα, το *Pyrolobus fumarii* είναι ο πιο θερμοάντοχος οργανισμός του πλανήτη (αντέχει έως και 113°C) ενώ είδη του *Picrophilus* απομονώθηκαν από όξινα χώματα στην Ιαπωνία (μπορούν να αναπτύσσονται σε τιμές pH παρόμοιες με αυτές του γαστρικού οξέος). Αξιοσημείωτο είναι δε πως συγκεκριμένα είναι μεθαγόνα (παράγουν αέριο μεθάνιο ως μεταβολικό υποπροϊόν) και βρίσκονται σε θερμές πηγές αλλά και στο εντερικό σωλήνα πολλών ζώων συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Baker et al., 2020).

Οι μύκητες αποτελούν μια από τις πολυπληθέστερες ομάδες οργανισμών σε όλη τη βιόσφαιρα. Ετυμολογικά, και αυτοί προέρχονται από ελληνική λέξη (σπόγγος). Είναι εξελικτικά ανώτεροι καθώς πρόκειται για ευκαρυωτικούς (έχουν διακριτό πυρήνα) και ετερότροφους οργανισμούς οι οποίοι ωστόσο δε διαθέτουν μηχανισμούς κίνησης πλην ελαχίστων εξαιρέσεων (Tedersoo et al., 2018). Από οικολογικής απόψεως, διαβιούν ως παρασιτικοί, συμβιωτικοί ή σαπροφυτικοί ενώ μπορούν να εντοπιστούν σε διάφορα περιβάλλοντα συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος επιτελώντας σημαντικές λειτουργικές διαδικασίες.

Τα πρωτόζωα είναι μια ποικιλόμορφη ομάδα μονοκύτταρων ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που ανήκουν στο βασίλειο Protista. Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να κινούνται μέσω ψευδοπόδων, μαστιγίων ή βλεφαρίδων. Τα πρωτόζωα παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία μορφολογικών χαρακτηριστικών από αμοιβοειδή έως πιο πολύπλοκες δομές με εξειδικευμένα οργανίδια. Όπως τα αρχαία, έτσι και τα πρωτόζωα μπορούν να βρεθούν σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα όπως τα θαλάσσια ύδατα, το χώμα αλλά και ο πεπτικός σωλήνας ζώων συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (Dubik et al., 2022). Αν και όχι τόσο γνωστά

στο ευρύ κοινό, τα πρωτόζωα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αρκετά οικοσυστήματα συμβάλλοντας στη διατήρηση της ισορροπίας της τροφικής αλυσίδας καταναλώνοντας άλλα βακτήρια, άγλη ή οργανική ύλη ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις σχηματίζουν αμοιβαίες σχέσεις με άλλους μικροοργανισμούς (Συμβίωση) ευνοώντας την ανάπτυξη τους.

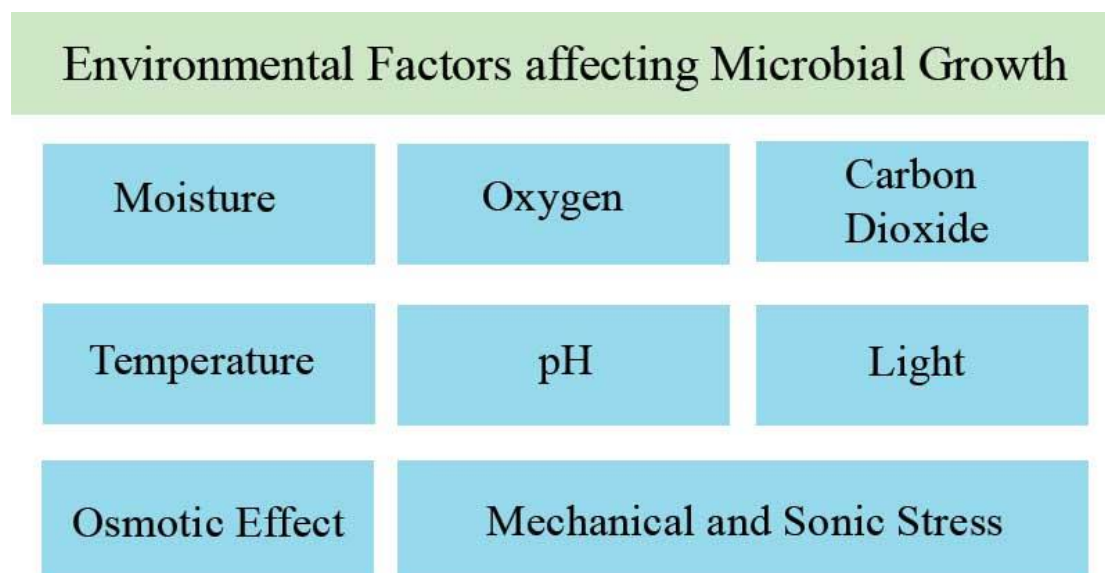
### **2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών**

Είναι αποδεδειγμένο πως διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη βιολογική κατάληξη ενός μικροοργανισμού συμπεριλαμβανομένης της επιβίωση και ανάπτυξης του ή και της θανάτωσης τους. Η ακριβής γνώση των παραγόντων αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς από τη μια μπορεί να φανεί χρήσιμη σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές (ζυμώσεις τροφίμων, εμπλουτισμός με συμβιωτικά κ.α) ενώ από την άλλη μπορεί να μας δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την επιβράδυνση της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον. Πρακτικά, οι παράγοντες αυτοί χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: **(α)** τους ενδογενείς ή αβιοτικούς και **(β)** τους εξωγενείς ή βιοτικούς (Εικόνα 2). Πιο συγκεκριμένα:

**(α) Οι Ενδογενείς/Αβιοτικοί** αναφέρονται σε όλα τα μη ζωντανά (φυσικά ή χημικά) χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τη μικροβιακή ανάπτυξη. Σε αυτούς τους παράγοντες περιλαμβάνονται τόσο διάφορες φυσικές παράμετροι όπως η θερμοκρασία, το pH, η υγρασία αλλά και η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο. Όπως είναι φανερό, ανάλογα με τις παραπάνω συνθήκες διαφορετικοί μικροοργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν ή όχι σε κάθε περίπτωση. Για παράδειγμα, αν και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται φυσιολογικά σε θερμοκρασίες παρόμοιες με εκείνες που επιβιώνει ο άνθρωπος (30-37°C) υπάρχουν και είδη που απαιτούν χαμηλότερες (ψυχρόφιλοι) ή και υψηλότερες θερμοκρασίες (θερμόφιλοι). Κάτι αντίστοιχο ισχύει και για τη τιμή pH (ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, οξεόφιλα).

**(β) Οι εξωγενείς ή βιοτικοί** αφορούν όλα τα ζωντανά συστατικά του περιβάλλοντος. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις με άλλους οργανισμούς (συμβίωση), τον ανταγωνισμό τους για τους διαθέσιμους πόρους όπως οι θρεπτικές

ουσίες. Ως εκ τούτου οι βιοτικοί παράγοντες μπορούν να έχουν τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιπτώσεις στη μικροβιακή ανάπτυξη, καθώς μπορεί να ευνοείται η ανάπτυξη κάποιων μικροοργανισμών και ταυτόχρονα να αναστέλλεται κάποιων άλλων (Willey, 2011).



**Εικόνα 2.** Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη (Πηγή: Banerjee et al., 2022)

## 2.4 Ο μικροοργανισμός *Cronobacter sakazakii*

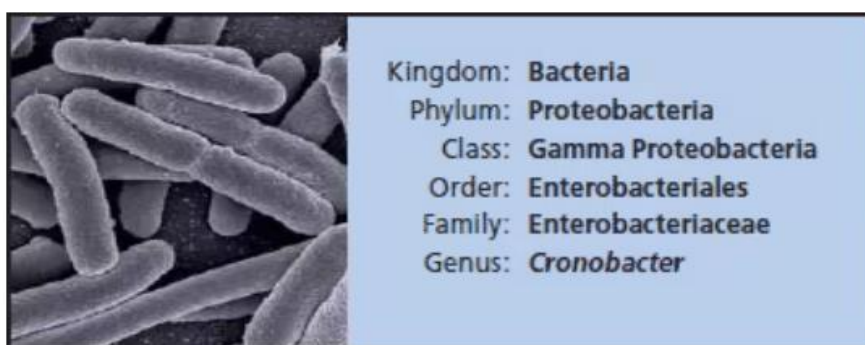
### 2.4.1 Ταξινόμηση

Ανατρέχοντας στο 1980 και τη μελέτη που διεξήγαγε ο Farmer και η ομάδα του, κατάφεραν να ξεχωρίσουν το πρότερα γνωστό ως «*Enterobacter cloacae*» που σχηματίζει κίτρινες αποικίες αποδίδοντας του το όνομα *Enterobacter sakazakii*. Ένα βήμα παραπέρα, χρησιμοποιώντας DNA-DNA υβριδισμό, τεστ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και άλλες βιοχημικές δοκιμές, αποδείχτηκε πως το *Enterobacter sakazakii* συσχετιζόταν το ίδιο με δυο βακτηριακά είδη από διαφορετικά ωστόσο γένη, τα *Enterobacter* και *Citrobacter* αντίστοιχα. Ωστόσο, επιλέχθηκε η ένταξη του στο πρώτο καθώς με αυτό φάνηκε να εμφανίζει τις περισσότερες γονοτυπικές και φαινοτυπικές ομοιότητες (Farmer, 2015). Με τη πρόοδο των μοριακών τεχνικών και επιπλέον δοκιμών, έπρεπε να περάσουν σχεδόν τρεις δεκαετίες έτσι ώστε το *Enterobacter sakazakii* να θεωρηθεί ένα γενετικά ποικιλόμορφο και ταξινομικά πολύπλοκο είδος

απ' ότι αρχικά πιστευόταν και κατά συνέπεια να οδηγήσει τους επιστήμονες στη δημιουργία ενός νέου γένους γνωστό ως *Cronobacter* (Iversen et al., 2007).

#### 2.4.2 Γενικά χαρακτηριστικά

Το *Cronobacter* είναι ένα γένος της οικογένειας Enterobacteriaceae και αποτελεί ένα ραβδόμορφο, προαιρετικά αναερόβιο Gram αρνητικό το οποίο εξασφαλίζει τη κίνηση του μέσω μαστιγίων (Εικόνα 3). Το γένος αποτελείται από έξι είδη, συμπεριλαμβανομένων των *C. sakazakii*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. Dublinensis*, *C. Malonaticus*, *C. Condimenti* και *C. Universalis*. Το εύρος θερμοκρασίας για την ανάπτυξη του *Cronobacter* είναι 6-45°C παρουσιάζοντας βέλτιστες τιμές μεταξύ των 37-43°C, ενώ ο χρόνος διπλασιασμού του στους 22°C ανέρχεται σε περίπου 40 λεπτά (Food Safety Authority of Ireland, 2011). Παράλληλα, αν και υπάρχει διαφορά ανάμεσα στις τιμές ανθεκτικές σταθερότητας (D values), κατά γενική ομολογία τα είδη του γένους θεωρούνται θερμοανθεκτικά.



**Εικόνα 3.** Απεικόνιση αποικιών *Cronobacter sakazakii* και η ταξινόμηση του (Πηγή: Jvo Siegrist, Sigma Aldrich 2012).

Ακόμη, ενδιαφέρον αποτελεί και μια μελέτη που διερευνούσε την αντοχή 12 στελεχών στα οξέα όταν αυτά βρίσκονταν στη στατική φάση. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια μείωση λιγότερη από 1 λογαριθμική τάξη μετά από 5 ώρες σε συνθήκες των 36°C και pH=3.5 μονάδες, ενώ όταν το pH ρυθμίστηκε στις 3 μονάδες το παραπάνω αποτέλεσμα επήλθε κατά τέσσερις ώρες γρηγορότερα. Το βασικό συμπέρασμα της μελέτης ήταν πως ο εγκλιματισμός των στελεχών σε ένα όξινο περιβάλλον ενίσχυσε την αντίσταση των στελεχών στα οξέα κατά τη σταθερή φάση ωστόσο δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ αυτής της αντίστασης και της θερμοανθεκτικότητάς τους (Lambert and Bidlas, 2007).

Ταυτόχρονα, φαίνεται πως τα είδη του γένους *Cronobacter* παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ενάντια στο στρες που προκαλείται κατά τη διαδικασία της ωσμωτικής ξήρανσης σε σχέση με άλλα μέλη της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών (Lang et al., 2017). Σε αντίθεση λοιπόν με τα περισσότερα βακτήρια των οποίων η ανάπτυξη ευνοείται με την αύξηση της ενεργότητας ύδατος, η ίδια αύξηση φαίνεται να ενίσχυσε τη θανάτωση των ειδών *Cronobacter* τα οποία επομένως αναπτύσσονται ευκολότερα μειούμενης της υγρασίας. Μια πιθανή εξήγηση είναι η συσσώρευση τρεχαλόζης (κολλοειδής πολύ-σακχαρήτης), η οποία μπορεί να σταθεροποιήσει τις πρωτεΐνες της μεμβράνης των φωσφολιπιδίων και να προσφέρει έτσι ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα (Breeuwer, 2003). Αυτός είναι και ο κυριότερος λόγος που τα είδη του γένους *Cronobacter* και συγκεκριμένα το *C. sakazakii* προσβάλλουν ξηρές τροφές όπως το γάλα σε σκόνη το οποίο μετέπειτα προστίθεται στις βρεφικές φόρμουλες ενέχοντας σοβαρούς κινδύνους για την ασφάλεια των νεογνών.

Παράλληλα, είναι γνωστό πως ως απόκριση στο ποικίλο περιβάλλον ανάπτυξης τους, τα βακτήρια μπορούν να σχηματίσουν οργανωμένα και δυναμικά οικοσυστήματα γνωστά ως βιοφίλμ. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως το *C. sakazakii* μπορεί να προσκολληθεί ισχυρά σε αβιοτικά υλικά όπως η σιλικόνη, το λατέξ, το ανοξείδωτο ατσάλι και το γυαλί για αρκετούς μήνες ή και χρόνια (Ling et al., 2020). Μάλιστα, φαίνεται πως πολλά καταγεγραμμένα κρούσματα σε κλινικό περιβάλλον ενοχοποιούν την αποίκιση του *C. sakazakii* σε σκεύη προετοιμασίας της βρεφικής φόρμουλας. Παρόμοια ικανότητα φαίνεται να εμφανίζει και σε νωπά τρόφιμα. Τον κίνδυνο αυτό της σύνθεσης βιοφίλμ είχε φανερώσει αρκετά νωρίτερα και ο Beuchat, ο οποίος παρατήρησε πως τα κύτταρα του *C. sakazakii* που συμμετείχαν σε βιομεμβράνες, ήταν πιο ανθεκτικά από τα αντίστοιχα πλαγκτονικά όταν εκτίθονταν σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας ύδατος (Beuchat, et al., 2009). Αν και η πλήρης σύνθεση του εξωκυτταρικού τοιχώματος κατά το σχηματισμό του βιοφίλμ δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, η ύπαρξη κυτταρίνης είναι αποδεδειγμένη (Hartmann, 2010). Συμπερασματικά, η ικανότητα του συγκεκριμένου στελέχους να παράγει βιοφίλμ, σε συνδυασμό με την αντοχή του σε απολυμαντικά/καθαριστικά

υποδεικνύει τη σημασία του σωστού καθαρισμού και τη θέσπιση αυστηρών πρωτοκόλλων τόσο στις βρεφικές κλινικές όσο και στη βιομηχανία τροφίμων.

