



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

Διαφορετικοί ορότυποι *E.coli* σε τρόφιμα και μέθοδοι ανίχνευσής τους

**Βελετάκου Μαρία
ΑΜ: 16012**

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Χούχουλα Δήμητρα

Αθήνα 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

Diploma Thesis

Different *E. coli* serotypes in food and their detection methods

Veletakou Maria

Registration Number: 16012

**Supervisor name and surname:
Dimitra Houhoula**

Athens, 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

Διαφορετικοί ορότυποι *E.Coli* σε τρόφιμα και μέθοδοι ανίχνευσής τους

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

01	Επιβλέπουσα καθηγήτρια Χούχουλα Δήμητρα	
02	Μέλος Επιτροπής Αντωνόπουλος Διονύσιος	
03	Μέλος Επιτροπής Μπατρίνου Ανθιμία	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **Βελετάκου Μαρία** του **Νικολάου**, με αριθμό μητρώου **16012** φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της **Σχολής Επιστημών Τροφίμων** του **Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων**, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Η Δηλούσα
Βελετάκου Μαρία


Περίληψη

Θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι οι διαφορετικοί ορότυποι των βακτηρίων *Escherichia Coli* στα τρόφιμα και οι μέθοδοι ανίχνευσής τους. Φέρει 4 ομάδες αντιγόνων: τα O - σωματικά αντιγόνα, τα H- αντιγόνα μαστιγίου, τα K- περιβληματικά αντιγόνα, τα F- αντιγόνα. Η διάκριση σε ορότυπους του *E.coli* είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που ξεκινάει από το αντιγόνο O, το οποίο καθορίζει την ορομάδα και τα αντιγόνα H καθορίζουν τους διαφορετικούς ορότυπους. Πρόκειται για έναν δυνητικά παθογόνο μικροοργανισμό που φυσιολογικά αποικίζει τον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου, αλλά και άλλων ζώων όπως τα μηρυκαστικά και τα ερπετά. Ορισμένα στελέχη *E.coli* είναι παθογόνα και ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί από αυτά είτε από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων ή νερού, μέσω επαφής με τα περιττώματα μολυσμένων ζώων ή ανθρώπων. Τα συμπτώματα που μπορεί να παρουσιάσει ένας άνθρωπος που έχει μολυνθεί από παθογόνα στελέχη *E.coli* είναι ποικίλα και κυμαινόμενης σοβαρότητας. Έτσι, μπορεί να εμφανίσει διάρροιες ή ακόμη και εντεροαιμορραγία, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, όπως και μηνιγγίτιδα, πνευμονία ή ακόμη και σηψαιμία. Παραδοσιακά η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των οροτύπων *E.coli* γίνεται με καλλιέργεια βιολογικών υγρών ασθενών ατόμων ή μολυσμένων τροφίμων, αλλά και πιο πρόσφατα με τη βοήθεια φαινοτυπικών μεθόδων ανάλυσης, όπως είναι η ταυτοποίηση με βακτηριοφάγους ή η τεχνική MALDI – TOF MS, ανοσολογικών μεθόδων ανάλυσης, όπως είναι η ELISA ή η δοκιμασία ανοσομαγνητικού διαχωρισμού, μοριακών μεθόδων ανάλυσης, όπως ο πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας (MLST), το πολλαπλό PCR ή η υψηλής απόδοσης PCR σε πραγματικό χρόνο. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν οπτικοί, πιεζοηλεκτρικοί ή ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες.

Λέξεις κλειδιά: *Escherichia coli*, ορότυποι, καλλιέργεια, μοριακοί μέθοδοι, ανοσολογικές μέθοδοι, βιοαισθητήρες

Abstract

The subject of this thesis is the different serotypes of *Escherichia Coli* bacteria in food and their detection methods. It carries 4 groups of antigens: O - somatic antigens, H - flagellar antigens, K - envelope antigens, F - antigens. Differentiation into serotypes of *E. coli* is a complex process that starts with the O antigen, which determines the serogroup, and the H antigens determine the different serotypes. It is a potentially pathogenic microorganism that normally colonizes the gastrointestinal tract of humans, but also of other animals such as ruminants and reptiles. Some strains of *E. coli* are pathogenic and humans can become infected with them either by consuming contaminated food or water, through contact with the feces of infected animals or humans. The symptoms that a person infected with pathogenic strains of *E. coli* can present are varied and vary in severity. Thus, diarrhea or even intestinal bleeding, urinary tract infections, as well as meningitis, pneumonia or even septicemia can occur. Traditionally the detection and identification of *E. coli* serotypes is done by culturing biological fluids of sick individuals or contaminated food, but also more recently with the help of phenotypic analysis methods, such as bacteriophage identification or the MALDI – TOF MS technique, immunological analysis methods, such as ELISA or immunomagnetic separation assay, molecular methods of analysis such as multilocus sequencing (MLST), multiplex PCR or high-throughput real-time PCR. Optical, piezoelectric or electrochemical biosensors may also be used.

Keywords: *Escherichia coli*, serotypes, culture, molecular methods, immunological methods, biosensors

Περιεχόμενα

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	4
Περίληψη	5
Abstract	6
Περιεχόμενα	7
Κατάλογος πινάκων	9
Κατάλογος εικόνων	9
Εισαγωγή	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	11
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ – <i>Escherichia Coli</i>	11
1.1 Εισαγωγικά στοιχεία για το <i>Escherichia coli</i>	11
1.2 Ταξινόμηση και χαρακτηριστικά <i>Escherichia coli</i>	11
1.3 Αντιγόνα <i>Escherichia coli</i>	13
1.3.1 Ο – Σωματικά αντιγόνα	14
1.3.2 Η – Αντιγόνα μαστιγίου	16
1.3.3 Κ – Περιβλημιακά αντιγόνα	16
1.3.4 F – ΑΝΤΙΓΟΝΑ	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	18
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	18
2.1 Γενικά	18
2.2 Παθογόνα στελέχη <i>Escherichia coli</i>	18
2.2.1 Εντερικά παθογόνα <i>Escherichia coli</i> (IPEC)	18
2.2.2 Εξωεντερικά παθογόνα <i>Escherichia coli</i> (ExPEC)	19
2.3 Λοιμώξεις από παθογόνα στελέχη <i>Escherichia coli</i>	20
2.3.1 Τρόπος μετάδοσης	20
2.3.2 Λοίμωξη από εντεροαιμορραγικό <i>E.coli</i>	21
2.3.3 Λοιπές λοιμώξεις από στελέχη <i>Escherichia coli</i>	22
2.4 Κρούσματα στον ελληνικό χώρο	23
2.5 Ευρωπαϊκή και εθνική νομοθεσία για το <i>E.coli</i> στα τρόφιμα	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	30

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ E. COLI	30
3.1 Γενικά στοιχεία	30
3.2 Καλλιέργεια	33
3.3 Φαινοτυπικές μέθοδοι	35
3.3.1 Ταυτοποίηση με βακτηριοφάγους	35
3.3.2. Πολυτοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση	36
3.3.3 MALDI- TOF	37
3.4 Μοριακές μέθοδοι	39
3.4.1 Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Length Polymorphism- RFLP)	39
3.4.2 Πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας	40
3.5 Οπτικοί Βιοαισθητήρες	41
Συμπεράσματα	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Δηλωθέντα κρούσματα λοίμωξης από EHEC στην Ελλάδα κατά την περίοδο 2004-2020	24
Πίνακας 2: Μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα	26
Πίνακας 3: Τεχνικές ανίχνευσης και διάκρισης στελεχών και οροτύπων E.coli	31

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Δομή αντιγόνων του Escherichia coli	14
Εικόνα 2: Σχηματική διάταξη δομής λιποπολυσακχαρίτη E.coli	15
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση ανίχνευσης και ταυτοποίησης παθογόνων βακτηρίων με τη βοήθεια βακτηριοφάγων	36

Εισαγωγή

Το *Escherichia coli* αποτελεί ένα δυνητικά παθογόνο βακτήριο. Η επιμόλυνση των τροφίμων με τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό μπορεί να προκαλέσει προβλήματα και να απειλήσει την υγεία του καταναλωτή. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι μέσα από την βιβλιογραφική αναζήτηση να συγκεντρώσει πληροφορίες για την παρουσία του *E. coli* στα διάφορα τρόφιμα, για τις ασθένειες που μπορεί να προκαλέσει και το βαθμό επικινδυνότητας που μπορεί να παρουσιάζει. Γνωρίζοντας ότι μόνο ορισμένοι ορότυποι του *E.coli* είναι παθογόνοι, αναζητούνται πληροφορίες για την ανίχνευση και ταυτοποίησή τους στα τρόφιμα.