#### **2.4.3 Επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά**

Επιδημιολογικά, το *C. sakazakii* έχει συσχετιστεί περισσότερο με σποραδικές περιπτώσεις σοβαρών λοιμώξεων της κυκλοφορίας του αίματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως η σήψη και η μηνιγγίτιδα. Φαίνεται πως τα νεογνά χαμηλού βάρους ή πρόωρου τοκετού ( βάρος < 2.5kg και < 30 εβδομάδες αντίστοιχα) αποτελούν ομάδες υψηλού κινδύνου σε σχέση με τα φυσιολογικά βρέφη. Οι επιπλοκές της λοίμωξης από *Cronobacter* στα βρέφη περιλαμβάνουν τη δημιουργία εγκεφαλικού αποστήματος, αναπτυξιακές καθυστερήσεις, κινητικές βλάβες καθώς και θάνατο (FDA, 2023). Αυτό οφείλεται αφενός στο γεγονός πως ο μικροοργανισμός έχει χαμηλή μολυσματική δόση και αφετέρου στο εξασθενημένο ανοσοποιητικό των παραπάνω ομάδων. Συμπτώματα που ενδεχομένως φανερώνουν τη μόλυνση από το στέλεχος αφορούν την εμφάνιση ίκτερου, τις ασυνήθιστες αλλαγές θερμοκρασίας, δυσκολία στην αναπνοή ή εμφάνιση βρόγχων καθώς και ανησυχία του νεογνού, η οποία εκδηλώνεται μέσω μη φυσιολογικών κινήσεων (Singh et al., 2015).

Στα βρέφη, η λοίμωξη από μηνιγγίτιδα που οφείλεται στο *C. sakazakii* εγκαθιδρύεται μεταξύ της τέταρτης και πέμπτης ημέρας μετά το τοκετό και μπορεί να αποβεί μοιραία μέσα σε λίγες ώρες ή ημέρες μετά την έναρξη των πρώτων κλινικών συμπτωμάτων. Αν και τα περιστατικά τη τελευταία δεκαετία έχουν περιοριστεί σημαντικά, το ποσοστό θνητότητας κυμαίνεται μεταξύ 40-80%, ενώ όσα νεογνά καταφέρνουν και επιβιώνουν συνήθως υποφέρουν από σοβαρές νευρολογικές διαταραχές. Αυτό οδήγησε τη Διεθνή Επιτροπή για τις Μικροβιολογικές προδιαγραφές για τα Τρόφιμα, να κατατάξει τα είδη *Cronobacter* ως ένα σοβαρό κίνδυνο για συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες, καθώς είναι ικανό να θέσει σε κίνδυνο την ζωή του ανθρώπου (Chenu and Cox, 2010). Αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης του δεν είναι απόλυτα κατανοητός, σίγουρα περιλαμβάνει την προσκόλληση στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της έκφρασης της επιφανειακής πρωτεΐνης A η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *omp-A* που βρίσκεται στο γονιδίωμα των στελεχών *Cronobacter* (Yan et al., 2012).

## 2.5 Συσχέτιση εμφάνισης *C. sakazakii* σε προϊόντα βρεφικής θρέψης

Η βρεφική φόρμουλα σε σκόνη (Powdered Infant Formula – PIF) αποτελεί μια από τις πιο κοινές πηγές εμφάνισης του *C. sakazakii* ενώ παράλληλα ο μικροοργανισμός μπορεί να ανιχνεύεται σε εξοπλισμό που χρησιμοποιείται κατά τη γέννα, το θηλασμό όπως τα μπουκάλια χορήγησης της τροφής (Centre of Disease Control 2020). Αξιοσημείωτο είναι πως η επιμόλυνση των PIF από το παθογόνο φτάνει έως και το 7%. Είναι γνωστό πως το εντερικό μικροβίωμα νεογνών που θήλασαν «φιλοξενεί» κρίσιμης σημασίας γένη για την ομοιόσταση του όπως τα *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* (Milani et al., 2017). Αντίθετα, οι PIF προδιαθέτουν για μια σημαντική αύξηση της πιθανότητας μόλυνσης από *C. sakazakii* αφού μειονεκτούν στο να εγκαθιδρύσουν μια υγιούς τύπου εντερική χλωρίδα (Backhed et al., 2015).

Αναλυτικότερα, το μητρικό γάλα αντιπροσωπεύει έως και το 30% της σύστασης της χλωρίδας του νεογνού κατά το πρώτο χρόνο ζωής του περιέχοντας πληθώρα ωφέλιμων συστατικών τα οποία προάγουν τη ποικιλομορφία και την ανάπτυξη μικροοργανισμών με προβιοτική δράση (Vandenplas et al., 2015). Προς αυτή τη κατεύθυνση και για τη προστασία των νεογνών ενάντια στις λοιμώξεις που οφείλονται στο *C. sakazakii* και όχι μόνο, σχετικά πρόσφατα ενισχύθηκαν οι PIF τόσο με πρε- όσο και προβιοτικά.

### 2.5.1 Ιστορικό εμφανίσεων *C. sakazakii*

Το *C. sakazakii* μπορεί να καλλιεργηθεί σε θρυπτικό άγαρ σόγιας, παρουσιάζοντας διακριτές (από μορφολογικής άποψης) αποικίες κίτρινου χρώματος. Η συντριπτική πλειοψηφία των αναφερόμενων κρουσμάτων παγκοσμίως αφορούν περιστατικά στις Ηνωμένες Πολιτείες, τη Γαλλία, τη Βραζιλία, την Ιαπωνία και τη Κίνα (Hunter and Bean, 2013). Παραδόξως, πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι και μη-*sakazakii* είδη του *Cronobacter* (*C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. universalis*, *C. dublinensis*, *C. condiment*) θα μπορούσαν δυνητικά να προκαλέσουν νοσηρότητα και απειλητικές για τη ζωή επιπλοκές σε βρέφη και ενήλικες (Forsythe, 2018). Εκτός από το *C. condiment* που δεν έχει εμπλακεί σε κανέναν τεκμηριωμένο κλινικό επεισόδιο, τα άλλα έξι είδη έχουν σημαντική παρουσία με το *C. sakazakii* και το *C. malonaticus* να θεωρούνται υπεύθυνα για τα περισσότερα από αυτά. Επί του παρόντος η κατανόηση μας για τα



παθογόνα είδη *Cronobacter* έχει αποτελέσει αντικείμενο επαναπροσδιορισμών τα τελευταία χρόνια. Ως εκ τούτου, μέχρι να επιτευχθεί η σωστή αναγνώριση κλινικών απομονώσεων των παραπάνω ειδών, η επιδημιολογία και τα στατιστικά στοιχεία που σχετίζονται ή προκαλούνται από αυτά, θα συνεχίσει να είναι ελλιπής. Σε κάθε περίπτωση, μια σύντομη ιστορική αναδρομή στα σημαντικότερα καταγεγραμμένα μαζικά ή σποραδικά περιστατικά που σχετίζονται με βρέφη παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 που ακολουθεί.

**Πίνακας 1.** Περιστατικά (μαζικά-σποραδικά) σχετιζόμενα με λοίμωξη νεογνών από *C. sakazakii* (Πηγή: Henry and Fouladkhah, 2019)

Χώρα	Χρονολογία	Αριθμός περιπτώσεων	Πληροφορίες βρεφών	Συμπτώματα	Θνητότητα
<b>Αγγλία</b>	1958	3	1: 38 εβδ. 2-3: 32 εβδ.	Μηνιγγίτιδα	3/3
<b>ΗΠΑ</b>	1979	1	38 εβδ.	Σήψη Αντιβιοτικά	0/1
<b>Ολλανδία</b>	1977-1981	8	12: 36 εβδ. 2: 39 εβδ. 3-4: 32 εβδ. 5-6: 38 εβδ. 7: < 37 εβδ. 8: 30 εβδ.	ΕΔ	6/8
<b>ΗΠΑ</b>	1980	1	1 μήνα	↓ Γλυκόζη ↑ Λευκά αιμ. Καθυστ. Ανάπτυξης Εκτετ. θεραπεία	0/1
<b>Ελλάδα</b>	1982	2	ΕΔ	ΕΔ	ΕΔ
<b>Ελλάδα</b>	1984	11	ΕΔ	ΕΔ	4/11
<b>Ισλανδία</b>	1986-1987	3	1: 36 εβδ. 2: Συν. Down 3: 38 εβδ.	Καθυστ. Ανάπτυξης Μηνιγγίτιδα Καθυστ. Ανάπτυξης	1/3
<b>Ισραήλ</b>	1993-1998	4	1: > 37 εβδ. 2: 36 εβδ. 3: 6 χρονών 4: >37 εβδ.	Μηνιγγίτιδα ΕΔ	ΕΔ
<b>ΗΠΑ</b>	2011	2	ΕΔ	ΕΔ	2/2
<b>Αυστραλία</b>	2015	1	27 εβδ.	Σήψη	1/1
<b>ΗΠΑ</b>	2016	1	26 εβδ.	Σήψη	1/1

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

### Εντερικός μικροβιόκοσμος

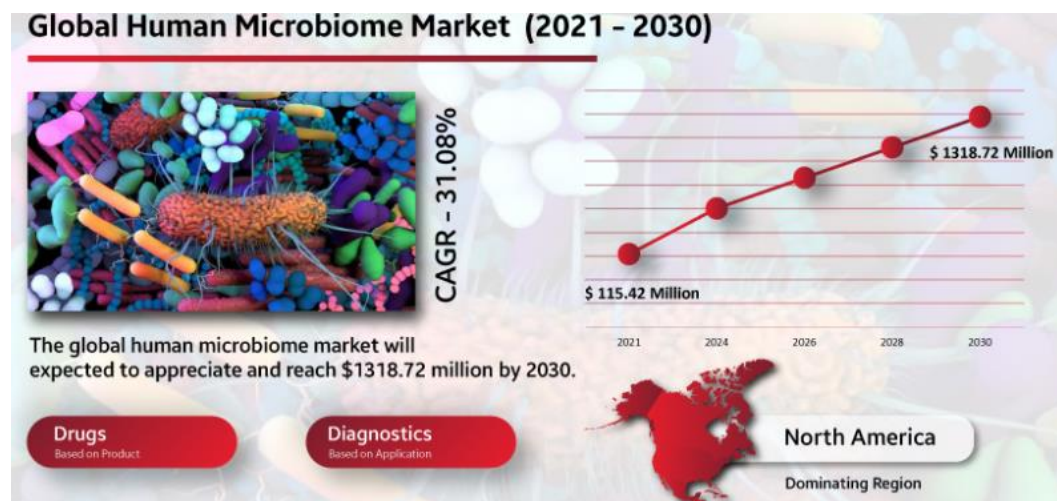
#### 3.1 Η έννοια του μικροβιώματος

##### 3.1.1 Σημασία και εμπορικά μεγέθη

Στις μέρες μας, η μελέτη της σύνθεσης, της δομής και των λειτουργικών ιδιοτήτων του ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος είναι ένα ταχέως εξελισσόμενο επιστημονικό πεδίο. Πράγματι, είναι γεγονός πως η έρευνα πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο έχει μεταπηδήσει από ένα απλώς νέο πεδίο σε μια ακμάζουσα ερευνητική περιοχή, η οποία περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς κλάδους όπως η ιατρική, η φαρμακολογία και η διατροφή. Αυτό αποτυπώνεται και από πρόσφατους αριθμούς που σχετίζονται τόσο με τη βασική ή εφαρμοσμένη έρευνα αλλά και με την αγορά γύρω από αυτό. Για παράδειγμα, είναι αξιοσημείωτο πως μόνο τη τελευταία πενταετία τα επιστημονικά άρθρα που περιλαμβάνουν τους όρους “gut microbiome-gut microbiota”, ξεπερνούν τις 22000. Παράλληλα, μόνο τη τελευταία πενταετία έχουν δαπανηθεί περισσότερα από 1,7 δισεκατομμύρια δολάρια στο συγκεκριμένο κλάδο ενώ τα πολλά σημαντικά και υποσχόμενα έως τώρα αποτελέσματα αναμένεται να ενισχύσουν ακόμη περισσότερο την αγορά αλλά και τις ιδιωτικές επενδύσεις γύρω από το μικροβίωμα.

Η σημασία του εντερικού μικροβιώματος αποτυπώθηκε ήδη από τα μέσα της προηγούμενης δεκαετίας όπου αρκετά ερευνητικά project προσπάθησαν να αποκρυπτογραφήσουν τους μηχανισμούς και τις δράσεις στις οποίες αυτό εμπλέκεται. Τέτοια ερωτήματα αφορούν: (α) την αλληλεπίδραση συστατικών των τροφών και των βακτηριακών πληθυσμών, (β) τη χορήγηση συμπληρωμάτων που «εκμεταλλεύονται» μηχανισμούς του εντερικού μικροβιώματος, (γ) τη στόχευση του εντερικού μικροβιώματος για τη πρόληψη και θεραπεία ασθενειών σχετιζόμενων με αυτό αλλά και πολλά άλλα. Μερικά από τα πιο γνωστά παγκόσμια ερευνητικά προγράμματα αφορούν: α) το Human Microbiome Project-HMP με την πρωτοβουλία του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ) αλλά και το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα Metagenomic of the Human Intestinal Tract-MetaHIT (HMP consortium 2012, Qin, et al., 2010). Παράλληλα, ο σύνθετος ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης αναμένεται να

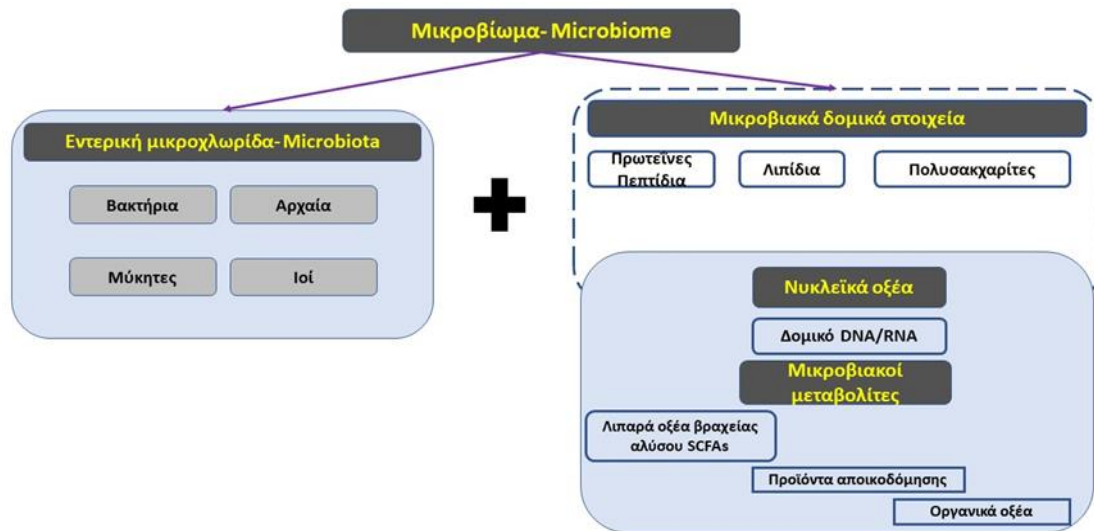
γνωρίσει τεράστια ανάπτυξη ξεπερνώντας το 30% έως το 2030, κάτι που θα έχει σημαντικό αντίκτυπο σε όλο το φάσμα του δικτύου και αγοράς συμπληρωμάτων που σχετίζονται με το εντερικό μικροβίωμα (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Παγκόσμια αγορά σχετιζόμενη με το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα για τα έτη 2021-2030 (Global Human Microbiome Market) Πηγή: Strategic marketing research, 2022)

### 3.1.2 Ορισμοί ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος

Στην αγγλική ορολογία χρησιμοποιούνται δυο διαφορετικοί όροι για να περιγράψουν το εντερικό μικροβίωμα. Ο όρος “microbiome” χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει συγκεκριμένες μικροβιακές κοινότητες σε ένα συγκεκριμένο και καλά καθορισμένο σύστημα που έχει διακριτές φυσικοχημικές ιδιότητες. Ο συγκεκριμένος όρος δεν αναφέρεται μόνο στους μικροβιακούς πληθυσμούς που εμπλέκονται, αλλά περιλαμβάνει επίσης το θέατρο δραστηριότητας τους (π.χ τα ίδια τα δομικά συστατικά τους, τους παραγόμενους μεταβολίτες τους ή ακόμη και τις επικρατούσες συνθήκες περιβάλλοντος). Αντίθετα, ο όρος “microbiota” ή στα ελληνικά μικροχλωρίδα αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών που μπορούν να ανήκουν σε διαφορετικά βασίλεια . Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5 που ακολουθεί, ο όρος microbiome είναι ένας ευρύτερος όρος που εσωτερικά περιλαμβάνει τον όρο της μικροχλωρίδα. Ωστόσο στις μέρες μας, παρόλο που οι παραπάνω ορισμοί είναι σαφώς διαφορετικοί, χρησιμοποιούνται εναλλακτικά για να περιγράψουν το ίδιο πράγμα.



**Εικόνα 5.** Σχηματική αναπαράσταση των εννοιών της εντερικής μικροχλωρίδας (microbiota) και του μικροβιώματος (microbiome) (Πηγή Berg, G., 2020)

### 3.2 Βασικά χαρακτηριστικά του ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος

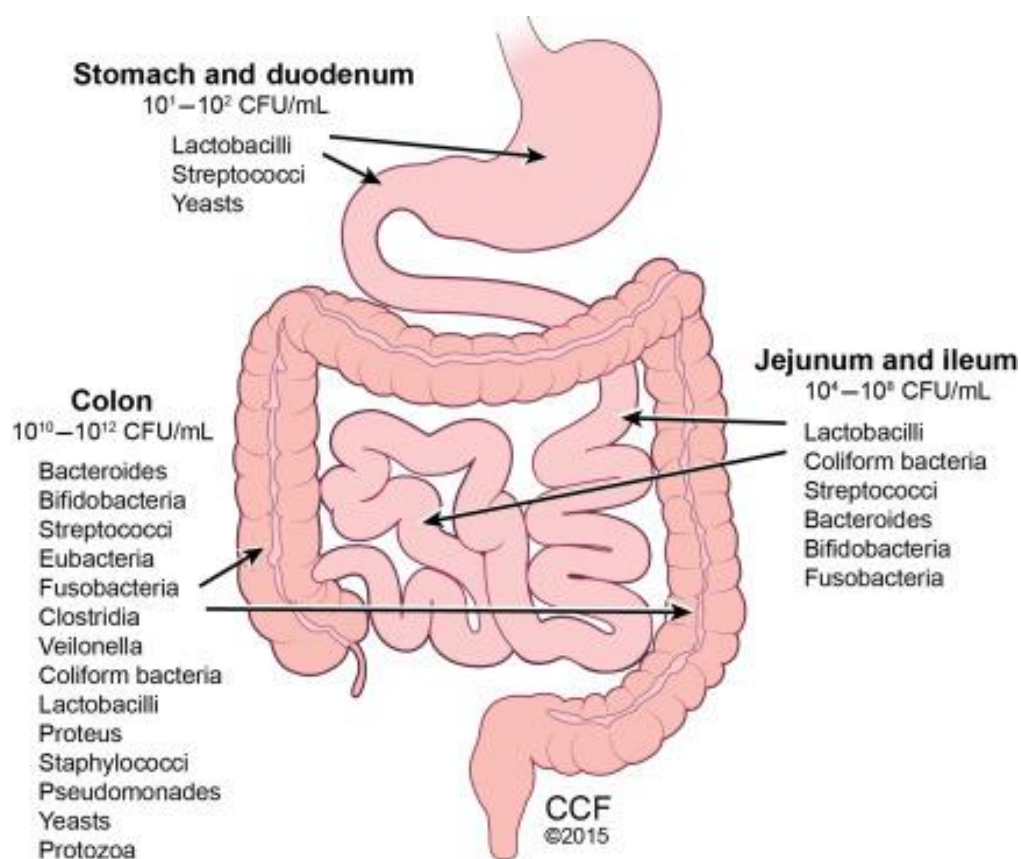
#### 3.2.1 Ομοιόσταση

Θεωρητικά, από ανοσολογικής απόψεως αρκετοί μικροοργανισμοί θεωρούνται δυνητικά παθογόνοι από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή που τους αναγνωρίζει και τους εξαλείφει. Ωστόσο, η πλειονότητα των βακτηρίων του εντέρου είναι μη-παθογόνοι, συμβιωτικοί και συνυπάρχουν αρμονικά με τα εντεροκύτταρα. Η συμβίωση αυτή αντικατοπτρίζει και τη σημαντικότητα εγκαθίδρυσης ενός υγιούς εντερικού μικροβιώματος καθώς το τελευταίο φαίνεται να ενισχύει μια σειρά από βασικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται. Αντίθετα, η αλλαγή στην ομοιόσταση της μικροχλωρίδας του εντέρου μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες καταστάσεις, γνωστές με τον όρο δυσβίωση, η οποία με τη σειρά της σχετίζεται με πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις ή άλλες ασθένειες όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης και διάφοροι τύποι καρκίνου του εντέρου (Hillman et al., 2017).

#### 3.2.2 Σύσταση ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος

Είναι γνωστό πως από λειτουργικής όσο και από ανατομικής και δομικής άποψης το γαστρεντερικό σύστημα χωρίζεται: (α) στο στομάχι, (β) στο λεπτό έντερο το οποίο περιλαμβάνει το δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα και τον ειλέο αλλά και γ) στο παχύ

έντερο όπου συγκαταλέγονται το κόλον και το ορθό. Κάθε δομικό «διαμέρισμα» από διαφορετικές συνθήκες όπως pH, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών ή η διαθεσιμότητα οξυγόνου και ως εκ τούτου, κάθε όργανο προάγει τη δική του ανάπτυξη μικροοργανισμών όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6 (Tsiantas, K., 2022). Αξίζει να σημειωθεί πως δεδομένων των συνθηκών που επικρατούν, δεν αλλάζει μόνο η σύσταση των βακτηριακών πληθυσμών αλλά και η ποσότητα τους. Ενδεικτικά αναφέρεται πως το στομάχι απεικονίζει έως και πέντε μεγέθους λιγότερους μικροοργανισμούς συγκριτικά με το λεπτό ή το παχύ έντερο (Flint et al., 2012).



**Εικόνα 6.** Απεικόνιση της ποικιλομορφίας και της αφθονίας των βακτηριακών πληθυσμών στα διαφορετικά σημεία της γαστρεντερικής οδού (Πηγή: Cresci, G., 2019)

Συνολικά, μια υψηλή ποικιλομορφία ταξονομικών κατηγοριών καθώς και μια μεγάλη ποικιλομορφία βακτηριακών πληθυσμών αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά ενός υγιούς εντερικού μικροβιώματος. Ταξονομικά, η μικροχλωρίδα του εντέρου αποτελείται από διαφορετικά είδη βακτηρίων ομαδοποιημένα κατά φύλα, τάξεις, οικογένειες, γένη και είδη με το κόλον να θεωρείται το πιο «πυκνοκατοικημένο» από

τα παραπάνω οικοσυστήματα παρουσιάζοντας επίσης και τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Μιλώντας με αριθμούς, αν και μόνο μερικά φύλα απαντώνται στο κόλον, αυτά αντιπροσωπεύουν περισσότερα από 160 είδη (Laterza et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, τα κυριότερα φύλα αφορούν τα Firmicutes, τα Bacteroidetes, τα Actinobacteria, τα Proteobacteria, τα Fusobacteria και τα Verrucomicrobia, με τα δυο πρώτα να αποτελούν έως και το 90% του συνολικού εντερικού μικροβιώματος (Rinninella et al., 2019). Το φύλο των Firmicutes αποτελείται από περισσότερα από διακόσια διαφορετικά γένη με κυριότερα από αυτά να είναι: *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Rumminococcus* και *Clostridium* με τα τελευταία να κατέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό (95%). Αντίθετα, τα Bacteroidetes χαρακτηρίζονται από γένη όπως τα *Bacteroides* και *Prevotella* (Arumugam et al., 2011).

Είναι σημαντικό ωστόσο να τονιστεί πως η μικροχλωρίδα του εντέρου κάθε ανθρώπου διαμορφώνεται στην πρώιμη ζωή του ανθρώπου ενώ η σύνθεση της εξαρτάται από την εβδομάδα κύησης, τον τύπο του τοκετού, τον τύπο διατροφής (θηλασμός ή χορήγηση φόρμουλας) αλλά και άλλους εξωτερικούς παράγοντες όπως τη χρήση αντιβιοτικών. Αυτή η επίκτητη και καθαρά εξατομικευμένη σύσταση παραμένει σχετικά σταθερή μέχρι την ενήλικη ζωή, ωστόσο διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο εξαιτίας των εντεροτύπων αλλά και άλλων παραγόντων όπως η συχνότητα άσκησης, του επιπέδου δείκτη μάζας σώματος, των πολιτιστικών και διατροφικών συνηθειών και του τρόπου ζωής γενικότερα. Από τα ανωτέρω εξάγεται το πολύ σημαντικό συμπέρασμα πως δεν υπάρχει μοναδική βέλτιστη σύνθεση μικροχλωρίδας του εντέρου, καθώς είναι διαφορετική για κάθε άτομο (Hassan and Wang, 2019).

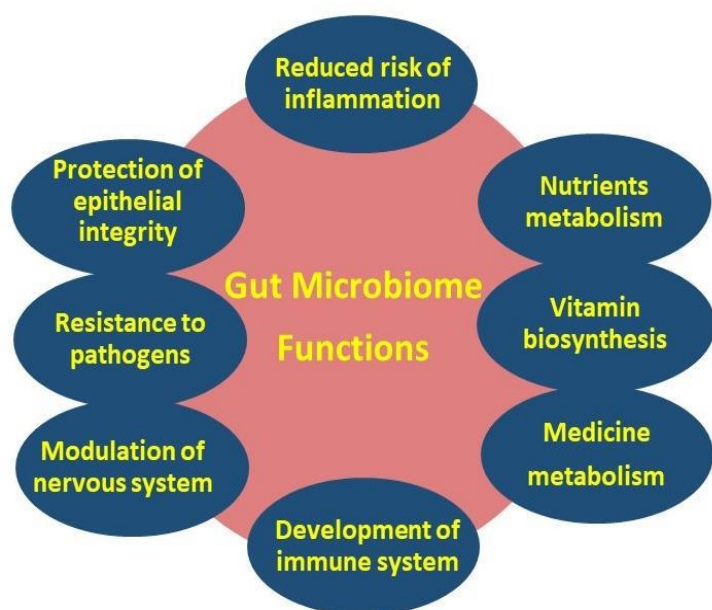
### **3.2.3 Διασύνδεση εντερικού μικροβιώματος με άλλα όργανα**

Τέλος, αξιοσημείωτο είναι πως αρκετές διαταραχές του εντέρου δεν αφορούν αμιγώς το γαστρεντερικό σύστημα αλλά και άλλα απομακρυσμένα όργανα. Μέσα από μια σύνθετη επικοινωνία που περιλαμβάνει το κεντρικό νευρικό σύστημα, το αυτόνομο αλλά και το εντερικό νευρικό σύστημα, δημιουργούνται αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν τόσο το μικροβίωμα όσο και άλλους παράγοντες όπως η παραγωγή μεταβολιτών (Schroeder, J., 2016). Για παράδειγμα, πρόσφατες

μελέτες συνδέουν το δίαυλο επικοινωνίας εντέρου εγκεφάλου (gut-brain axis) με την ανοσοαπόκριση του ξενιστή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη ρύθμιση των ενδοκρινικών λειτουργιών του εντέρου και του μεταβολισμού των λιπιδίων (Bartista et al., 2017).

### 3.3 Βασικές λειτουργίες μικροβιώματος

Η μικροχλωρίδα του εντέρου διατηρεί μια συμβιωτική σχέση με τον βλεννογόνο και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του εντέρου μέσα από πτυχές της μεταβολικής, ανοσολογικής και προστατευτικής λειτουργίας. Αδιαμφισβήτητα πρόκειται για ένα σύστημα με μεγάλη μεταβλητότητα και πολύ έντονη μεταβολική δραστηριότητα (Sonnenburg et al., 2005). Αυτά τα χαρακτηριστικά του μικροβιώματος έχουν στρέψει το ενδιαφέρον από την σύσταση και αφθονία των βακτηριακών πληθυσμών στις λειτουργικές πτυχές που αυτά επηρεάζουν όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7 που ακολουθεί



**Εικόνα 7.** Σχηματική αναπαράσταση των βασικών λειτουργιών στις οποίες εμπλέκεται το εντερικό μικροβίωμα (μειωμένο ρίσκο φλεγμονής, μεταβολισμός τροφών και φαρμάκων, βιοσύνθεση βιταμινών, ρύθμιση ανοσοποιητικού, προστασία του φραγμού του επιθηλίου, αντοχή σε παθογόνα και ανάπτυξη ανοσοποιητικού) (Πηγή: Tsiantas, K., 2022)

Είναι γνωστό πως το εντερικό μικροβίωμα λαμβάνει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από την διατροφή. Ταυτόχρονα όμως αλληλοεπιδρά με πολλά αυτά παράγοντας ενώσεις (μεταβολίτες) με πιθανές ευεργετικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου. Πιο συγκεκριμένα, η ζύμωση εκείνων των υδατανθράκων που παρέμειναν άθικτοι κατά τη διαδικασία της πέψης από οργανισμούς του παχέος εντέρου όπως τα *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* και *Enterobacteria* έχει ως αποτέλεσμα τη παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs) όπως το βουτυρικό, το οξικό και το προπιονικό οξύ, τα οποία εμπλέκονται σε μια σειρά από θετικές για την υγεία του ξενιστή δράσεις (Morrison and Preston, 2016).

Παράλληλα, η ικανότητα του εντερικού μικροβιώματος να μεταβολίζει ξενοβιοτικά όπως τα φάρμακα, είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς αναμένεται να επηρεάσει το επίπεδο αποτελεσματικότητας των θεραπειών για διάφορες ασθένειες στο μέλλον. Για παράδειγμα, ήδη σχεδιάζονται και αναπτύσσονται συμπληρώματα ειδικού σκοπού για γυναίκες με οστεοπενία στην εμμηνόπαυση, τα οποία θα εκμεταλλεύονται μηχανισμούς του εντερικού μικροβιόκοσμου έτσι ώστε να ενισχύουν την οστική ανακατασκευή (Seely et al., 2021). Ακόμη ένα παράδειγμα μεταβολισμού των φαρμάκων που προκαλείται από το μικροβίωμα είναι η αποσύζευξη του αντικαρκινικού φαρμάκου irinotecan από τη μικροβιακή β-γλυκορονιδάση που μπορεί να συμβάλει στις ανεπιθύμητες ενέργειες του όπως η διάρροια και η ανορεξία (Wallace et al., 2010).

Μια ακόμη σημαντική λειτουργία στην εμπλέκεται το εντερικό μικροβίωμα είναι η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και της λειτουργικότητας της γαστρεντερικής οδού. Ενδιαφέρον αποτελεί πως αρκετοί μικροοργανισμοί όπως το είδος *Bacteroides thetaiotaomicron* προάγουν την επιδερμική έκφραση αντιμικροβιακών πρωτεϊνών που θωρακίζουν τον φραγμό του επιθηλίου (Lutgendorff et al., 2008). Για να αναλογιστεί κανείς την αξία της παραπάνω δράσης αξίζει να αναφερθεί πως από την άλλη μεριά το *H. pylori* παράγει ουρεάση για να αυξήσει το pH και να μειώσει το ιξώδες του βλεννογόνου έτσι ώστε να ευνοήσει την διείσδυση του στο επιθηλιακή επιφάνεια (Celli et al., 2009). Επιπρόσθετα, και συγκεκριμένων στέλεχος *Lactobacillus* παράγει δυο υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (p40 και p75) οι οποίες



προλαμβάνουν την απόπτωση που προκαλείται από κυτοκίνες στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (Yan, F., 2011).