Η εργασία διακρίνεται σε τρία κεφάλαια.

Στο πρώτο κεφάλαιο περιέχονται πληροφορίες για το *Escherichia coli*. Αναφέρονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά και οι σημαντικότερες ιδιότητες που παρουσιάζει, ενώ περιγράφονται τα αντιγόνα του. Εξετάζεται η έννοια της λέξης ορότυπος, καθώς και πως γίνεται η διάκριση σε οροομάδες και ορότυπους.

Το δεύτερο κεφάλαιο ασχολείται με την παθογένεια του *E.coli*. Περιγράφονται ο τρόπος μετάδοσης, τα συμπτώματα της λοίμωξης αλλά και η θεραπεία που το άτομο μπορεί να ακολουθήσει. Επίσης, αναφέρονται ορισμένα μέτρα προστασίας που θα πρέπει να λαμβάνονται από τις μονάδες παραγωγής για ελαχιστοποίηση ή εξάλειψη του κινδύνου επιμόλυνσης με *E.coli*. Τέλος, αναφέρονται τα μέγιστα επιτρεπτά όρια των βακτηρίων που πρέπει να βρίσκονται σε ένα τρόφιμο ώστε το τρόφιμο να είναι ασφαλές και υγιεινό.

Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται μία αναφορά στις συμβατικές αλλά και στις καινοτόμες μεθόδους ανίχνευσης, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης του *E. coli*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ – *Escherichia Coli*

1.1 Εισαγωγικά στοιχεία για το *Escherichia coli*

Το *Escherichia coli* περιγράφηκε για πρώτη φορά στα τέλη το 19^{ου} αιώνα (1855) από τον Γερμανο-αυστριακό παιδίατρο Theodore Escherich (1857 – 1911). Συγκεκριμένα, το 1885, περιέγραψε ένα βακτήριο το οποίο ανιχνεύθηκε στα κόπρανα ατόμων που ήταν υγιή. Στο βακτήριο αυτό δόθηκε η αρχική ονομασία *Bacterium coli commune* ή *Bacillus coli communis*, μία ονομασία που ουσιαστικά μεταφράζεται ως «κοινό βακτήριο του παχέος εντέρου». Η καλλιέργεια του αρχικού δείγματος διακρίθηκε από την αποικία και την κυτταρική του μορφολογία και την ικανότητά του να ζυμώνει γλυκόζη, να παράγει οξύ και ξινόγαλα. Το 1919 απέκτησε τη σημερινή του ονομασία, δηλαδή *Escherichia coli*. Τις επόμενες δεκαετίες, τα χαρακτηριστικά που αρχικά περιέγραφαν το συγκεκριμένο βακτήριο εμπλουτίστηκαν ώστε να γίνει δυνατή η διάκρισή του από άλλα είδη εντεροβακτηρίων (Hacker & Blum-Oehler, 2007; Cobo-Simón et al., 2023).

Τα στελέχη *Escherichia coli* είναι μικροοργανισμοί που αποτελούν μέλος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου, άλλων θερμόαιμων ζώων και ερπετών (Fratamico et al, 2016). Είναι το κυρίαρχο μικρόβιο της ανθρώπινης χλωρίδας του παχέος εντέρου. Αποικίζει τη γαστρεντερική οδό των ανθρώπινων βρεφών μέσα σε λίγες ώρες μετά τη γέννηση και συνυπάρχουν με τον άνθρωπο-ξενιστή, με αμοιβαίο όφελος για δεκαετίες. Το κοινό *E. coli* σπάνια προκαλεί ασθένεια, εκτός από τους ανοσοκατασταλμένους ξενιστές ή αν παραβιαστούν οι φυσιολογικοί γαστρεντερικοί φραγμοί. Αν μετοικήσει από τον γαστρεντερικό σωλήνα τότε μπορεί να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα ασθενειών (Liu et al, 2020). Ορισμένοι κλώνοι *E.coli* απέκτησαν γενετικά στοιχεία που τους επέτρεψαν να αποικίσουν και στο νερό, το έδαφος και διάφορες βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες (Kotlowski et al, 2020).

1.2 Ταξινόμηση και χαρακτηριστικά *Escherichia coli*

Το *Escherichia coli* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο που δεν σχηματίζει σπόρια. Τα περισσότερα από τα στελέχη *E.coli* έχουν περιφερικά μαστίγια και επομένως είναι κινητά (Swelum et al., 2021). Το

βακτηριακό κύτταρο *E.coli* έχει μέσο πλάτος περίπου 0,6 μm και μέσο μήκος περίπου 1,6 μm (Pebdeni et al., 2022).

Είναι σε θέση να αναπτυχθούν τόσο σε αερόβιο όσο και σε αναερόβιο περιβάλλον. Μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικά μέσα στους 18°C - 44°C, ζυμώνουν τη γλυκόζη και παράγουν αέριο. Σε άγαρ αίματος οι αποικίες είναι συνήθως 1-3 mm. Η μορφολογία κάθε αποικίας διαφέρει: υπάρχουν αποικίες τραχιές και μεγάλες, με ακανόνιστα όρια και ομαλές αποικίες καλά οριοθετημένες (Swelum et al., 2021). Είναι θετικό στη λακτόζη, την καταλάση και την ινδόλη, την οξειδάση, την ουρεάση και το κιτρικό αρνητικό, αν και ορισμένες από τις ιδιότητες αυτές παρουσιάζει χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού (Cobo - Simón et al., 2023).

Κατά τη δεκαετία του 1960 για την αποτελεσματικότερη και ορθότερη διάκριση του *E. coli* από άλλα βακτήρια, χρησιμοποιήθηκαν γενετικά και γονιδιωματικά δεδομένα. Εφαρμόστηκαν η τεχνική υβριδισμού DNA-DNA, η οποία είναι μία συγκρίνει και μετράει τον βαθμό γενετικής ομοιότητας που παρουσιάζεται μεταξύ αλληλουχιών DNA. Τα βακτηριακά στελέχη θεωρήθηκαν ως μέλη *E.coli* στην περίπτωση που εμφάνιζαν ομοιότητα DNA μεγαλύτερη ίση με 70% με στελέχη αναφοράς. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτέλεσε ότι δεν πραγματοποιείται σύγκριση του συνολικού DNA, αλλά αλληλουχιών αυτού, οπότε τα ποσοστά της γενετικής ομοιότητας δεν ήταν ακριβή (Cobo- Simón et al., 2023). Στην συνέχεια εφαρμόστηκαν νέες μέθοδοι οριοθέτησης με βάση τις αλληλουχίες του γονιδίου ριβοσωμικού RNA μικρής υπομονάδας (16S rRNA) για την οριοθέτηση βακτηριακών ειδών με προσέγγιση ομοιότητας μεγαλύτερη ή ίση 97% (Yarza et al., 2014) και πιο πρόσφατα μέθοδοι με βάση το 16S ριβοσωμικό RNA με ποσοστό ομοιότητας μεγαλύτερο ή ίσο του 99% (Edgar, 2018).