### 3.4 Εντερικό μικροβίωμα και τα πρώτα στάδια της ζωής

Μέχρι και πριν χρόνια επικρατούσε η άποψη πως η γαστρεντερική οδός των νεογνών θεωρούταν στείρα μέχρι να αποικηθεί από μικροοργανισμούς κατά τη γέννα. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες φανέρωσαν τη παρουσία μικροοργανισμών στο αμνιακό υγρό και σάκο, τον πλακούντα και το μηκνίο. Αναλυτικότερα, ο Gosalbes παρατήρησε πως στο μικροβίωμα του μηκνίου κυριαρχούν βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Gosables et al., 2013). Συνολικά, όπως φαίνεται και στον πίνακα 2, πάρα πολλοί διαφορετικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη της εντερικής χλωρίδας των νεογνών κατά τους πρώτους μήνες ζωής.

**Πίνακας 2.** Διαφοροποιήσεις εντερικού μικροβιώματος κατά τα πρώτα στάδια της ζωής

Παράγοντας		Actinobacteria	Bacteroidetes	Firmicutes	Proteobacteria	Ποικιλομορφία
Εβδομάδα κύησης	<37 εβδομάδων	<i>Bifidobacterium</i> ↓	Bacteroides ↓	Firmicutes ↓	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterococcus spp</i> ↑	↓
	>37 εβδομάδων	<i>Bifidobacterium</i> ↑	Bacteroidetes ↑	<i>Lacnospiraceae</i> ↑	<i>Enterobacteriaceae</i> ↓	↑
Τύπος γέννησης	Φυσιολογικός τοκετός	<i>Bifidobacterium longum</i> ↑ <i>Bifidobacterium catenulatum</i> ↑	<i>Prevotella</i> ↑ <i>Bacteroides fragilis</i> ↑	<i>Lactobacillus</i> ↑	<i>Escherichia</i> ↑	↑
	Καισαρική τομή	<i>Corynebacterium</i> ↑ <i>Propionibacterium</i> ↑	<i>Bacteroides</i> ↓	<i>Staphylococcus</i> ↑	<i>Escherichia</i> ↓ <i>Shigella</i> ↓	↓
Τύπος τροφής	Μητρικό γάλα	<i>Bifidobacterium</i> ↑↑	-	<i>Lactobacillus</i> ↑ <i>Staphylococcus</i> ↑	<i>Enterococcus</i> ↑	↑
	Τεχνητό γάλα Artificial milk	<i>Bifidobacterium</i> ↑	<i>Bacteroides</i> ↑	<i>Clostridium</i> ↑ <i>C. difficile</i> ↑	<i>Escherichia</i> ↑	↓
	Εισαγωγή στερεών	<i>Bifidobacterium</i> ↑	<i>Bacteroides</i> Bacteroidetes ↑	Firmicutes ↑ <i>Lactobacilli</i> ↑	-	↑
Ηλικία	<1 έτους	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Veillonella</i> <i>C. coccoides</i>	-	↑
	2-3 ετών Ενηλικίωση	<i>Bifidobacteriaceae</i> <i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	Proteobacteria	↑
	>70 ετών	<i>Bifidobacterium</i> ↓	-	<i>Clostridium</i> ↓	Proteobacteria ↑	↓

Αξιοσημείωτο είναι πως ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την εγκαθίδρυση του εντερικού μικροβιώματος του νεογνού αποτελούν οι συνθήκες που επικρατούν κατά τη γέννηση όπως φαίνεται και στον παραπάνω Πίνακα 1. Έτσι, κατά το φυσιολογικό τοκετό (vaginal delivery), η χλωρίδα του νεογνού τείνει να προσομοιάζει τη χλωρίδα της μητέρας. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η σύνθεση της

χλωρίδας αφορά κυρίως είδη του γένους *Lactobacillus*, *Prevotella* και *Sneathia*. Από την άλλη μεριά, κατά την καισαρική τομή, το εντερικό μικροβίωμα του νεογνού τείνει να προσομοιάζει τη σύνθεση της χλωρίδας του δέρματος με κυρίαρχα είδη να αφορούν τα είδη του γένους *Staphylococcus*, *Corynebacterium* και *Propionibacterium* (Dominguez et al., 2010).

Παράλληλα, αν και δεν είναι πλήρως αποδεδειγμένο, φαίνεται πως τα νεογνά που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε σχέση με αντίστοιχα γεννημένα με καισαρική τομή κάτι το οποίο έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αλλεργιών (π.χ αλλεργική ρινίτιδα, άσθμα κ.α). Συμπληρωματικά, έρευνες δείχνουν πως η αποίκιση της γαστρεντερικής οδού από τα είδη του γένους *Bacteroides* και *Bifidobacterium* πραγματοποιείται ένα περίπου μήνα μετά τη γέννηση, ενώ παρουσιάζεται πλήρης απουσία του *Clostridium difficile* στο ίδιο διάστημα (Biasucci et al., 2008).

Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τη χλωρίδα του εντέρου των βρεφών αφορά τη διατροφή τους. Είναι γνωστό ότι τόσο ο θηλασμός όσο και η χορήγηση βρεφικής φόρμουλας διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην εγκαθίδρυση του εντερικού μικροβιώματος (Tanaka and Nakayama, 2017). Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες εστιάζουν όχι μόνο στη ανάλυση του μητρικού γάλακτος ή των διάφορων σκευασμάτων βρεφικών φόρμουλών αλλά και στη διερεύνηση του αντίκτυπου που αυτά έχουν στον εντερικό μικροβιόκοσμο των νεογνών. Όσον αφορά το μητρικό γάλα, περιέχει συγκεκριμένου τύπου ολιγοσακχαρίτες (γνωστοί και ως Human Milk Oligosaccharides – HMOs), οι οποίοι πέπτονται μερικώς στο λεπτό έντερο και ως εκ τούτου, φτάνουν στο κόλον όπου ζυμώνονται από διάφορα είδη βακτηρίων όπως αυτά του γένους *Bifidobacterium* για να παράξουν λιπαρά οξέα βραχέας αλύσου (SCFAs). Ενδεικτικό είναι όπως παρουσιάζει και ο Matsuki, πως όσο ο αριθμός των *Bifidobacterium* αυξάνεται, τόσο μειώνονται τα επίπεδα HMOs στα κόπρανα ενώ παράλληλα τόσο αυξάνεται και η παραγωγή SCFAs όπως το acetic και lactic acid (Matsuki et al., 2016). Υπό αυτό το πρίσμα, έχουν αναπτυχθεί προϊόντα τα οποία τείνουν να προσομοιάζουν τόσο τη σύσταση όσο και τις ευεργετικές ιδιότητες του μητρικού γάλακτος, με τις διαφορές ωστόσο να παραμένουν σημαντικές. Για παράδειγμα, τα νεογνά που τους χορηγείται βρεφική φόρμουλα εμφανίζουν

υψηλότερα επίπεδα *C. Difficile*. Μια άλλη μελέτη φανέρωσε η σύσταση της εντερικής χλωρίδας νεογνών που θήλασαν ήταν ενισχυμένη με αναερόβιους μικροοργανισμούς όπως τα *Bacteroides* και *Clostridium* (Marcobal et al., 2011).

### 3.5 Προσομοίωση εντερικού συστήματος

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το εντερικό μικροβίωμα διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε μια σειρά από βιολογικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός των τροφών και η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, ενώ ταυτόχρονα η διατάραξη της ισορροπίας του σχετίζεται με πληθώρα νοσημάτων. Ως εκ τούτου, θεωρείται υψίστης σημασίας η παρακολούθηση όλων των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ της εντερικής χλωρίδας και του περιβάλλοντος του ξενιστή. Υπό αυτό το πρίσμα, συχνά απαιτούνται *in vitro* μελέτες έτσι ώστε να αποκτηθεί μια σε βάθος μηχανιστική εικόνα.

Σε πρακτικό επίπεδο, τέτοιες μελέτες πρέπει να λαμβάνουν υπόψη πολλούς παράγοντες όπως η τα μεταβλητά επίπεδα οξυγόνου καθώς και η περισταλτικότητα του εντέρου (von Martels et al., 2017). Αν και κατά την ανάπτυξη *in vitro* μοντέλων, η μεγάλη επαναληψιμότητα θεωρείται σημαντικό πλεονέκτημα, η ακριβής εξομοίωση (μίμηση) της γαστρεντερικής κατάστασης είναι πρακτικά αδύνατη. Ιδανικά, τέτοια μοντέλα προσομοίωσης, επιτρέπουν την αξιολόγηση άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων ξενιστών και των μικροβίων όπως ακριβώς αυτά συνυπάρχουν στη γαστρεντερική οδό. Επί του παρόντος οι συνθήκες προσομοίωσης επηρεάζονται από το τι ακριβώς μελετάται. Για παράδειγμα, υπάρχουν μοντέλα που επιτρέπουν τη μελέτη μεμονωμένων τμημάτων (π.χ επιθηλιακά κύτταρα ή βλεννογόνου του εντέρου) του οικοσυστήματος της γαστρεντερικής οδού αλλά και μοντέλα που επιτρέπουν την εστίαση μόνο στον εντερικό μικροβιόκοσμο.

Επιθηλιακές κυτταρικές σειρές όπως τα Caco-2, HT-29, T-84 και DLD-1 αποτελούν τα πλέον αντιπροσωπευτικά και χρησιμοποιούμενα είδη σε προσομοιώσεις που αφορούν το εντερικό επιθήλιο (Tsilingiri et al., 2012). Αντίστοιχα, τα εντερικά μοσχεύματα χαρακτηρίζονται από το πλεονέκτημα πως διασφαλίζεται η ακεραιότητα της στιβάδας του εντερικού βλεννογόνου. Πιο πρόσφατα, δοκιμάστηκε και καθιερώθηκε η εγκαθίδρυση εντερικών οργανοειδών ως μοντέλα εξομοίωσης του

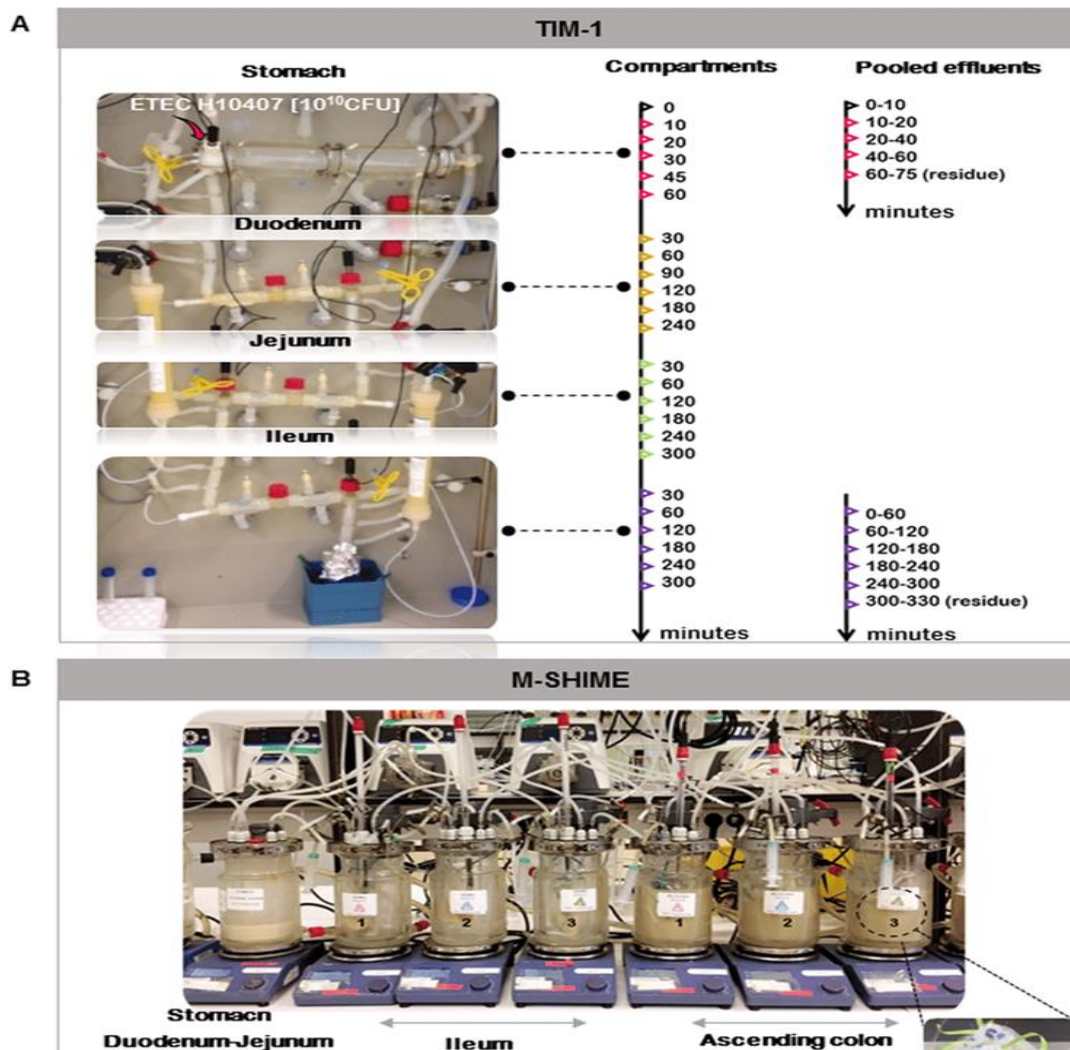
ανθρώπινου εντερικού επιθηλίου περιέχοντας όλους τους κύριους τύπους επιθηλιακών κυττάρων (Lukovac et al., 2014). Αξίζει να αναφερθεί πως αυτά τα ψευτο-οργανίδια μπορούν να αναπτυχθούν από βλαστοκύτταρα του εντέρου και να παραμείνουν γενετικά ενεργά και σταθερά σε κυτταρο-καλλιέργειες για πολλές διαδοχικές διαιρέσεις. Παράλληλα, συνεχίζουν να διατηρούν αναλλοίωτα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη προέλευση τους, επιτρέποντας το διαχωρισμό τους μεταξύ του κόλον, ειλεού, της νήστιδας και του δωδεκαδάκτυλου.

Όσον αφορά την ανάπτυξη μοντέλων προσομοίωσης για τη μελέτη του ανθρώπινου εντερικού μικροβιόκοσμου, τα *in vitro* συστήματα TIM-2 και SHIME χρησιμοποιούνται ευρέως αυτή τη στιγμή (von Martels et al., 2017) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8. Πιο συγκεκριμένα, το TIM-2 σχεδιάστηκε για να προσομοιώνει τις συνθήκες που επικρατούν στο εγγύς (proximal) κόλον. Επιπρόσθετα, ο έλεγχος της κινητικότητας, η ρύθμιση του pH και της θερμοκρασίας ελέγχονται σε αυτό το σύστημα έτσι ώστε να τείνουν να μιμούνται μια *in vivo* ανθρώπινη κατάσταση. Πρακτικά το TIM-2 επιτρέπει την αξιολόγηση πειραμάτων ζύμωσης (fermentation) και κατ' επέκταση την αξιολόγηση των επιπτώσεων πρόσληψης πρεβιοτικών και προβιοτικών συμπληρωμάτων στη μικροβιακή σύνθεση (Kortman et al., 2016).

Από την άλλη το SHIME περιέχει πέντε παράλληλα συνδεδεμένα δοχεία τα οποία είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε καθένα από αυτά να μιμείται και ένα βακτηριακό διαμέρισμα της γαστρεντερικής οδού ενός ενήλικου ανθρώπου. Σε αυτό το μοντέλο το «ενδοαυλικό περιεχόμενο» αναδύεται και ελέγχεται με pH. Ταυτόχρονα προστίθενται παγκρεατικά ένζυμα και χολικά άλατα για να προσομοιάζεται ακόμη περισσότερο μια *in vivo* κατάσταση. Το SHIME μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλινικές παρεμβάσεις όπως η χορηγήση διαφορετικών στελεχών προβιοτικών ή πρεβιοτικών (Terpend et al., 2013).

Συνοψίζοντας, τα συστήματα που περιγράφηκαν παραπάνω ενδέχεται να προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την απόκριση του βλεννογόνου του εντέρου ή τις άμεσες επιπτώσεις διατροφικών παρεμβάσεων στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Ωστόσο, παρά την ευρεία χρήση τους, εξακολουθούν να υπάρχουν προκλήσεις και περιορισμοί (Li and Zhang, 2022). Για παράδειγμα, κανένα από τα τρέχοντα μοντέλα δεν είναι επικυρωμένο με δεδομένα *in vivo* κυρίως λόγω

των εγγενώς πολύπλοκων φυσιολογικών συνθηκών που επικρατούν στον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα. Επιπλέον, τα παραπάνω μοντέλα δεν προσομοιάζουν πλήρως τη διαδικασία της πέψης. Για παράδειγμα, το μάσημα και η επεξεργασία των τροφών όσο αυτή αλληλεπιδρά με το σάλιο συχνά παραλείπεται ή δεν εκτιμάται όσο θα έπρεπε παρόλο που είναι ένα κρίσιμο στάδιο όσον αφορά τον όγκο και τη δομή των τροφών που θα καταλήξουν στο παχύ έντερο. Στο σύνολο τους αυτές οι παρατηρήσεις, μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη πιο προηγμένων μοντέλων προσομοίωσης για την καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης της διατροφής με την εντερική χλωρίδα.



**Εικόνα 8.** Σχηματική αναπαράσταση των δυο πιο χρησιμοποιούμενων μοντέλων προσομοίωσης: TIM-1 (A) και SHIME (B) (Πηγή: Roussel et al., 2020)

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>

### Πειραματικός Σχεδιασμός - Υλικά και Μέθοδοι

#### 4.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός είχε δύο στάδια τα οποία ήταν τα ακόλουθα:

**A]** Εμπορικά διαθέσιμη βρεφική τροφή ανασυστάθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του παραγωγού και κατόπιν διαμοιράστηκε ισομερώς σε δύο παρτίδες A και B. Η παρτίδα A επιμολυσμένη με *C. sakazakii* παρέμεινε ως είχε ενώ στη δεύτερη προστέθηκε εμπορικό παρασκεύασμα σκόνης προβιοτικών βακτηρίων εμπλουτισμένων με πρεβιοτικά συστατικά. Τα δύο δείγματα παρέμειναν προς επώαση για 24 h σε κλίβανο θερμοκρασίας 20°C.

**B]** Μετά από 12 h επώασης, από τις παρτίδες A και B ελήφθησαν 15 mL και συμπληρώθηκαν με 135 mL νέας μη-επιμολυσμένης βρεφικής τροφής. Αυτές οι παρτίδες αποτέλεσαν τα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν κατά τη διάβασή τους από την εξομίωση που γαστρεντερικού συστήματος.

#### 4.2 Αντιδραστήρια

Για τη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά-αντιδραστήρια:

##### **A] Υποστρώματα και Αραιωτικά Υγρά:**

Θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar για την εκλεκτική καλλιέργεια και απομόνωση οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και *Bifidobacterium* spp. Θρεπτικό υπόστρωμα CCI agar για την εκλεκτική απομόνωση του *Cronobacter sakazakii*. Buffered peptone water για τη πραγματοποίηση διαδοχικών αραιώσεων.

##### **B] Σύστημα Τροφίμου:**

Βρεφική τροφή Sanilac 1 (τροφή εμπορίου για βρέφη έως και 6 μήνες) Σημειώνεται πως η συγκεκριμένη τροφή περιείχε μόνο βασικά μακροθρεπτικά συστατικά με DHA και ω-3 λιπαρά οξέα. Συμβιωτικό συμπλήρωμα διατροφής με 2 προβιοτικά στελέχη και 2 πρεβιοτικές ύλες. Τα στελέχη που περιέχονταν ήταν: *Lactobacillus rhamnosus* και *Bifidobacterium longum*.

### **Γ] Γαστρεντερικά υγρά**

Η εξομοίωση των γαστρικών παρασκευάστηκε από τα ακόλουθα συστατικά (σε g/l-τελικές συγκεντρώσεις): γλυκόζη, 0.4, εκχύλισμα μαγιάς 3.0, πεπτόνη 1.0, βλεννίνη χοίρου 4.0, κυστεΐνη 0.5, NaCl 0.08, NaHCO<sub>3</sub> 0.4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.04, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.008, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.008, ξυλάνη 1.0, διαλυτό άμυλο 3.0.

### **Δ] Ένζυμα**

Στο παραπάνω μίγμα, μετά την αποστείρωσή του στους 121°C/ 15 min προστέθηκαν τα ακόλουθα ένζυμα: 2,0 USP πηκτίνης/L και 1 ml Tween 80/1. Το παρασκεύασμα ρυθμίστηκε σε pH 3.0 και τέλος, προστέθηκε πεψίνη σε συγκέντρωση 3 g/L.

### **Ε] Χολικά Άλατα**

Χολικά άλατα (bile salts) και παγκρεατίνη για τη προσομοίωση των συνθηκών στο εντερικό σύστημα 2g σκόνης σε 200ml νερό 1% bile και 10% παγκρεατίνη (20g σε 100ml).

### **4.3 Εξοπλισμός και Οργανολογία**

- Υάλινα σκεύη όπως ποτήρια ζέσεως των 500ml για τη προσομοίωση γαστρικού και εντερικού συστήματος καθώς και προχοϊδες για την στάγδην ρύθμιση του pH ή την προσθήκη άλλων συστατικών
- Περισταλτικές αντλίες για ελεγχόμενη μεταφορά των διαλυμάτων στο σύστημα προσομοίωσης
- Τρυβλία petri για μικροβιολογικές αναλύσεις
- Αποστειρωμένους σωληνίσκους
- Διαφόρων όγκων πιπέτες
- Υδροβολείς
- Σπάτουλες ζύγισης
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Ηλεκτρονικό pH-μετρο
- Υδατόλουτρο
- Ομογενοποιητής τύπου vortex

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Κλίβανος
- Επωαστικός κλίβανοςπρασστήρας 37-42°C
- Θάλαμος νηματικής ροής

#### 4.4 Μέθοδοι

##### 4.4.1 Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων και διαλυμάτων

Το MRS broth (De Man, Rogosa and Sharpe) αποτελεί ένα υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο μπορεί να υποστηρίξει επαρκώς την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων (Lactic Acid Bacteria) καθώς και των *Bifidobacterium* spp. Η προετοιμασία του είναι απλή και αφορά τη διάλυση συγκεκριμένης ποσότητας του υποστρώματος (ζύγιση σε ζυγό ακριβείας) σε 500mL απιονισμένου νερού, ακολουθούμενη από την έντονη ανάδευση. Στη συνέχεια για τη στερεοποίηση του υποστρώματος προστίθεται κατάλληλη ποσότητα agar-agar. Τέλος, ο περιέκτης μαζί με το διαλυμένο θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκαν σε υγρό κλίβανο (121°C για 5 λεπτά).

Το CCI (Chromogenic Cronobacter Isolation, Oxoid/ Thermofischer) broth είναι στερεό, εκλεκτικό και εξειδικευμένο μέσο για την απομόνωση του *C. sakazakii* σε δείγματα γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων συμπεριλαμβανομένου και της βρεφικής φόρμουλας. Το υπόστρωμα περιέχει: Δεοξυ-χολικό νάτριο, εκχύλισμα ζύμης, 5-βρώμο, 4-χλώρο γλυκοπυρανοσίδη, χλωριούχο νάτριο, θειοθειικό νάτριο και κιτρικό αμμώνιο. Η παρασκευή του δε διαφέρει από εκείνη του MRS και περιλαμβάνει τη διάλυση του με κατάλληλη ποσότητα νερού, την ομογενοποίηση του και τελικά την αποστείρωση του.

Για τις διαδοχικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκε πεπτονούχος φυσιολογικός ορός (Buffered Peptone Water) ο οποίος έχει την δυνατότητα να βοηθά στην «ανάνηψη» (resuscitation) των τραυματισμένων από το stress (χαμηλό pH, χολικά άλατα) βακτηριακών μεμβρανών τα οποία αργότερα μπορούν να αναπτυχθούν και να καταμετρηθούν στα τρυβλία.



#### 4.4.2 Μεθοδολογία καταμέτρησης των μικροοργανισμών

Η μεθοδολογία καταμέτρησης των μικροοργανισμών βασίστηκε στην τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων των δειγμάτων, της ενσωμάτωσης τους στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και της επώασής τους στις κατάλληλες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, λαμβάνονταν δείγματα 1 mL και πραγματοποιούνταν διαδοχικές αραιώσεις σε 9 mL Πεπτονούχο Φυσιολογικό Ορό (Buffered Peptone Water). Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που πραγματοποιούνταν ήταν:

- ***Cronobacter sakazakii*:**

Υπόστρωμα: Chromogenic *Cronobacter* Isolation agar, Θερμοκρασία επώασης: 37°C, Χρόνος επώασης: 24-36 h

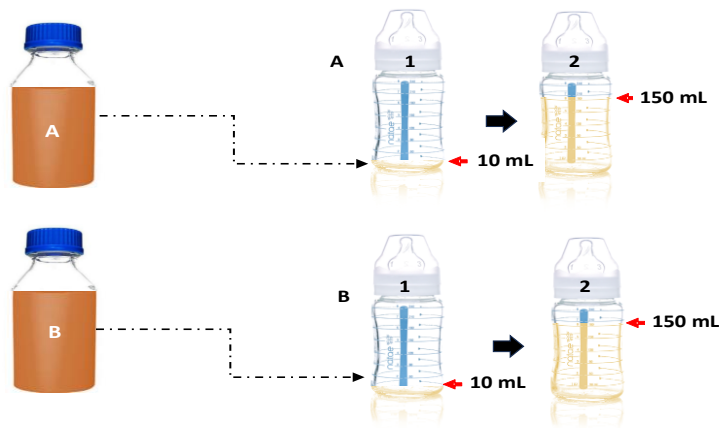
- **Συμβιωτική καλλιέργεια**

Τα βακτήρια του εμπορικού παρασκευάσματος που περιείχε *Lactobacillus rhamnosus* + *Bifidobacterium longum*. Η καταμέτρηση και των δύο ειδών έγινε ως εξής: Υπόστρωμα: MRS agar με επιστιβάδευση, Θερμοκρασία επώασης: 37°C, Χρόνος επώασης: 4-5 ημέρες.

#### 1.4 Ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε βρεφική τροφή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Εμπορικά διαθέσιμη βρεφική τροφή ανασυστάθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες που παραγωγού (400mL). Κατόπιν τα 400mL διαμοιράστηκαν ισομερώς σε δύο παρτίδες Α και Β. Η παρτίδα Α επιμολυσμένη με *C. sakazakii* παρέμεινε ως είχε ενώ στη δεύτερη προστέθηκε μια συσκευασία των 10 g που περιείχε σκόνη προβιοτικών βακτηρίων με πρεβιοτικά συστατικά. Τα δύο δείγματα παρέμειναν προς επώαση για 24 h σε κλίβανο θερμοκρασίας 20°C, θεωρώντας ότι αυτή είναι η θερμοκρασία δωματίου (**Εικόνα 9**). Δείγματα λαμβάνονταν και πραγματοποιούνταν αναλύσεις ως προς το *C. sakazakii* και τα προβιοτικά – από κοινού η μέτρηση καθώς και μέτρηση του pH.

Μετά από 12 h επώασης/ παραμονής σε σταθερή θερμοκρασία περιβάλλοντος (20°C) από κάθε μία από τις 2 παρτίδες (Α και Β) ελήφθησαν 15 mL και συμπληρώθηκαν με νέα βρεφική τροφή όγκου 135 mL ώστε ο τελικός όγκος να είναι 150 mL. Η ποσότητα αυτή ήταν το δείγμα το οποίο μελετήθηκε κατά τη διάβαση του από την εξομείωση του βρεφικού γαστρεντερικού συστήματος.

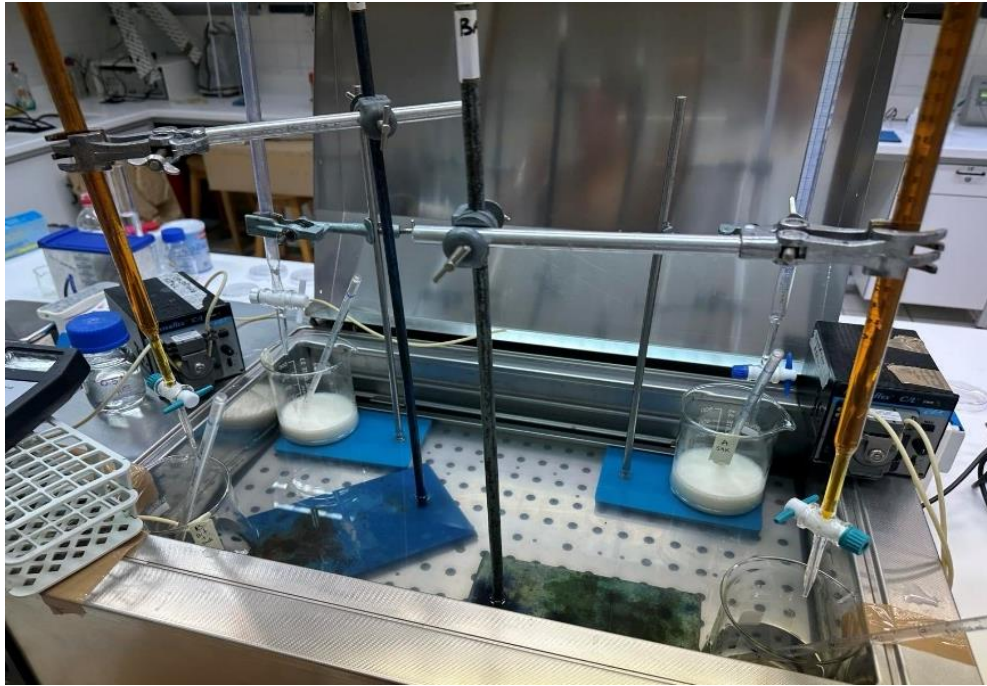


**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση παρασκευής των δειγμάτων βρεφικής τροφής: Στις φιάλες A και B περιέχονταν 200 mL ανασυσταμένη παιδική τροφή η οποία είχε εμβολιασθεί με *C. sakazakii* (A) και *C. sakazakii* μαζί με προβιοτική καλλιέργεια (B). Οι φιάλες επωάστηκαν για 24 h στους 20°C. Με την συμπλήρωση 12 h επώασης, 15 mL από κάθε φιάλη απομακρύνθηκαν και συμπληρώθηκαν έως τα 150 mL με βρεφική τροφή που στερούνταν οποιοδήποτε μικροοργανισμού. Τα 150 mL από κάθε φιάλη ελήφθησαν και μελετήθηκαν κατά την διάβασή τους από την εξομοίωση γαστρεντερικού συστήματος.

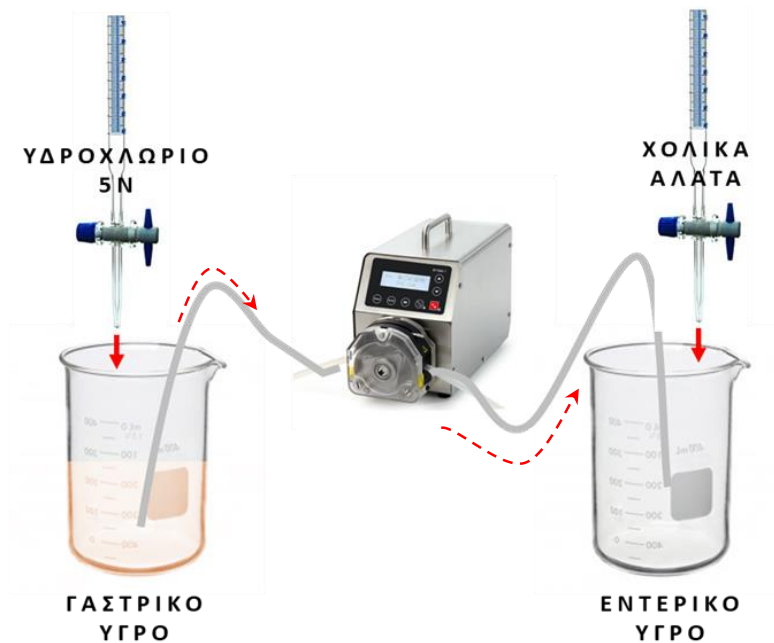
#### 4.5 Ανάπτυξη συστήματος προσομοίωσης

Η προσομοίωση του βρεφικού γαστρεντερικού συστήματος βασίστηκε – χωρίς να ταυτίζεται – σε ήδη δημοσιευμένο πρωτόκολλο όπως περιγράφεται αναλυτικά από τους Menard et al., (2014). Πιο συγκεκριμένα, το παρών σύστημα αναπτύχθηκε έτσι ώστε να παρέχει τη δυνατότητα προσομοίωσης του γαστρικού και εντερικού τμήματος από τη διαδικασία της πέψης (Εικόνα 9).