Το 1984, οι Ochman & Selande, ανέλυσαν φυλογενετικά 72 στελέχη *E. coli*, τα οποία απομόνωσαν από ανθρώπους και από 16 θηλαστικά, από διάφορες γεωγραφικές περιοχές των ΗΠΑ και της Σουηδίας. Με τη βοήθεια της ηλεκτροφόρησης με ένζυμα πολλαπλών θέσεων διέκριναν την ύπαρξη 4 κύριων φυλογενετικών υποομάδων που ονόμασαν A, B1, B2 και D (Kottowski et al., 2020). Μετέπειτα φυλογενετικές αναλύσεις των στελεχών *E.coli* οδήγησαν στην διεύρυνση των υποομάδων αυτών και στην αύξηση του αριθμού τους σε 6 κυρίων υποομάδες με την ονομασία A, B1, B2, D, E, F. Παράλληλα εντοπίστηκαν και αρκετοί κλάδοι, οι οποίοι όμως ήταν πιο σπάνιοι. Η προσθήκη και η ενσωμάτωση πλήρη γονιδιωμάτων και, ταυτόχρονα, η πιο λεπτομερή προσέγγιση των εξελικτικών σχέσεων του *E.coli*,

αναγνωρίστηκαν πιο πολλά υποείδη. Τα στελέχη *E.coli* ταξινομούνται σε έξι κύρια είδη (Cobo- Simón et al., 2023):

- *Escherichia coli*
- *Escherichia coli_E*
- *Escherichia ruyisae*
- *Escherichia marmotae*
- *Escherichia sp001660175*
- *Escherichia sp005843885*

Το πιο πολυπληθές είδος είναι το *E.coli*.

Ένα από τα προβλήματα ταξινόμησης που προκύπτει του *E.coli* είναι ότι το *Shigella* παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά με το *E.coli*. Κάθε στέλεχος που αποδίδεται στο *Shigella* φαίνεται να εμπίπτει στην παραλλαγή που καλύπτει το *E. coli*. Η ταξινόμηση είναι ιδιοσυγκρασιακή και συχνά αντικρουόμενη μεταξύ των ερευνητών. Η γονιδωματική ανάλυση *Escherichia* και *Shigella* επιτρέπει την πιο σαφή διάκριση αφήνοντας ελάχιστα περιθώρια αντιγνωμιών (Cobo- Simón et al., 2023). Ορισμένοι μελετητές υποστηρίζουν την συμπερίληψη των στελεχών *Shigella* στο γένος *Escherichia* (Chaudhuri & Henderson, 2012).

1.3 Αντιγόνα *Escherichia coli*

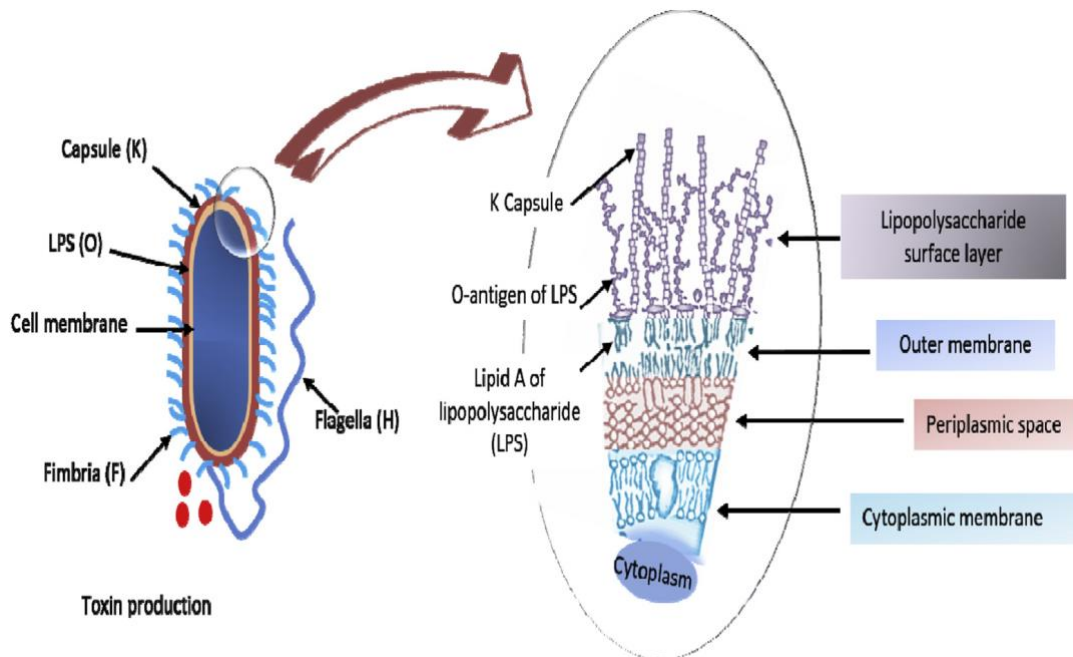
Η παραδοσιακή μέθοδος για την ταυτοποίηση του *E. coli* χρησιμοποιεί αντισώματα για τη δοκιμή επιφανειακών αντιγόνων. Οι ομάδες αντιγόνων που το *E. coli* παρουσιάζει είναι:

- τα O - σωματικά αντιγόνα
- τα H-βλεφαριδικά αντιγόνα
- τα K- αντιγόνα κυτταρικής κάψας ή επιφανειακά
- τα F- αντιγόνα (αντιγόνα φιμπριών)

(Fratamico et al, 2016).

Υπάρχουν επί του παρόντος 18 διαφορετικοί τύποι O αντιγόνου, και 53 τύποι H αντιγόνου, επομένως ο οροτυπικός προσδιορισμός είναι περίπλοκος. Το αντιγόνο O καθορίζει την ορομάδα και τα αντιγόνα K ή H καθορίζουν τους διαφορετικούς ορότυπους. Κατά συνέπεια, όταν με τον όρο ορότυπο νοούνται στελέχη του ίδιου

είδους τα οποία όμως διαφοροποιούνται ως προς τη σύσταση των αντιγόνων τους (Liu et al., 2020).



Εικόνα 1: Δομή αντιγόνων του *Escherichia coli*

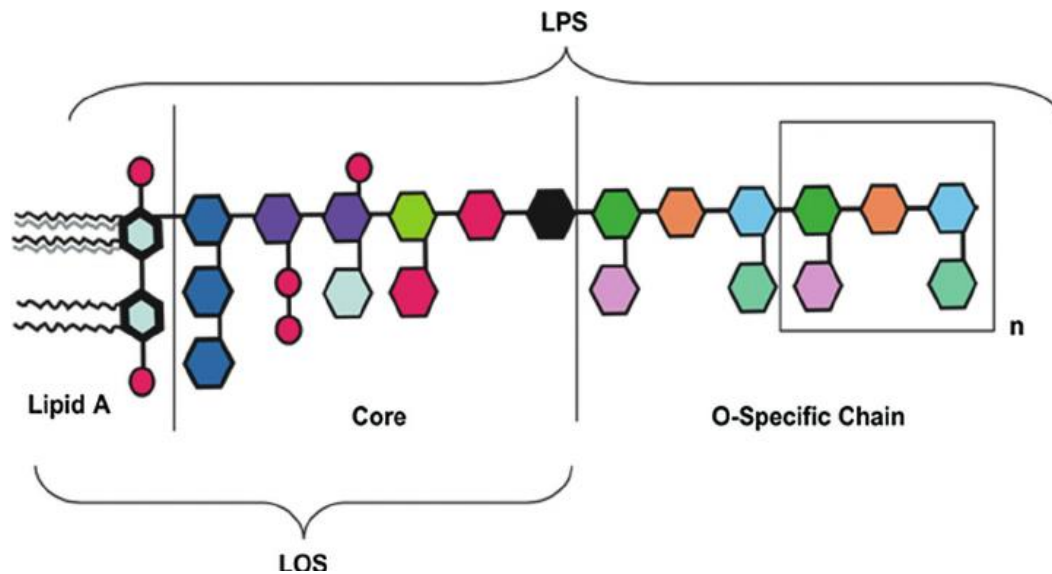
Πηγή: Swelum et al., 2021

1.3.1 O – Σωματικά αντιγόνα

Το *Escherichia coli* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο. Το κυτταρικό του τοίχωμα, κατά συνέπεια, αποτελείται από μία λεπτή στρώση πεπτιδογλυκανών και μία εξωτερική μεμβράνη. Για την ακρίβεια, στην εξωτερική μεμβράνη του *E. coli* βρίσκεται, όπως φαίνεται στην εικόνα 1, λιποπολυσακχαρίτης (LPS) ο οποίος εκτελεί διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Κάθε μόριο λιποπολυσακχαρίτη αποτελείται συνήθως από τρεις δομικές μονάδες (εικόνα 2) (Liu et al., 2020):

- το λιπίδιο A, ένα υδρόφοβο γλυκολιπίδιο το οποίο συγκρατεί τον λιποσακχαρίτη στη βακτηριακή μεμβράνη
- ένα κεντρικό ολιγοσακχαρίτη. Πρόκειται για έναν μη επαναλαμβανόμενο ολιγοσακχαρίτη που περιέχει συνήθως σάκχαρα όπως επτόζη, κετοδεοξυτονικό (KDO)
- το αντιγόνο O, έναν πολυσακχαρίτη που αποτελείται από πολλαπλές μονάδες ολιγοσακχαρίτη (μονάδες O), όπου η κάθε μονάδα αποτελείται από δύο ως επτά

μόρια από ένα ευρύ φάσμα κοινών ή σπάνιων σακχάρων και των παραγώγων τους.