Στις **Εικόνες 10** και **11** παρουσιάζεται μια σχηματική απεικόνιση του αυτοσχέδιου συστήματος εξομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος οι βασικοί παράμετροι εισροών – εκροών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**.



**Εικόνα 10.** Φωτογραφία του συστήματος εξομίωσης γαστρικού και εντερικού συστήματος σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C.



**Εικόνα 11:** Σχηματική απεικόνιση του συστήματος γαστρεντερικής εξομίωσης καθώς και των εισροών/εκροών

**Πίνακας 3.** Παράμετροι του *in vitro* συστήματος προσομοίωσης

<b>ΓΑΣΤΡΙΚΗ ΕΞΟΜΟΙΩΣΗ</b>		
Όγκος τροφής (τυπικό) <sup>1</sup>	150 ml	
Όγκος γαστρικού υγρού <sup>2</sup>	30 ml	
Προσθήκη HCl <sup>3</sup>	5 N	0.5 mL/min
<b>Χρόνος διέλευσης (transit time)<sup>4</sup></b>		
120 min		
<b>ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΕΞΟΜΟΙΩΣΗ</b>		
Όγκος εντερικού υγρού <sup>5</sup>	10 ml	
Προσθήκη χολικών αλάτων <sup>6</sup>	1%	0.5 mL/min
Προσθήκη Παγκρεατίνης <sup>6</sup>	10%	0.5 mL/ min
Χρόνος παραμονής	240 min (4 ώρες)	

<sup>1</sup> Αρχικός όγκος βρεφικής τροφής <sup>2</sup> Όγκος γαστρικού υγρού <sup>3</sup> Η προσθήκη HCl μέσω προχοϊδας  
<sup>4</sup> Μεταφορά 1.2 mL/ min του γαστρικού περιεχόμενου στο εντερικό υγρό <sup>5</sup> 5 mL χολικά άλατα (1%) + 5 mL παγκρεατίνη (10%) <sup>6</sup> Ανάμιξη των διαλυμάτων χολικών αλάτων και παγκρεατίνης – κοινή έγχυση

#### 4.5 Πειραματική πορεία

- ✓ Αρχικά, πριν τη διεξαγωγή του κύριου πειράματος πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ομαλή λειτουργία του συστήματος εξομοίωσης. Αφού παρατηρήθηκε πως οι ροές είναι σταθερές και συνεχόμενες καθώς και η ρύθμιση του pH επιτυγχάνεται με τον επιθυμητό ρυθμό ακολούθησε ο πειραματικός σχεδιασμός. Αναλυτικότερα, «έτρεξαν» ταυτόχρονα δυο σειρές πειραμάτων (A) και (B) με βάση τα διαθέσιμα δείγματα ως εξής:
- ✓ Ήταν διαθέσιμα δύο δείγματα των 150 mL το καθένα: Στο A υπήρχε επιμόλυνση με *C. sakazakii* και στο B υπήρχε ταυτόχρονα επιμόλυνση με *C. sakazakii* και παρουσία της προβιοτικής καλλιέργειας αποτελούμενης από στελέχη *Lactobacillus rhamnosus* + *Bifidobacterium longum*.
- ✓ Το γαστρικό υγρό είχε pH 3.0 και είχε όγκο 30 mL.
- ✓ 150 mL βρεφική τροφή προστέθηκαν σε 30 mL γαστρικού υγρού. Ελήφθησαν δείγματα τα οποία μετρήθηκαν ως προς τους μικροβιακούς πληθυσμούς και την τιμή pH.

- ✓ Αμέσως μετά ξεκίνησε η στάγδην προσθήκη (0.5 mL/ min) HCl 5 N ώστε να αρχίσει να μειώνεται η τιμή pH όπως ακριβώς γίνεται και στην πέψη κατά την διάρκεια 2 h.
- ✓ Το επόμενο βήμα είναι η σταδιακή μεταφορά του γαστρικού περιεχόμενου στο λεπτό έντερο. Ο χρόνος διέλευσης (transient time) ήταν 120 min με ρυθμό 1.2 mL/min ώστε μέσα στη διάρκεια των 120 min το 90% περίπου του αρχικής ποσότητας τροφής να μεταφερθεί στο εντερικό υγρό.
- ✓ Αμέσως μετά την σταδιακή εισαγωγή του γαστρικού περιεχομένου στο εντερικό υγρό, ξεκινά και εις στάγδην (0,5 mL/ min) εισαγωγή μίγματος χολικών αλάτων και παγκρεατικού υγρού και συγκεκριμένα χολικά άλατα (1%) και παγκρεατίνη (10%). Η διάρκεια εισαγωγής του μίγματος ήταν περίπου 240 min δηλαδή περίπου 120 mL.
- ✓ Η δειγματοληψία γινόταν αποκλειστικά για 2 h στο γαστρικό περιεχόμενο και κατόπιν για 4 h στο εντερικό περιεχόμενο.

## Κεφάλαιο 5°

### Αποτελέσματα – Συζήτηση

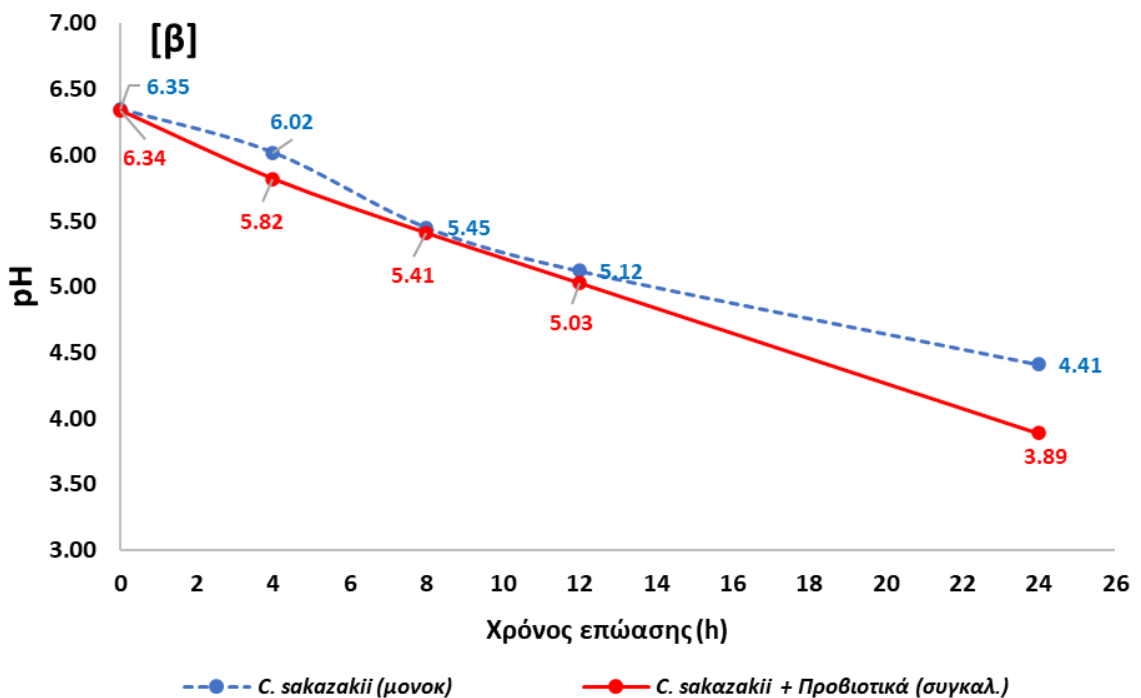
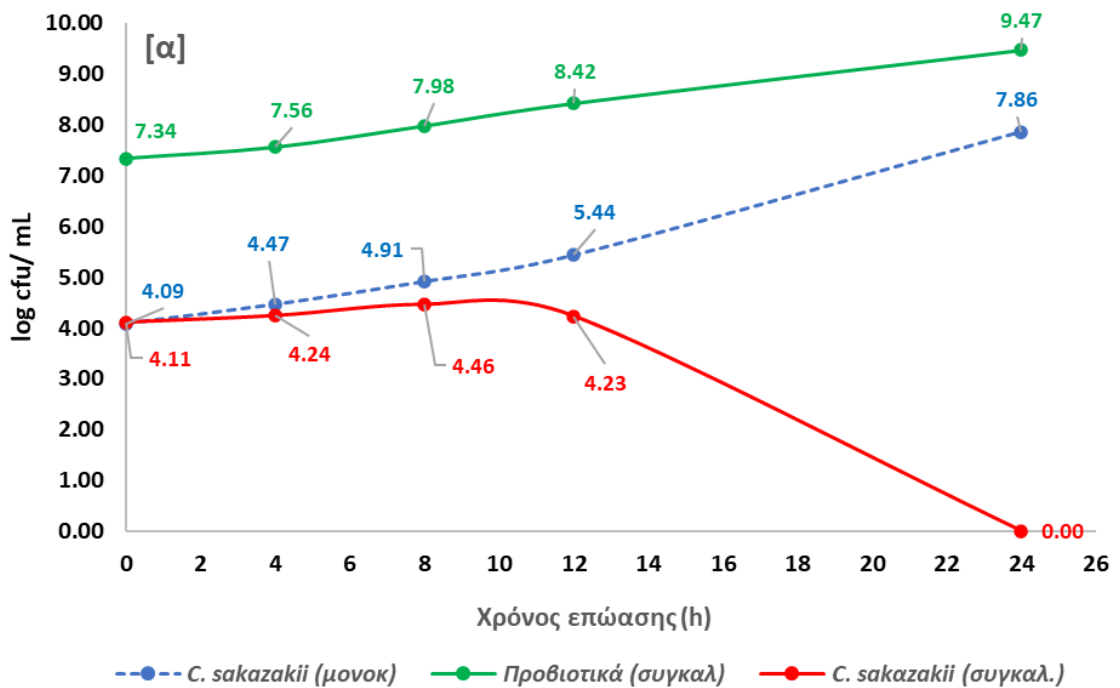
#### 5.1 Μεταβολές πληθυσμού *C. sakazakii* σε ανασυσταμένη βρεφική τροφή με και χωρίς συγκαλλιέργεια πρεβιοτικών βακτηρίων

Στο **Διάγραμμα 1** παρουσιάζεται η μεταβολή πληθυσμών: (α) *C. sakazakii*, (β) Προβιοτικής μικτής καλλιέργειας (*Lacticaseibacillus rhamnosus* + *Bifidobacterium longum*) καθώς και (γ) *C. sakazakii* σε συγκαλλιέργεια με τη μικτή προβιοτικής καλλιέργειας. Όπως έχει αναλυτικά παρουσιαστεί στην ενότητα «Υλικά & Μέθοδοι» ήταν διαθέσιμα δυο ανασυσταμένες βρεφικές τροφές (Α) και (Β). Το δείγμα Α είχε εμβολιαστεί με *C. sakazakii* ενώ το δείγμα Β εκτός από το *C. sakazakii* είχε εμπλουτισθεί με προβιοτική μικτή καλλιέργεια *Lacticaseibacillus rhamnosus* + *Bifidobacterium longum*. Και οι δύο βρεφικές τροφές επωάζονταν στους 20°C για συνολικά 24 h.

Στο δείγμα Α όπου το στέλεχος *C. sakazakii* (μπλε γραμμή στο **Διάγραμμα 1**) ήταν σε μονοκαλλιέργεια ο πληθυσμός του ήταν σταθερά αυξητικός. Συγκεκριμένα είχε αυξηθεί κατά 1.5 λογαριθμικό κύκλο τις πρώτες 12 h επώασης ενώ μετά την πάροδο 24 h είχε αυξηθεί σχεδόν κατά 4 λογαριθμικούς κύκλους.

Αντίθετα, στο δείγμα Β της συγκαλλιέργειας *C. sakazakii* και Προβιοτικής μικτής καλλιέργειας (*Lacticaseibacillus rhamnosus* + *Bifidobacterium longum*) ο πληθυσμός του *C. sakazakii* αναπτύχθηκε ελάχιστα τις πρώτες 8 ώρες επώασης και μάλιστα παρουσίασε ελαφρά πτωτική τάση μετά από 12 h επώασης. Με την πάροδο δε, 24 h επώασης ο πληθυσμός του *C. sakazakii* ήταν χαμηλότερα από το σημείο ανίχνευσης των αποικιών σε τρυβλία (1.47 log cycles).

Σε ό,τι αφορά την εξέλιξη της μικτής προβιοτικής καλλιέργειας (πράσινη γραμμή στο **Διάγραμμα 1**) σε συγκαλλιέργεια με το *C. sakazakii* – δείγμα Β – ήταν ήπια αλλά σταθερά ανοδική και μέσα σε 12 h, στους 20°C, είχε αυξηθεί, περίπου, κατά 1 λογαριθμικό κύκλο ενώ με την συμπλήρωση 24 h επώασης η συνολική άνοδος ήταν 2 λογαριθμικοί κύκλοι από την έναρξη της πειραματικής δοκιμής.



**Διάγραμμα 1:** (α) Μεταβολές βακτηριακών πληθυσμών (log cfu/mL) και (β) των τιμών pH σε παρασκεύασμα βρεφικής τροφής υπό επώαση στους 20°C για 24h. Η μπλε γραμμή αφορά το δυνητικά παθογόνο *C. sakazakii* σε μονοκαλλιέργεια, η πράσινη γραμμή την προβιοτική καλλιέργεια (*Lacticaseibacillus rhamnosus* + *Bifidobacterium longum*) σε συγκαλλιέργεια με το *C. sakazakii*, και η κόκκινη γραμμή την συγκαλλιέργεια *C. sakazakii* με την προβιοτική (*Lacticaseibacillus rhamnosus* + *Bifidobacterium longum*)

Παράλληλα καταγράφονταν ο ρυθμός πτώσης του pH ο οποίος εμφανίζεται στο *Διάγραμμα 1β*. Η αρχική τιμή pH ανασυσταμένης βρεφικής τροφής ήταν στην περιοχή του 6.4. Και στα δύο δείγματα (A + B) δείγματα παρατηρήθηκε πτώση του pH, το οποίο ήταν αναμενόμενο, διότι το υπόστρωμα ήταν πολύ πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και υποστήριζε την ανάπτυξη των μικροοργανισμών των οποίων τα μεταβολικά προϊόντα είναι, μεταξύ άλλων, οργανικά οξέα.