Εικόνα 2: Σχηματική διάταξη δομής λιποτοπολυσακχαρίτη *E.coli*

Πηγή: Silipo et al., 2009

Το αντιγόνο O παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία λόγω των διαφορετικών συνδυασμών των σακχάρων που υπάρχουν στη μονάδα O και των δεσμών εντός και μεταξύ των μονάδων O. Η μεταβλητότητα στη δομή του αντιγόνου O παρέχει τη βάση για τα σχήματα οροτύπωσης πολλών κατά Gram αρνητικών βακτηρίων. Τη δεκαετία του 1940, ο Fritz Kauffmann καθιέρωσε το σχήμα οροτύπωσης για το *E.coli*, το οποίο είχε φθάσει να περιλαμβάνει σύμφωνα με τους Scheutz et al (2004) αντιγόνα O με αριθμό 1 ως 187. Ωστόσο, οι οροομάδες (serogroups) O31, O47, O67, O72, O94 και O122 δεν αναγνωρίζονται πλέον καθώς μερικοί αποτελούν διπλά ονόματα για το ίδιο αντιγόνο O και οι υπόλοιποι ανήκουν σε οργανισμούς που αναταξινομήθηκαν σε άλλα γένη. Αυτό σημαίνει ότι απομένουν 181 O αντιγόνα του *E. coli*. Επίσης, για μερικά αντιγόνα O αναγνωρίστηκε ότι περιέχουν υποομάδες, όπως για παράδειγμα το αντιγόνο O9 περιλαμβάνει το O9 και το O9a αντιγόνα ή στο αντιγόνο O18 ανήκουν οι υποομάδες O18ab και το O18ac, το O28ab και το O28ac στο αντιγόνο O28 και το O112ab και το O112ac στο αντιγόνο O112. Καθώς κάθε υποομάδα διαθέτει ένα μοναδικό αντιγόνο O και συστάδα γονιδίων, στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύουν ανεξάρτητες οροομάδες (serotypes). Έτσι, συνολικά υπάρχουν 185 οροομάδες αντιγόνων O του *E. coli* (Liu et al., 2020).

Η απώλεια των Ο-αντιγόνων οδηγεί σε εξασθενημένη λοιμογόνο δράση, υποδηλώνοντας τη σημασία των αντιγόνων στην αλληλεπίδραση ξενιστή με παθογόνο (Fratamico et al., 2016).

1.3.2 Η –Αντιγόνα μαστιγίου

Το μαστίγιο του *E.coli* είναι πρωτεϊνικής φύσεως ινώδεις δομές. Οι ίνες που σχηματίζουν τα νήματα των βακτηριακών μαστιγίων παράγονται από τον πολυμερισμό μίας πρωτεϊνικής υπομονάδας, της φλαγγελίνης (flaggelin ή fliC). Η φλαγγελίνη (flaggelin) είναι μία σφαιρική πρωτεΐνη με μοριακή μάζα που κυμαίνεται από 30 -40 kDa και λειτουργεί ως αντιγόνο.

Έχουν ορισθεί 53- Η βλεφαριδικά αντιγόνα, τα οποία αριθμούνται από Η1 έως Η56, αλλά οι τύποι Η13, Η22 και Η 50 δεν χρησιμοποιούνται (Fratamico et al., 2016).

1.3.3 Κ – Περιβληματικά αντιγόνα

Υπάρχουν περίπου 80 περιβληματικά αντιγόνα, που είναι κυρίως όξινοι πολυσακχαρίτες. Πρόκειται για επιφανειακά αντιγόνα, τα οποία έχουν την τάση να παρεμποδίζουν τις συγκολλήσεις των αντιγόνων Ο.

1.3.4 F – ANTIFONA

Στις περισσότερες από τις πολυάριθμες λοιμώξεις που προκαλούνται από το *E.coli*, η προσκόλληση των βακτηρίων στον ιστό του ξενιστή στη θέση της λοίμωξης παίζει βασικό ρόλο στη παθογένεση. Αυτή η προσκόλληση πραγματοποιείται από ορισμένες πρωτεϊνωδείς επιφανειακές δομές που ονομάζονται fimbriae, οι οποίες κατά συνέπεια αποτελούν σημαντικούς λοιμογόνους παράγοντες για το συγκεκριμένο βακτήριο (Van den Broeck et al, 2000)

Το 1908, ο Guyot διαπίστωσε ότι ορισμένα στελέχη του *E. coli* είναι ικανά να προκαλέσουν συγκόλληση σε ερυθροκύτταρα ζώων και ανθρώπων. Το 1955, οι Collier & De Miranda απέδειξαν ότι αυτή η συγκόλληση μπορεί να ανασταλεί συγκεκριμένα από τη μαννόζη και οι Duguid et al (1955) απέδειξαν ότι οι ιδιότητες

συγκόλλησης του *E. coli* συσχετίζεται με την παρουσία ορισμένων προεκβολών που εμφανίζονται στη βακτηριακή επιφάνεια. Τις προεκβολές αυτές τις κάλεσαν fimbriae. Με βάση τις αιμοσυγκολλητικές τους ιδιότητες, τα fimbriae διαχωρίζονται σε ευαίσθητα στη μαννόζη (κοινά ή τύπου 1 fimbriae) και ανθεκτικά στη μαννόζη (Van den Broeck et al, 2000)

Τα fimbriae είναι μακριές πρωτεϊνικές προεκβολές στην επιφάνεια του βακτηρίου που έχουν μήκος $0,5 \pm 1,5$ nm. Βρίσκονται περιφερειακά στο βακτηριακό κύτταρο, και το πλήθος τους κυμαίνεται από 100 ± 300 ή ακόμη και σε 1000 ανά βακτήριο (Van den Broeck et al, 2000).

Έχουν περιγραφεί δύο μορφολογικά διαφορετικές ομάδες fimbriae στην επιφάνεια των παθογόνων στελεχών *E. coli* συγκεκριμένα pili και fibrillae. Αν και οι όροι fimbriae και pili χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως συνώνυμα, ο όρος fimbriae χρησιμοποιείται για να δείξει την ομάδα των πρωτεϊνούχων επιφανειακών προεκβολών ενώ ο χαρακτηρισμός pili αναφέρεται σε ένα συγκεκριμένο μορφολογικό χαρακτηριστικό των fimbriae. Το pili είναι άκαμπτες κατασκευές με διάμετρο περίπου 7 ± 8 nm και μια αξονική σπή, ενώ οι fimbriae είναι μάλλον λεπτές και ευπαθείς με ελάχιστη διάμετρο (2 ± 4 nm) (Van den Broeck et al, 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ *ESCHERICHIA COLI*

2.1 Γενικά

Τα τροφιμογενή νοσήματα είναι μία συνεχής απειλή για την υγεία του ανθρώπου. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization – WHO) ετήσια παρουσιάζονται περίπου 600 εκατομμύρια περιπτώσεις τροφιμογενών νοσημάτων και 420 000 θανάτων από τα νοσήματα αυτά, εκ των οποίων το 30% είναι παιδιά μικρότερα των 5 ετών. Για παράδειγμα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ο αριθμός των ατόμων που νοσούν από τροφιμογενείς ασθένειες φθάνει τα 23 εκατομμύρια ετησίως εκ των οποίων οι 5 000 πεθαίνουν (WHO, 2024).

Το *Escherichia coli* αρχικά θεωρήθηκε ότι αποτελείται μόνο από μη παθογόνα στελέχη. Ωστόσο, στη δεκαετία του 1940, στελέχη *E. coli* συσχετίστηκαν και θεωρήθηκαν υπεύθυνα για ορισμένα σοβαρά ξεσπάσματα βρεφικής διάρροιας. Παρόμοια κρούσματα παρατηρήθηκαν σε αρκετές δυτικές χώρες και βρέθηκαν να σχετίζονται με συγκεκριμένους ορότυπους *E. coli*, που συλλογικά αναφέρονται ως το παθογόνο εντεροπαθογόνο *E. coli* (Enteropathogenic *E.coli*, EPEC). Επίσης, στελέχη του συγκεκριμένου βακτηρίου έχει συσχετιστεί με ειλεό διαρροϊκές παθήσεις, ουρολοιμώξεις (Chaudhuri & Henderson, 2012).

2.2 Παθογόνα στελέχη *Escherichia coli*

Μία διάκριση των παθογόνων στελεχών *Escherichia coli*, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες σε ανθρώπους αλλά και ζώα, είναι σε δύο κύριες ομάδες: τα εντερικά παθογόνα *E.coli* (Intestinal Pathogenic *E.coli* – IPEC) και τα εξωεντερικά παθογόνα *E.coli* (Extra-intestinalal pathogenic *E.Coli* - ExPEC) που προκαλούν ασθένεια έξω από το γαστρεντερικό σωλήνα (Kottowski et al., 2020).

2.2.1 Εντερικά παθογόνα *Escherichia coli* (IPEC)

Τα εντερικά παθογόνα στελέχη *E. coli* ταξινομούνται στις εξής κύριες ομάδες (Fratamico et al, 2016):

- εντεροπαθογόνα *E.coli* (Enteropathogenic *E.coli* - EPEC)

- εντεροτοξιγονικά *E. coli* (Enterotoxigenic *E. coli* - ETEC),
- εντεροδιδεισδυτικά *E.coli* (Enteroinvasive *E. coli* - EIEC),
- εντεροπροσκολλητικά *E.coli* (Enteroaggregative *E. coli* - EAEC),
- *E. coli* που παράγει τοξίνη Shiga (Shiga -toxigenic *E.coli* – STEC ή verotoginetic *E.coli* - VTEC). Παράγουν δύο τύπους τοξινών (Stx1, Stx2), και χαρακτηρίζονται από τη μη διάσπαση της σορβιτόλης. Οι τοξίνες αυτές είναι παρόμοιες με την τοξίνη που παράγει η *Shigella dysenteriae*.
 - τα διαχύτως προσκολλημένα *E. coli* (Diffusely adherent *E.coli* - DAEC)
 - προσκολλητικός τύπος *E. coli* (Adherent invasive *E.coli* - AIEC) που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο του Crohn.

Υπάρχουν επίσης υβριδικόι ορότυποι παθογόνων, συμπεριλαμβανομένου του εντεροπροσκολλητικού εντεροαιμορραγικού *E.coli* (enterohaemorrhagic *E.coli* - EHEC), τα οποία φέρουν γονίδια μολυσματικότητας που σχετίζονται με τις ομάδες STEC (παραγωγή τοξίνης Shiga) και EAEC (εντεροπροσκολλητικά). Για παράδειγμα, ο ορότυπος O104: H4 προκάλεσε μια μεγάλη εστία τροφιογενούς ασθένειας το 2011 στη Γερμανία και στις γειτονικές χώρες. Ο συγκεκριμένος ορότυπος ανήκει στα εντεροπροσκολλητικά βακτήρια *E.coli* (EAEC) και, σύμφωνα με την μελέτη των Bielaszewska et al., (2011) εμφάνισε γονίδια που παράγουν την τοξίνη Shiga Στο επεισόδιο αυτό νόσησαν συνολικά περισσότερα από 3800 άτομα με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και αιματηρή διάρροια και προκλήθηκαν 54 θάνατοι (Bielaszewska et al., 2011).

Ορισμένοι ορότυποι *E.coli*, όπως είναι οι ορότυποι O157: H7 και O103: H21 οι οποίοι παράγουν την τοξίνη Shiga (STEC), συχνά αναφέρονται ως εντεροαιμορραγικοί *E. coli* (EHEC). Επομένως, το παθογόνο *E.coli* αποτελεί μια γενετικά ετερογενή οικογένεια βακτηρίων και τα οποία συνεχίζουν να εξελίσσονται (Fratamico et al, 2016).

2.2.2 Εξωεντερικά παθογόνα *Escherichia coli* (ExPEC)

Τα εξωεντερικά παθογόνα στελέχη *E.coli* (Extra-intestinalal pathogenic *E.coli* - ExPEC) προκαλούν ασθένεια που δε σχετίζεται με το γαστρεντερικό σωλήνα, συμπεριλαμβανομένων λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος (ουροπαθογόνο

E.coli – UPEC), μηνιγγίτιδα (meningitis-associated *E.coli* - MNEC), πνευμονία, σηψαιμία (septicemia-associated *E.coli* - SEPEC) και άλλων τύπων λοιμώξεων (Fratamico et al, 2016).

Επίσης, για παράδειγμα ένα εξωεντερικό παθογόνο στέλεχος *E.coli* προκαλεί ασθένεια στα πουλερικά είναι γνωστό ως παθογόνο *E. coli* των πτηνών (Avian pathogenic *E.coli* - APEC). Η κολιβακίλωση των πτηνών που προκαλείται από το παθογόνο αυτό είναι μια σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας που σχετίζεται με οικονομικές απώλειες στη βιομηχανία πουλερικών σε όλο τον κόσμο (Fratamico et al, 2016).

Το ανθρώπινο έντερο είναι μια δεξαμενή για το εξωεντερικό παθογόνο στέλεχος *E. coli* που προκαλεί ανθρώπινη ασθένεια. Όταν το ExPEC εγκαταλείπει το γαστρεντερικό σωλήνα και μολύνει άλλα μέρη του σώματος, όπως το ουροποιητικό σύστημα, το αίμα ή τους πνεύμονες, προκύπτουν διάφορες ασθένειες. Επίσης, ζωικά προϊόντα, όπως κρέας πουλερικών, χοίρων ή βοοειδών, κρεατοσκευάσματα και προϊόντα που παράγονται από αυτά τα ζώα, καθώς και τα ζώα συντροφιάς μπορούν να μεταφέρουν ExPEC, τα οποία μπορούν να μεταφερθούν μέσω της διατροφικής αλυσίδας στον άνθρωπο. Επίσης, ζωνοσογόνα παθογόνα μπορούν επίσης να αποκτηθούν κατά την επαφή με ζώα (Fratamico et al., 2016).

2.3 Λοιμώξεις από παθογόνα στελέχη *Escherichia coli*

2.3.1 Τρόπος μετάδοσης

Οι κυριότερες πηγές παθογόνων βακτηρίων *E.coli* είναι βοοειδή και άλλα μηρυκαστικά όπως οι κασίκες, τα πρόβατα και τα ελάφια.). Ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί και να νοσήσει με την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή νερού είτε μέσω επαφής με περιττώματα ζώων ή ανθρώπων που έχουν μολυνθεί με *E.coli*, ανεξάρτητα αν νοσούν ή όχι, ακόμη και από γαλακτοκομικά προϊόντα (McClean et al., 2018).