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι τις πρώτες 12 h επώασης σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις που μελετήθηκαν η τιμή pH δεν κατέβηκε χαμηλότερα από την τιμή 5.0, η οποία δεν είναι ασφαλώς ικανή να προκαλέσει το θάνατο του *C. sakazakii*. Γενικά, η πτώση της τιμής pH θα μπορούσε να θεωρηθεί μάλλον αργή, αλλά αυτό είναι αναμενόμενο με δεδομένο ότι η θερμοκρασία επώασης είναι αρκετά χαμηλή, 20°C. Αντίθετα μετά από 24h επώασης, οι τιμές pH ήταν χαμηλές, στην περιοχή 4.0, οι οποίες είναι εφικτό να αναστείλουν την ανάπτυξη του δυνητικά παθογόνου *C. sakazakii*

## **5.2 Μεταβολές πληθυσμού *C. sakazakii* σε βρεφική τροφή με και χωρίς συγκαλλιέργεια πρεβιοτικών βακτηρίων κατά το πέρασμά τους από εξομοίωση γαστρεντερικού υγρού**

Αρχικά, όπως αναλυτικά περιγράφηκε στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» ήταν διαθέσιμα 15 mL βρεφικής ανασυσταμένης βρεφικής τροφής τα οποία είχαν εμβολιαστεί αποκλειστικά με *C. sakazakii* (Δείγμα A) και μετά από 12 h επώασης στους 20°C είχαν πληθυσμό  $2.76 \times 10^5$  cfu/mL. Στο δείγμα αυτό προστέθηκαν 135 mL ανασυσταμένης βρεφικής τροφής που δεν είχε επιμολυνθεί, συνολικά δηλαδή 150 mL. Μετά την ανάμιξη ο αρχικός πληθυσμός *C. sakazakii* είχε αραιωθεί κατά 10 φορές, δηλαδή κατά 1 log cycle χαμηλότερα, και θεωρητικά, ήταν  $2.76 \times 10^4$  cfu/mL. Τα 150 mL της βρεφικής τροφής προστέθηκαν σε 30 mL γαστρικό υγρό και ξεκίνησε η διαδικασία της διάβασης του δείγματος από το γαστρεντερικό σύστημα.

Με τον ίδιο τρόπο ήταν διαθέσιμα 15 mL βρεφικής ανασυσταμένης βρεφικής τροφής τα οποία είχαν εμβολιαστεί τόσο με το δυνητικά παθογόνο *C. sakazakii* καθώς και με την μίγμα πρεβιοτικών στελεχών (Δείγμα B). Μετά από 12 h επώασης στους



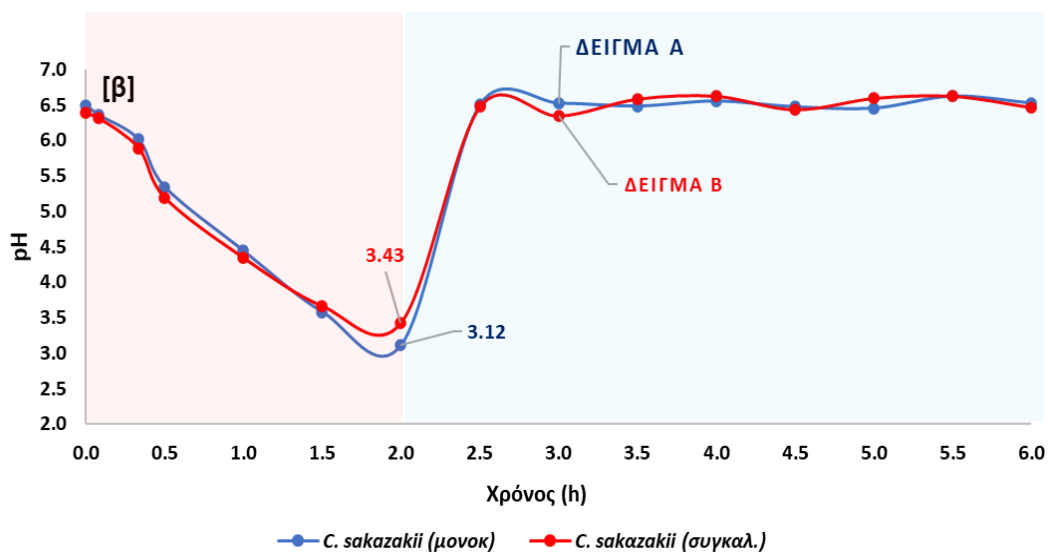
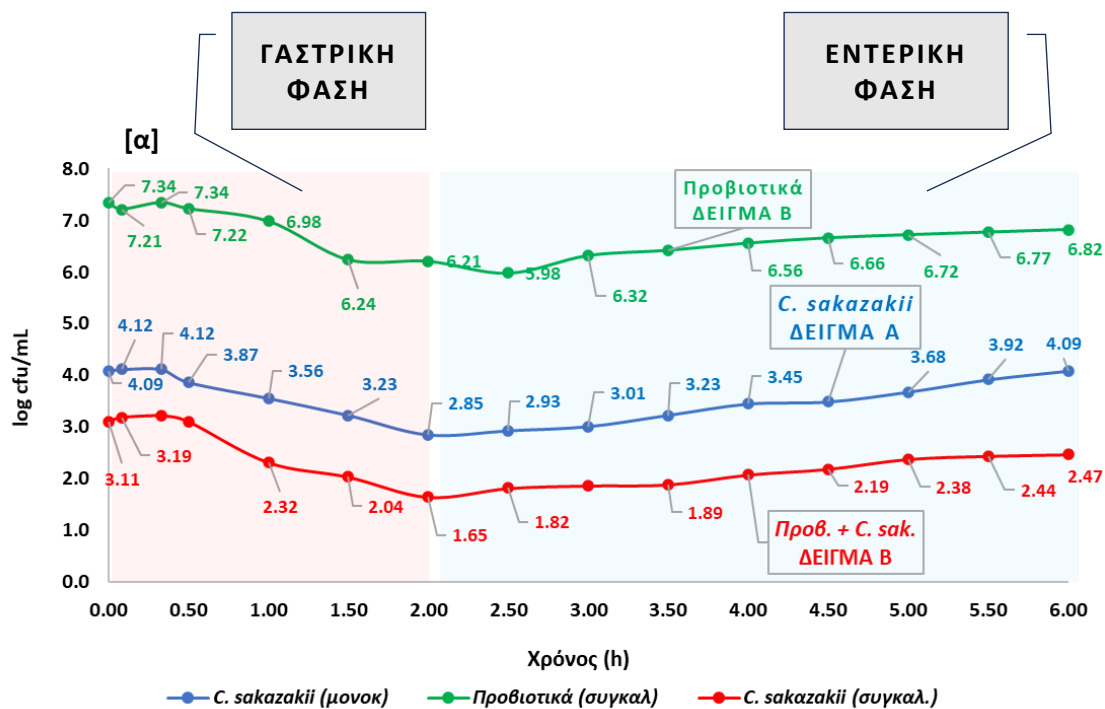
20°C ο πληθυσμός του *C. sakazakii* ήταν  $1.71 \times 10^4$  cfu/mL και μετά την προσθήκη των 135 mL βρεφικής τροφής είχαν μειωθεί κατά 1 log cycle και θεωρητικά ήταν  $1.71 \times 10^3$  cfu/mL.

Με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, η διάρκεια κένωσης του στομάχου ήταν περίπου 2 h και γίνεται με «δυναμικό» τρόπο, δηλαδή σταδιακά γίνεται μεταφορά γαστρικού υγρού προς το εντερικό υγρό. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο ρυθμός μεταφοράς του γαστρικού υγρού στο εντερικό υγρό ήταν της τάξης του 1.2 mL/ min ώστε μέσα σε 2 h ολόκληρη η ποσότητα της αρχικής τροφής των 150 mL να έχει μεταφερθεί στο εντερικό υγρό. Παράλληλα αμέσως μετά την πλήρωσή του, ξεκινά η προσθήκη υδροχλωρικού οξέος (HCl, 5N) με κατάλληλο ρυθμό ώστε με την συμπλήρωση των 2 ωρών το pH να βρίσκεται στην περιοχή 3.0.

Αμέσως μετά την προσθήκη των δειγμάτων στο γαστρικό υγρό, λαμβάνονταν 1 mL δείγματος ανά τακτά χρονικά διαστήματα και αναλύονταν ως προς τον πληθυσμό *C. sakazakii* καθώς και ως προς την μικτή προβιοτική καλλιέργεια (*Lactocaseibacillus rhamnosus* και *Bifidobacterium longum*) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3α**.

Υπήρχε σαφής διαφορά στον πληθυσμό του *C. sakazakii* μεταξύ των δειγμάτων A και B η οποία οφείλεται όμως στην αρχική διαφορά που υπήρχε στην βρεφική τροφή. Από εκεί και μετά, τα πρώτα 30 min ο πληθυσμός του *C. sakazakii* και στα δυο δείγματα (A και B) δεν παρουσίασε πτωτική τάση, γεγονός που δικαιολογείται από την τιμή του pH, η οποία ήταν  $> 5.0$ , και συνεπώς δεν μπορούσε να έχει αναχαιτιστική δράση (Σχήμα 3β). Η πτωτική τάση του *C. sakazakii* έγινε εντονότερη μετά την πάροδο της 1<sup>ης</sup> ώρας όταν πλέον η τιμή του pH είχε διαμορφωθεί στην περιοχή του 4.3. Η πτωτική τάση του δυνητικά παθογόνου *C. sakazakii* συνεχίστηκε μέχρι και την συμπλήρωση των 2 h παραμονής στο γαστρικό υγρό. Η συνολική μείωση του μικροβιακού φορτίου *C. sakazakii* κατά την διάρκεια της γαστρικής πέψης ήταν περίπου 2 log cycles.

Από την άλλη πλευρά, κατά την εντερική φάση, η τιμή του pH ανέβηκε στο 6.5 και συνεπώς έπαψε το χαμηλό pH να αποτελεί αναχαιτιστικό παράγοντα του παθογόνου μικροοργανισμού. Επίσης, τα χολικά άλατα καθώς και η παγκρεατίνη δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη του *C. sakazakii*.



**Σχήμα 3:** Μεταβολές βακτηριακών πληθυσμών σε δείγματα (Α και Β) βρεφικής τροφής κατά τη διάβασή τους από εξομοίωση γαστρικού (γαστρική φάση) και εντερικού υγρού (εντερική φάση) σε θερμοκρασία 37°C. Στο δείγμα Α υπήρχε αποκλειστικά *C. sakazakii* ενώ στο δείγμα Β υπήρχε κοινή παρουσία *C. sakazakii* και προβιοτικών βακτηρίων (*Lactisacibacillus rhamnosus* + *Bifidobacterium longum*). Με μπλε γραμμή είναι η εξέλιξη του πληθυσμού (cfu/mL) του δυνητικά παθογόνου *C. sakazakii* σε μονοκαλλιέργεια (Δείγμα Α), με πράσινη γραμμή είναι ο πληθυσμός *B. longum* και *Lb. rhamnosus* σε συγκαλλιέργεια (Δείγμα Β) και με κόκκινη γραμμή η εξέλιξη του *C. sakazakii* σε συγκαλλιέργεια με *B. longum* και *Lb. rhamnosus* (Δείγμα Β).

### 5.3 Συσχέτιση αποτελεσμάτων με το υφιστάμενο ερευνητικό πλαίσιο

Κατά καιρούς έχει μελετηθεί η επίδραση της παρουσίας συμβιωτικών στελεχών έναντι του *C. sakazakii*. Τα κυριότερα από αυτά τα στελέχη ανήκουν σε δυο μεγάλες κατηγορίες γενών αυτών των *Bacillus*, *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*.

Οι βάκιλλοι είναι gram θετικά ραβδόμορφα βακτήρια ευρέως διαδεδομένοι σε φυσικά περιβάλλοντα. Σε ιδιαίτερα αντίξοες συνθήκες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ενδοσπόρια τα οποία είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά (Gillis and Mahillon, 2014 ).

Σε ό,τι αφορά τα είδη του γένους *Lactobacillus*, ανήκουν και τα είδη *Lactobacillus acidophilus* και *Lactobacillus rhamnosus* τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ αλλά και απαιτούν όξινο περιβάλλον για την ανάπτυξη τους. Η πρεβιοτική τους δράση βασίζεται τόσο στον αριθμό των ζωντανών μικροοργανισμών όσο και στις συνθήκες που αυτοί διαβιούν στο σύστημα. Τα συγκεκριμένα βακτήρια μπορούν να αξιοποιήσουν (σε μικρές ποσότητες) ορισμένα σάκχαρα τα οποία δεν μεταβολίζονται από τον άνθρωπο προάγοντας τη παραγωγή οξέων, τα οποία λειτουργούν αποτρεπτικά στην ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Malik et al., 2019 ).

Το βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* είναι gram θετικά προαιρετικά αναερόβια και μη-σπορογόνα βακτήρια. Τα είδη του γένους χαρακτηρίζονται από έντονη παρουσία στη γαστρεντερική οδό νεογνών από την γέννηση και αποτελούν το κυρίαρχο είδος μέχρι και το πρώτο ένα έτος της ανάπτυξης του βρέφους. Αυτός είναι και ένας λόγος που η λήψη προβιοτικών από τη μητέρα που θηλάζει αποτελεί ένα μείζον ερευνητικό θέμα καθιστώντας τα ένα σημαντικό υποψήφιο αποτελεσματικής πρόληψης και αντιμετώπισης των λοιμώξεων στα νεογνά. Ομοίως με τους βακίλους, τα συγκεκριμένα βακτήρια παράγουν γαλακτικό και οξικό οξύ (Hagen and Skelley, 2019).

Η αντιμικροβιακή δράση των παραπάνω στελεχών είναι έμμεση και βασίζεται: (α) στην ενίσχυση της φυσιολογίας του φραγμού του επιθηλίου, (β) την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης, (γ) στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (δ) στη παραγωγή μεταβολιτών που «επιτίθενται» στους παθογόνους μικροοργανισμούς, (ε) στον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά (Tomar et al., 2015 ). Αξιοσημείωτο είναι πως στο παχύ έντερο τα προβιοτικά παράγουν κυρίως οργανικά οξέα τα οποία δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη παθογόνων, ενώ στο λεπτό έντερο παράγουν

υπεροξειδίου του υδρογόνου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, το οποίο αποτελεί έναν ισχυρό ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης. Εκτός των άλλων, η αποτελεσματικότητα διάφορων προβιοτικών στελεχών πολλές φορές στηρίζεται και στη παραγωγή ενώσεων που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων. Για παράδειγμα, τα είδη *Lactobacillus casei* και *L. acidophilus* έχει βρεθεί ότι παράγουν βακτηριοκίνες, οι οποίες ενδεχομένως να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *C. sakazakii* σε συμπυκνωμένη σκόνη βρεφικής φόρμουλας (Awaisheh et al., 2013). Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί που συνοδεύουν τα προβιοτικά δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, αρκετές μελέτες παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Το στέλεχος *Lactobacillus reuteri* σε μια *in vitro* δοκιμή που περιελάμβανε νεογνά εξαιρετικά χαμηλού βάρους μείωσε σημαντικά το ποσοστό εμφάνισης σηψαιμικής εντεροκολίτιδας, η οποία σχετιζόταν με λοίμωξη από *C. sakazakii* (Hunter et al., 2012). Μια άλλη *in vitro* μελέτη που περιελάμβανε ένα συνδυασμό δυο λακτοβακίλων (*L. casei* και *L. acidophilus*) παρουσίασε πως τόσο ο χρόνος ζωής όσο και η μολυσματικότητα (Viability) του *C. sakazakii* σε βρεφική φόρμουλα ήταν πολύ μικρότερη (Awaisheh et al., 2013). Ο Janvier και η ομάδα του φανέρωσαν πως το ποσοστό εισαγωγής πρόωρων νεογνών (<37 εβδομάδων) σε μονάδα εντατικής ήταν αισθητά μειωμένο παρουσία ενός συνδυασμού προβιοτικών στελεχών που περιελάμβανε γένη του *Bifidobacterium* spp. και του *Lactobacillus rhamnosus* (Janvier et al., 2014). Ωστόσο, τα έως τώρα δεδομένα έχουν αποκτηθεί αξιολογώντας *in vitro* δεδομένα, αναδεικνύοντας την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα που θα περιλαμβάνει και κλινικές παρεμβάσεις.