Συνήθως, οι τροφές που μολύνονται με *E.coli* και μολύνουν και τον άνθρωπο είναι είτε ωμές είτε ατελώς μαγειρεμένες. Το *E.coli* μπορεί να εντοπισθεί σε κρέας, φρούτα ή λαχανικά και διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως μη παστεριωμένο φρέσκο γάλα, μαλακά τυριά και γιαούρτι. Η μόλυνση ενός τροφίμου πραγματοποιείται κυρίως κατά τη διαδικασία παραγωγής του τροφίμου ή κατά την προετοιμασία του για

κατανάλωση. Αν η εφαρμογή των ορθών πρακτικών υγιεινής και των ορθών πρακτικών παρασκευής τηρούνται ελλιπώς, τότε ο κίνδυνος να επιμολυνθεί ένα τρόφιμο με παθογόνα στελέχη *E. coli*, πολλαπλασιάζονται. Για παράδειγμα, μία τέτοια περίπτωση είναι όταν ένα μολυσμένο άτομο δεν πλένει τα χέρια του καλά μετά τη χρήση της τουαλέτας ή σε περιβάλλον όπου δεν τρόφιμο μπορεί να μολυνθεί κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του προς κατανάλωση από μολυσμένο άτομο που δεν έπλυνε καλά τα χέρια του μετά τη χρήση τουαλέτας (ΕΟΔΥ, 2021α).

Επίσης, ένα άτομο μπορεί να μολυνθεί από την κατάποση μολυσμένου νερού είτε πόσιμου είτε νερού θάλασσας, λίμνης ή πισίνας. Η μόλυνση μπορεί να γίνει αν ο άνθρωπος έρθει σε επαφή με ζώα που έχουν μολυνθεί όπως είναι τα βοοειδή ή τα μηρυκαστικά ή ακόμη και τα κόπρانا μολυσμένου ατόμου. Οι οίκοι ευγηρίας και οι παιδικοί σταθμοί παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο (ΕΟΔΥ, 2021α).

Ως «υποδόχα» (reservoirs) των λοιμογόνων παραγόντων θεωρούνται οι άνθρωποι, τα άλλα σπονδυλωτά, τα αρθρόποδα (ιδίως έντομα), τα φυτά ή τα στοιχεία του άψυχου περιβάλλοντος (π.χ. νερό, έδαφος), στα οποία οι λοιμογόνοι παράγοντες ζουν και (δυναμικά) πολλαπλασιάζονται με τρόπο που να επιτρέπει την επιβίωσή τους και την παραπέρα μετάδοσή τους.

2.3.2 Λοίμωξη από εντεροαιμορραγικό *E.coli*

Ο χρόνος που μεσολαβεί από την έκθεση (π.χ. κατανάλωση ενός μολυσμένου τροφίμου) μέχρι την εμφάνιση των συμπτωμάτων κυμαίνεται από δύο έως και δέκα ημέρες, συνήθως 3 με 4. Τα συμπτώματα ξεκινούν αργά με ήπιο κοιλιακό πόνο ή διάρροια που χειροτερεύει κατά τη διάρκεια των επόμενων ημερών. Το ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο είναι μία επιπλοκή που μπορεί να αναπτυχθεί περίπου 7 ημέρες μετά την έναρξη των πρώτων συμπτωμάτων.

Το νόσημα μπορεί να μεταδοθεί από άτομο σε άτομο όσο το βακτήριο αποβάλλεται στα κόπρانا του μολυσμένου ατόμου. Το βακτήριο, φυσιολογικά εξαφανίζεται από τα κόπρانا μετά το πέρας της ασθένειας. Ένα ενήλικο άτομο που νοσεί μπορεί να αποβάλλει το παθογόνο έως και μία εβδομάδα μετά την εκδήλωση των συμπτωμάτων, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες συνεχίζει να αποβάλλεται για εβδομάδες μετά την ύφεση των συμπτωμάτων. Τα μικρά παιδιά φέρουν συνήθως το βακτήριο για περισσότερο καιρό από τους ενήλικες. Το καλό

πλύσιμο των χεριών και η τήρηση των κανόνων υγιεινής μειώνουν σημαντικά την πιθανότητα να μολυνθεί κάποιος μέσω της επαφής του με άλλο άτομο.

2.3.2.1 Συμπτώματα

Τα συμπτώματα της λοίμωξης από εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο ποικίλουν ανάλογα με το άτομο που νοσεί και συνήθως περιλαμβάνουν κοιλιακές κράμπες, απότομη έναρξη υδαρούς διάρροιας (συχνά αιμορραγικής) και εμέτους. Κάποιες φορές, η διάρροια είναι μη αιμορραγική ή δεν υπάρχουν καθόλου συμπτώματα. Εάν εμφανιστεί πυρετός, συνήθως δεν είναι πολύ υψηλός (μπορεί να φτάσει μέχρι και τους 38,5°C).

Περίπου 5-10% των ατόμων που διαγιγνώσκονται με λοίμωξη από εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο (κυρίως τα παιδιά κάτω των 5 ετών και οι ηλικιωμένοι) αναπτύσσουν μια επιπλοκή, που είναι γνωστή ως ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο (hemolytic uremic syndrome, HUS). Κάποια από τα συμπτώματα που υποδεικνύουν ότι κάποιος αναπτύσσει το σύνδρομο είναι η μειωμένη ούρηση, η κόπωση και η ωχρή όψη του προσώπου. Τα άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο πρέπει να εισάγονται για νοσηλεία γιατί κινδυνεύουν να αναπτύξουν νεφρική ανεπάρκεια και άλλα σημαντικά προβλήματα. Τα περισσότερα άτομα που εμφανίζουν το σύνδρομο αναρρώνουν μέσα σε λίγες εβδομάδες, παρ' όλα αυτά δεν αποκλείεται ο κίνδυνος για κάποιους να υποστούν μόνιμες βλάβες ή και να πεθάνουν.

2.3.2.2 Θεραπεία

Δεν υπάρχει κάποια ειδική θεραπεία. Συστήνεται η κατανάλωση πολλών υγρών για την αντιμετώπιση της αφυδάτωσης που προκαλείται από τη διάρροια και τους εμέτους. Η θεραπεία με αντιβιοτικά, αλλά και η λήψη αντιδιαρροϊκών φαρμάκων δεν συστήνεται, γιατί η λήψη τους μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών.

2.3.3 Λοιπές λοιμώξεις από στελέχη *Escherichia coli*

- Λοιμώξεις από *Escherichia coli* που παράγουν τοξίνη τύπου Shiga. Έχουν αναγνωριστεί περίπου 200 διαφορετικοί ορότυποι *Escherichia coli* που παράγουν τοξίνη τύπου Shiga. Περισσότεροι από τους μισούς έχει βρεθεί ότι

συσχετίζονται με την εμφάνιση νόσου στους ανθρώπους. Από τους ορότυπους αυτούς, ο πιο σημαντικός κλινικά θεωρείται ο O157:H7, αν και εκτιμάται ότι έως και 50% των λοιμώξεων από *E.coli* που παράγει τοξίνες τύπου Shiga προκαλούνται από άλλους ορότυπους, όπως είναι οι O26, O111, O103, O45, O121 και O145. Ο ορότυπος O157:H7 μπορεί να προκαλέσει μετά από κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή νερού, διάρροια, αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Krause et al, 1996).

- Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος από Escherichia coli. Οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος αποτελούν ορισμένες από τις πιο κοινές βακτηριακές λοιμώξεις. Ο μικροοργανισμός που είναι πιο συχνά υπεύθυνος για τις λοιμώξεις αυτές είναι το *E.coli*, σχεδόν σε ποσοστό 80%. Το παθογόνο βακτήριο μπορεί να εισέλθει από την ουρήθρα στην ουροδόχο κύστη και η μόλυνση να ξεκινήσει. Τα στελέχη *E.coli* που προκαλούν ουρολοίμωξη είναι εξωεντερικά παθογόνα που, συχνά καλούνται και ως ουροπαθογόνα *E.coli* (UPEC) (Matsui et al., 2020). Σύμφωνα με έρευνα των Matsui et al., (2020) φαίνεται ότι τα στελέχη *E.coli* που προκαλούν ουρολοίμωξη αποικίζουν παροδικά το έντερο, αλλά η κύρια δεξαμενή τους φαίνεται ότι είναι εκτός ανθρώπινου εντέρου. Για την ακρίβεια, από τον Μάιο έως τον Οκτώβριο του 2018, αναλύθηκαν με τη διαδικασία MLST, 89 απομονώσεις *E. coli* από 76 ορθικά επιχρίσματα από 113 υγιείς εθελοντές και 106 απομονώσεις *E. coli* από 398 δείγματα ούρων ασθενών με ουρολοίμωξη, που συλλέχθηκαν μεταξύ Αυγούστου και Οκτωβρίου 2018. Οι απομονώσεις *E. coli* κοπράνων και ούρων περιείχαν συνολικά 31 διαφορετικούς τύπους αλληλουχίας, εκ των οποίων οι 9 ήταν κοινοί μεταξύ κοπράνων και ούρων και αντιπροσώπευαν το 50% περίπου του συνόλου των απομονώσεων ούρων (Matsui et al., 2020).

2.4 Κρούσματα στον ελληνικό χώρο

Η λοίμωξη από εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο αποτελεί το σπανιότερα δηλούμενο τροφιμογενές νόσημα του συστήματος υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων στη χώρα μας. Η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση της λοίμωξης από EHEC για το χρονικό διάστημα 2004-2010 ήταν 0,06/1.000.000 κατοίκους κατ'έτος(συνολικά δηλώθηκαν 5 κρούσματα), ενώ η μέση δηλούμενη επίπτωση στις

χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των χωρών της ΕΕΑ/ΕΦΤΑ (European Economic Area/European Free Trade Association), ήταν σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα δεδομένα, 6,60 κρούσματα ανά 1.000.000 κατοίκους. Το χρονικό διάστημα 2004-2020 δηλώθηκαν 22 κρούσματα, Αύξηση των δηλωθέντων κρουσμάτων σημειώθηκε το 2019, όπου καταγράφηκαν πέντε κρούσματα, τα τέσσερα εκ των οποίων την περίοδο Απρίλιος-Ιούλιος στις Περιφερειακές Ενότητες Μαγνησίας και Ημαθίας. Η διερεύνηση δεν ανέδειξε επιδημιολογική σύνδεση μεταξύ των κρουσμάτων (ΕΟΔΥ, 2021β).

Το 2020 σημειώθηκε συρροή κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας μικτής αιτιολογίας στην Περιφερειακή Ενότητα Αργολίδας. Τα παθογόνα STEC και *E.coli* O157 ήταν μεταξύ αυτών που ανιχνεύθηκαν σε κλινικά δείγματα. Η μελέτη ασθενών-μαρτύρων που διενεργήθηκε ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην εμφάνιση συμπτωμάτων γαστρεντερίτιδας και α) την κατανάλωση νερού βρύσης (OR=10,9, 95%CI=3,1-38,0, $p<0,001$) καθώς και β) τη χρήση παγοκύβων από νερό της βρύσης (OR=39,3, 95%CI=10,3-150,9, $p<0,001$), ανεξάρτητα από τους υπόλοιπους παράγοντες του μοντέλου (ΕΟΔΥ, 2021β).

Η δηλωθείσα επίπτωση στην Ελλάδα για το 2020 ήταν 0,3 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού. Για την ερμηνεία της διαφοράς συγκριτικά με την Ευρωπαϊκή Ένωση θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η ενδεχόμενη υποδήλωση στα συστήματα επιτήρησης, το γεγονός ότι η δυνατότητα εργαστηριακής διάγνωσης του νοσήματος μεταξύ των χωρών ποικίλλει, καθώς και οι διαφορετικές διατροφικές συνήθειες των πληθυσμών (ΕΟΔΥ, 2021β).

Ο συνήθης ορότυπος που έχει ενοχοποιηθεί για το μεγαλύτερο ποσοστό επιδημιών διεθνώς είναι ο O157:H7, παρόλα αυτά, έχουν προκύψει στο παρελθόν επιδημίες από διαφορετικούς ορότυπους, όπως η πρόσφατη μεγάλη επιδημία στη Γερμανία και στις γειτονικές χώρες, το Μάιο του 2011 με υπεύθυνο ορότυπο τον O104:H4 (ΕΟΔΥ, 2024).

Πίνακας 1: Δηλωθέντα κρούσματα λοίμωξης από EHEC στην Ελλάδα κατά την περίοδο 2004-2020

Έτος	Αριθμός κρουσμάτων
2004	2
2005	0

2006	1
2007	1
2008	0
2009	0
2010	1
2011	1
2012	0
2013	2
2014	1
2015	1
2016	2
2017	3
2018	1
2019	5
2020	3
Σύνολο	24

Πηγή: ΕΟΔΥ, 2021

2.5 Ευρωπαϊκή και εθνική νομοθεσία για το *E.coli* στα τρόφιμα

Η διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων και της υγείας των καταναλωτών αποτελεί βασική αρχή και απαίτηση της βιομηχανία τροφίμων. Ένα αυστηρό νομοθετικό πλαίσιο έχει εισαχθεί που θεσπίζει μικροβιολογικά κριτήρια για τα διατροφικά προϊόντα, καθώς και την υποχρεωτική εργαστηριακή ανάλυση των προϊόντων σε κάθε μονάδα παραγωγής τροφίμων. Εκτός από τον κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, η μη έγκαιρη ανίχνευση μικροοργανισμών μπορεί επίσης να έχει σημαντικές οικονομικές συνέπειες λόγω της ανάκλησης προϊόντων. Ειδικά στα ευαίσθητα προϊόντα, η ταχεία ανίχνευση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών θεωρείται απαραίτητη, διότι σε αυτή την περίπτωση, η διανομή και η εμπορία εξαρτώνται άμεσα από αυτό. Για να εξασφαλισθεί η απρόσκοπτη λειτουργία μίας βιομηχανίας τροφίμων, οι περισσότερες βιομηχανίες έχουν προβλέψει

τη διενέργεια τακτικών μικροβιολογικών δοκιμών, τόσο στο τελικό προϊόν όσο και δειγματοληπτικά στη γραμμή παραγωγής και στον περιβάλλοντα χώρος. Εάν εντοπισθεί μία πηγή μόλυνσης πρέπει να ληφθούν όλα τα απαραίτητα μέτρα ώστε να εξαλειφθούν (Nakamura et al., 2021).

Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή και την εθνική νομοθεσία, καθορίζεται ο μέγιστος επιτρεπόμενος αριθμός Enterobacteriaceae που επιτρέπεται να ανιχνεύονται σε ένα τρόφιμο ώστε θεωρηθεί ασφαλές, υγιεινό και κατάλληλο για κατανάλωση. Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, ο οποίος είναι σε ισχύ και τροποποιήθηκε τελευταία φορά στις 8/3/2020, υπεύθυνοι για τα τρόφιμα ώστε να πληρούν τα μικροβιολογικά κριτήρια είναι οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων. Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων οφείλουν να λαμβάνουν τα απαραίτητα μέτρα για κάθε «στάδιο της παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής τροφίμων, συμπεριλαμβανόμενης της λιανικής πώλησης, στο πλαίσιο των διαδικασιών τους που βασίζονται στις αρχές του συστήματος HACCP και των ορθών πρακτικών τους». Στο παράρτημα I του Κανονισμού αναφέρονται οι αναλυτικές μέθοδοι, το πλάνο και οι μέθοδοι δειγματοληψίας, καθώς και τα μικροβιολογικά κριτήρια που πρέπει να ισχύουν ώστε να εξασφαλιστεί η ασφάλεια και η υγιεινή των τροφίμων. Στον πίνακα 1, αναφέρονται τα μικροβιολογικά κριτήρια των τροφίμων που αφορούν τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae και, όπου κρίνεται απαραίτητο, συγκεκριμένα του *E.coli*. Σημειώνεται ότι το *E.coli* λειτουργεί ως ένδειξη για κοπρανώδη μόλυνση ή ως δείκτης του επιπέδου υγιεινής που ακολουθείται στην γραμμή παραγωγής και επεξεργασίας του τροφίμου.