#### 5.4 Συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές

Τα βασικότερα συμπεράσματα που εξάγονται από τη παρούσα μελέτη είναι τα ακόλουθα:

- Η παρουσία προβιοτικών στη φόρμουλα λειτούργησε ανασταλτικά έναντι του *C. sakazakii* καθώς υπήρχε μεγαλύτερος ανταγωνισμός για τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά
- Αναπτύχθηκε ένα *in-house* σύστημα εξομίωσης του γαστρεντερικού συστήματος

- Το χαμηλό pH στη γαστρική φάση αποτελεί από μόνο του ένα φυσικό ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης του *C. sakazakii*
- Η επαναφορά του pH στο 6.5 στην εντερική φάση δεν επιδρά ιδιαίτερα στο φορτίο του *C. sakazakii*
- Η δραστηριότητα των προβιοτικών κατά την εξομοίωση δεν είναι με εκείνη στη φάση επώασης καθώς το όξινο περιβάλλον επιδρά με τον ίδιο ακριβώς τρόπο και σε αυτά τα ωφέλιμα στελέχη

Μέσω αυτής της πρώτης απόπειρας εξομοίωσης και παρακολούθησης των μεταβολών του *C. sakazakii* γεννώνται πολλές προοπτικές, οι οποίες μπορούν να ενισχύσουν σημαντικά τη παρούσα μελέτη. Για παράδειγμα, ένας εναλλακτικός τρόπος ενσωμάτωσης των προβιοτικών στη βρεφική φόρμουλα όπως ο εγκλεισμός σε νανοσωματίδια, σε γέλη ή κάποιας μορφής λιπόσωμα, ενδεχομένως να δρα προστατευτικά έναντι στο όξινο περιβάλλον του στομάχου. Όσον αφορά το σύστημα εξομοίωσης η περαιτέρω ενσωμάτωση επιμέρους οργανιδίων ή σημείων της πέψης να φανέρωνε μια άλλη οπτική. Τέλος, πολύ σημαντικό θα ήταν η βελτιστοποίηση του παρόντος συστήματος καθώς και η επικύρωση τους σε real time με ανθρώπινα δείγματα.

## Αναφορές

### Ξενόγλωσση

1. Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.*, 14, e1002533
2. Berg, G.; Rybakova, D.; Fischer, D.; Cernava, T.; Vergès, M.C.C.; Charles, T.; Chen, X.; Cocolin, L.; Eversole, K.; Corral, G.H.; et al. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8, 1-22
3. Thursby, E.; Juge, N. (2020). Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.*, 474, 1823–1836
4. Jandhyala, S.M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.*, 21, 8787–8803.
5. Rinninella, E.; Raoul, P.; Cintoni, M.; Franceschi, F.; Miggiano, G.A.D.; Gasbarrini, A.; Mele, M.C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet and disease, *Microorganisms*, 7, 14.
6. Hasan, N.; Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*, 2019, e7502.
7. Jost, T.; Lacroix, C.; Braegger, C.; Chassard, C. (2015). Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr. Rev.*, 73, 426–437
8. Jaffe, S., (2022). US infant formula crisis increases scrutiny of the FDA. *The Lancet*, 399, 2177-2178.
9. Gest, H. (2004). The Discovery of Microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of the Royal Society. *Notes Rec. R. Soc. Lond.*, 58, 187–201.
10. Cole, J.R.; Wang, Q.; Fish, J.A.; Chai, B.; McGarrell, D.M.; Sun, Y.; Brown, C.T.; Porras-Alfaro, A.; Kuske, C.R.; Tiedje, J.M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.*, 42, D633–D642.

11. Chaturvedi, M.; Punj, A. (2018). Human Oral Microflora. *Int. J. Curr. Adv. Res.*, 7, 14065–14070.
12. Baker, B.J.; De Anda, V.; Seitz, K.W.; Dombrowski, N.; Santoro, A.E.; Lloyd, K.G. (2020). Diversity, ecology and evolution of Archaea. *Nat. Microbiol.*, 5, 887–900
13. Tedersoo, L.; Sánchez-Ramírez, S.; Kõljalg, U.; Bahram, M.; Döring, M.; Schigel, D.S.; May, T.; Ryberg, M.; Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Divers.*, 90, 135–159.
14. Imam, T.S. (2009). The Complexities in the Classification of Protozoa: A Challenge to Parasitologists. *Bayero J. Pure Appl. Sci.*, 2, 159–164.
15. Dubik, M.; Pilecki, B.; Moeller, J.B. (2022). Commensal Intestinal Protozoa—Underestimated Members of the Gut Microbial Community. *Biology*, 11, 1742.
16. Willey, J.; Sherwood, L.M.; Woolverton, C.J. Control of microorganisms in the environment. In *Prescott's Microbiology*, 8th ed.; McGraw-Hill Companies Inc.: New York, NY, USA, 2011; pp. 190–207
17. Farmer, J.J. (2015). My 40-year history with *Cronobacter/Enterobacter sakazakii*—lessons learned, myths debunked, and recommendations. *Front. Pediatr.*, 3, 84.
18. Iversen, C.; Lehner, A.; Mullane, N.; Bidlas, E.; Cleenwerck, I.; Marugg, J.; Fanning, S.; Stephan, R.; Joosten, H. (2007). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: Proposal of a new genus *Cronobacter* gen. Nov and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. Nov *Cronobacter sakazakii* subsp *sakazakii*, comb. Nov., *Cronobacter sakazakii* subsp *malonaticus* subsp nov., *Cronobacter turicensis* sp nov., *Cronobacter muytjensii* sp nov., *Cronobacter dublinensis* sp nov and *Cronobacter genomospecies* I. *BMC Evol. Biol.*, 7, 11
19. Food Safety Authority of Ireland (2011). “*Cronobacter* spp., Microbial factsheet series, No. 1, 1-5.
20. Jvo Siegrist. *Chronobacter* spp. (2012). Classic and New Detection Methods. Microbiology Focus Edition 1.2

21. Lambert, R.J.W. and Bidlas, E. (2007). A study of the Gamma hypothesis: predictive modelling of the growth and inhibition of *Enterobacter sakazakii*. *Int J Food Microbiol.*, 115, 204–213
22. Lang, E.; Chemlal, L.; Molin, P.; Guyot, S.; Alvarez-Martin, P.; Perrier-Cornet, J.M.; Dantigny, P.; Gervais, P. (2017). Modeling the heat inactivation of foodborne pathogens in milk powder: High relevance of the substrate water activity. *Food Res. Int.*, 99, 577–585.
23. Breeuwer, P.; Lardeau, A.; Peterz, M.; Joosten, H.M. (2003). Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 967–973.
24. Ling, N.; Forsythe, S.; Wu, Q.; Ding, Y.; Zhang, J.; Zeng, H. (2020). Insights into *Cronobacter sakazakii* biofilm formation and control strategies in the food industry. *Engineering*
25. Beuchat, L.R.; Kim, H.; Gurtler, J.B.; Lin, L.-C.; Ryu, J.-H.; Richards, G.M. (2009). *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 204–213.
26. U.S. Food and Drug Administration (2023). *Cronobacter sakazakii*
27. Singh, N.; Goel, G.; Raghav, M. (2015). Insights into virulence factors determining the pathogenicity of *Cronobacter sakazakii*. *Virulence*, 6, 433–440.
28. Chenu, J.W.; Cox, J.M. (2010). *Cronobacter* ('*Enterobacter sakazakii*'): Current status and future prospects. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49, 153–159.
29. Yan, Q.Q.; Condell, O.; Power, K.; Butler, F.; Tall, B.D.; Fanning, S. (2012). *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: A review of our current understanding of the biology of this bacterium: A review of *Cronobacter* species. *J. Appl. Microbiol.*, 113, 1–15.
30. Centre for Disease Control. (2020). Frequently Asked Questions. Available at: <https://www.cdc.gov/cronobacter/technical.html> (Τελευταία πρόσβαση 31/6/2023)
31. Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., et al. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health



implications of the infant gut microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81, e00036–e00017. doi: 10.1128/MMBR.00036-17

32. Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., et al. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* 17, 690–703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004

33. Vandenplas, Y., Zakharova, I., and Dmitrieva, Y. (2015). Oligosaccharides in infant formula: more evidence to validate the role of prebiotics. *Br. J. Nutr.* 113, 1339–1344. doi: 10.1017/S0007114515000823

34. Hunter, C. J., and Bean, J. F. (2013). *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis. *J. Perinatol.* 33, 581–585. doi: 10.1038/jp.2013.26

35. Forsythe, S. J. (2018). Updates on the *Cronobacter* genus. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9, 23–44. doi: 10.1146/annurev-food-030117-012246

36. Ke, A.; Parreira, V.R.; Goodridge, L.; Farber, J.M (2021). Current and Future Perspectives on the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics in Controlling Pathogenic *Cronobacter* Spp. in Infants. *Front. Microbiol.*, 12, 3158

37. Henry, M.; Fouladkhah, A (2019). Outbreak History, Biofilm Formation, and Preventive Measures for Control of *Cronobacter sakazakii* in Infant Formula and Infant Care Settings. *Microorganisms*, 7, 77

38. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome (2012). *Nature*, 486:207–214

39. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464 59–65

40. Hillman E,T, Yao T, Nakatsu CH (2017). Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes Environ.* 32 300-313

41. Tsiantas K, Konteles SJ, Kritsi E, Sinanoglou VJ, Tsiaka T, Zoumpoulakis P. Effects of Non-Polar Dietary and Endogenous Lipids on Gut Microbiota Alterations: The Role of Lipidomics (2022). *Int. J. Mol. Sci.* 23 4070
42. Flint, H.J.; Scott, K.P.; Louis, P.; Duncan, S.H (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 577–589
43. Cresci, G.A.; Izzo, K. Gut Microbiome (2019). In *Adult Short Bowel Syndrome*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 45–54. ISBN 9780128143308.
44. Laterza, L.; Rizzatti, G.; Gaetani, E.; Chiusolo, P.; Gasbarrini, A (2016). The gut microbiota and immune system relationship in human graft-versus-host disease. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 8, e201602
45. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; et al (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174–180.
46. Hasan, N.; Yang, H (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*, 7, e7502
47. Schroeder, J.B.; Backhead, F (2016). Signals from gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.*, 22, 1079–1089
48. Baptista, L.C.; Sun, Y.; Carter, C.S.; Buford, T.W. (2020). Crosstalk Between the Gut Microbiome and Bioactive Lipids: Therapeutic Targets in Cognitive Frailty. *Front. Nutr.*, 7, 17.
49. Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD, Gordon JI. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*. 307:1955–1959.
50. Morrison, D.J.; Preston, T (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7, 189–200.
51. Seely, K.D.; Kotelko, C.A.; Douglas, H.; Bealer, B.; Brooks, A.E. (2021). The Human Gut Microbiota: A Key Mediator of Osteoporosis and Osteogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 9452.

52. Wallace BD, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, Venkatesh M, Jobin C, Yeh LA, Mani S, et al. (2010). Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science*. 330, 831–835
53. Lutgendorff, F.; Akkermans, L.M.A.; Soderholm, J.D (2008). The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastrointestinal damage. *Curr. Mol. Med.*, 8, 282–298.
54. Celli, J.P.; Turner, B.S.; Afdhal, N.H.; Keates, S.; Ghiran, I.; Kelly, C.P.; Ewoldt, R.H.; McKinley, G.H.; So, P.; Erramilli, S.; et al. (2009). *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 14321–14326
55. Yan, F.; Cao, H.; Cover, T.L.; Washington, M.K.; Shi, Y.; Liu, L.; Chaturvedi, R.; Peek, R.M.; Wilson, K.T.; Polk, D.B. (2011). Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J. Clin. Investig.*, 121, 2242–2253
56. Gosalbes, M.J.; Llop, S.; Valles, Y.; Moya, A.; Ballester, F.; Francino, MP (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin. Exp. Allergy*, 43, 198–211.
57. Dominguez-Bello, M.G.; Costello, E.K.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Fierer, N.; Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 11971–11975
58. Biasucci, G.; Benenati, B.; Morelli, L.; Bessi, E.; Boehm, G. (2008). Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J. Nutr.* 138, 1796S–1800
59. Tanaka, M.; Nakayama, J. (2016). Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol. Int.*, 66, 515–522
60. Matsuki, T.; Yahagi, K.; Mori, H.; Matsumoto, H.; Hara, T.; Tajima, S.; Ogawa, E.; Kodama, H.; Yamamoto, K.; Yamada, T. (2016). A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nat. Commun.*, 7, 1–12

61. Marcobal, A.; Barboza, M.; Sonnenburg, E.D.; Pudlo, N.; Martens, E.C.; Desai, P.; Lebrilla, C.B.; Weimer, B.C.; Mills, D.A.; German, J.B.; Sonnenburg, J.L. (2011). *Bacteroides* in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe*, *10*, 507–514
62. von Martels, J.Z.; Sadaghian Sadabad, M.; Bourgonje, A.R.; Blokzijl, T.; Dijkstra, G.; Faber, K.N.; Harmsen, H.J. (2017). The role of gut microbiota in health and disease: In vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobic-anaerobic interphase of the human gut. *Anaerobe*, *44*, 3–12
63. Tsilingiri, K.; Barbosa, T.; Penna, G.; Caprioli, F.; Sonzogni, A.; Viale, G.; Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: Comparison on a novel polarized ex-vivo organ culture model. *Gut*, *61*, 1007–1015
64. Lukovac, S.; Belzer, C.; Pellis, L.; Keijsers, B.J.; De Vos, W.M.; Montijn, R.C.; Roeselers, G.C. (2014). Differential Modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids. *mBio*, *5*, e01438-14
65. Kortman, G.A.; Dutilh, B.E.; Maathuis, A.J.; Engelke, U.F.; Boekhorst, J.; Keegan, K.P.; Nielsen, F.G.; Betley, J.; Weir, J.C.; Kingsbury, Z. (2016). Microbial Metab. shifts towards an adverse profile with supplementary iron in the TIM-2 in vitro model of the human colon. *Front. Microbiol.*, *6*, 1481
66. Terpend, K.; Possemiers, S.; Daguet, D.; Marzorati, M. (2013). Arabinogalactan and fructo-oligosaccharides have a different fermentation profile in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Environ. Microbiol. Rep.*, *5*, 595–603
67. Roussel, C.; De Paepe, K.; Galia, W.; De Bodt, J.; Chalancon, S.; Leriche, F.; Ballet, N.; Denis, S.; Alric, M.; Van de Wiele, T.; et al (2020). Spatial and temporal modulation of enterotoxigenic *E. coli* H10407 pathogenesis and interplay with microbiota in human gut models. *BMC Biol.*, *18*, 141
68. Li, C.; Zhang, X. (2022). Current in Vitro and Animal Models for Understanding Foods: Human Gut-Microbiota Interactions. *J. Agric. Food Chem.*, *70*, 12733–12745

69. Ménard, O.; Cattenoz, T.; Guillemin, H.; Souchon, I.; Deglaire, A.; Dupont, D.; Picque, D. (2014). Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chem.*, *145*, 1039–1045
70. Gillis, A.; Mahillon, J. Phages Preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: Past, Present and Future. *Viruses* 2014, *6*, 2623-2672
71. Malik, M.; Bora, J.; Sharma, V. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus casei*) in carrot and beetroot juice substrates. *J. Food Process. Pres.* 2019, *43*, e14214.
72. Hagen, P.C.; Skelley, J.W. Efficacy of *Bifidobacterium* species in prevention of necrotizing enterocolitis in very-low birth weight infants. A systematic review. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 2019, *24*, 10–15.
73. Tomar, S.; Anand, S.; Sharma, P.; Mandal, S. Role of probiotics, prebiotics, synbiotics and postbiotics in inhibition of pathogens. In *The Battle against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*; Méndez-Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 2015
74. Awaisheh, S.S.; Al-Nabulsi, A.A.; Osaili, T.M.; Ibrahim, S.; Holley, R. Inhibition of *Cronobacter sakazakii* by Heat Labile Bacteriocins Produced by Probiotic LAB Isolated from Healthy Infants. *J. Food Sci.* 2013, *78*, M1416–M1420
75. Hunter, C., Dimaguila, M. A. V. T., Gal, P., Wimmer, J. E., Ransom, J. L., Carlos, R. Q., et al. (2012). Effect of routine probiotic, *lactobacillus reuteri* DSM 17938, use on rates of necrotizing enterocolitis in neonates with birthweight < 1000 grams: a sequential analysis. *BMC Pediatr.* *12*:142.
76. Janvier, A., Malo, J., and Barrington, K. J. (2014). Cohort study of probiotics in a north American neonatal intensive care unit. *J. Pediatr.* *164*, 980–985