Πίνακας 2: Μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα

Κατηγορία τροφίμων	Αποδεκτά όρια	Αναλυτική μέθοδος αναφορά	Μικροοργανισμός - Στάδιο εφαρμογής κριτηρίου- Μέτρα
Ζώντα δίθυρα μαλάκια και ζώντα εχινόδερμα, χιτωνόζωα και γαστερόποδα	230 MPN έως 700 MPN / 100g σάρκας και ενδοθυρικού υγρού	EN ISO 16649-3	<i>E.coli</i> – Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Φύτρα	Να μην ανιχνεύεται στα 25 g τροφίμου	CEN/ISO TS 13136	<i>E. coli</i> που παράγει σιγκατοξίνη (STEC), δηλαδή O157, O26, O111, O103,

			O145, O104:H4 - Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Σφάγια βοοειδών, προβάτων, αιγών και αλόγων	Μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 1,5 -2,5 cfu/cm ²	EN ISO 21528-2	Enterobacteriaceae – Σφάγια μετά την ψύξη - Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή και επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας
Σφάγια χοίρων	Μέση ημερήσια λογαριθμική τιμή 2,0 – 3,0 cfu/cm ²	EN ISO 21528-2	Enterobacteriaceae – Σφάγια μετά την ψύξη - Βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή και επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας
Κιμάς	50 – 500 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	<i>E. coli</i> – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Βελτίωση στην υγιεινή της παραγωγής, καθώς και στην επιλογή ή/και την καταγωγή των πρώτων υλών
Μηχανικώς διαχωρισμένο κρέας (ΜΔΚ)	50 – 500 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	<i>E. coli</i> – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Βελτίωση στην υγιεινή της παραγωγής, καθώς και στην επιλογή ή/και την καταγωγή των πρώτων υλών
Παρασκευάσματα κρέατος	500 – 5000 cfu/g ή cm ²	ISO 16649-1 ή 2	<i>E. coli</i> – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Βελτίωση στην υγιεινή της παραγωγής, καθώς και στην επιλογή ή/και την καταγωγή των πρώτων υλών
Παστεριωμένο γάλα και άλλα παστεριωμένα υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα	10 cfu/ml	EN ISO 21528-2	Enterobacteriaceae – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της θερμικής επεξεργασίας και της πρόληψης της επαναμόλυνσης καθώς και της ποιότητας των πρώτων υλών
Τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία	100-1000 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	<i>E. coli</i> – Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής, τη στιγμή κατά την οποία αναμένεται ο μέγιστος αριθμός <i>E. coli</i> – Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και

			στην επιλογή των πρώτων υλών
Βούτυρο και κρέμα από νωπό γάλα ή από γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία σε θερμοκρασία χαμηλότερη από της παστερίωσης	10 – 100 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	<i>E. coli</i> – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών
Γάλα σε σκόνη και ορός γάλακτος σε σκόνη	10 cfu/g	EN ISO 21528-2	Enterobacteriaceae – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της θερμικής επεξεργασίας και πρόληψη της επαναμόλυνσης
Παγωτό και κατεψυγμένα επιδόρπια με βάση το γάλα	10 – 100 cfu/g	EN ISO 21528-2	Enterobacteriaceae – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Βελτιώσεις στην υγιεινή παραγωγής
Παρασκευάσματα για βρέφη σε σκόνη και τρόφιμα που προορίζονται για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς σε σκόνη για βρέφη ηλικίας κάτω των έξι μηνών	Να μην ανιχνεύεται σε 10g	EN ISO 21528-2	Enterobacteriaceae – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Βελτιώσεις στην υγιεινή παραγωγής για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης
Παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας σε σκόνη	Να μην ανιχνεύεται σε 10g	EN ISO 21528-2	Enterobacteriaceae – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Βελτιώσεις στην υγιεινή παραγωγής για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης
Προϊόντα αυγών	10 – 100 cfu/g ή ml	EN ISO 21528-2	Enterobacteriaceae – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της θερμικής επεξεργασίας και πρόληψη της επαναμόλυνσης

Με κέλυφος και χωρίς κέλυφος προϊόντα βρασμένων μαλακοστράκων και μαλακίων	1 -10 MPN/g	ISO TS 16649-3	<i>E. coli</i> – Τέλος της διαδικασίας παρασκευής – Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής
Κομμένα φρούτα και λαχανικά (έτοιμα προς κατανάλωση)	100-1000 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	<i>E. coli</i> – Διαδικασία παρασκευής – Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών
Μη παστεριωμένοι χυμοί φρούτων και λαχανικών (έτοιμοι προς κατανάλωση)	100-1000 cfu/g	ISO 16649-1 ή 2	<i>E. coli</i> – Διαδικασία παρασκευής – Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής και στην επιλογή των πρώτων υλών

Πηγή: Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005

Σύμφωνα με το παράρτημα Ι του κανονισμού (ΕΚ) 2073/2005, τα αποτελέσματα των δοκιμών αποτελούν απόδειξη της μικροβιολογικής ποιότητας τη διαδικασίας παραγωγής που ακολουθείται. Αν οι τιμές των μετρήσεων είναι μικρότερες του κατώτερου ορίου τότε η διαδικασία κρίνεται σαν ικανοποιητική, αν κυμαίνονται μεταξύ των αποδεκτών ορίων τότε η διαδικασία θεωρείται αποδεκτή και αν υπερβαίνει το ανώτερο όριο η διαδικασία είναι μη ικανοποιητική και πρέπει να ληφθούν μέτρα βελτίωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ E.COLI

3.1 Γενικά στοιχεία

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του *Escherichia coli* παραδοσιακά χρησιμοποιούνται μικροβιολογικές μέθοδοι, όπως οι καλλιέργειες. Ωστόσο πρόκειται για χρονοβόρες διαδικασίες οι οποίες συνήθως απαιτούν μέρες για να δώσουν αποτελέσματα. Ο χρόνος για τον προσδιορισμό ορότυπου είναι από 2 έως 12 ημέρες, (Chui et al., 2015). Σταδιακά γίνεται προσπάθεια να αντικατασταθούν από ταχύτερες τεχνικές, οι οποίες θα δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα σε λίγα λεπτά ή σε λίγες ώρες και θα είναι ευαίσθητες και ακριβείς.

Έτσι, εκτός από την καλλιέργεια έχουν εφαρμοστεί:

- φαινοτυπικές μέθοδοι
- μοριακές μέθοδοι
- ανοσολογικές μέθοδοι
- αναλυτικές μέθοδοι
- μέθοδοι που βασίζονται στη χρήση βιοαισθητήρων

Στις περισσότερες από τις τεχνικές αυτές παραμένει το πρόβλημα ότι απαιτείται χρόνος για την προετοιμασία των δειγμάτων, όπως προ-εμπλουτισμός ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των κυττάρων ή/και διάκριση των ζώντων από τα νεκρά κύτταρα. Συνήθως η διάκριση αυτή πραγματοποιείται με την προσθήκη κατάλληλων χρωστικών ουσιών (Wang et al., 2021).

Στον πίνακα 3, παρουσιάζονται ορισμένες τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί τις τελευταίες δεκαετίες για τη διάκριση των οροτύπων *E.coli*.

Πίνακας 3: Τεχνικές ανίχνευσης και διάκρισης στελεχών και οροτύπων *E.coli*

Μέθοδος	O-αντιγόνο	H-αντιγόνο	Γονίδια σχετικά με λοιμογόνο δράση ή άλλα	Μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί	Αναφορά
Φαινοτυπικές μέθοδοι					
Ταυτοποίηση με βακτηριοφάγους (bacteriophage typing)				✓	Ahmed et al., 1987; Krause et al., 1996; Wang et al., 2021
Πολυτοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση (Multilocus enzyme electrophoresis – MLEE)				✓	Milkman, 1973; Selander et al., 1986
MALDI-TOF		✓		✓	Chui et al., 2015; Mclean et al., 2018; Kubo et al., 2021; Manfredi et al., 2023
Μοριακές μέθοδοι					
Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Length Polymorphism - RFLP)	✓	✓	✓		Prager et al., 2003; Moreno et al, 2006; Kottowski et al., 2020
Δοκιμασία με βάση συστοιχίες με μικροσφαιρίδια Luminex (Luminex-based suspension assay)	✓				Carter et al., 2016; Shrinet et al., 2023; Punia et al., 2024
Amplified fragment length polymorphisms (AFLP)				✓	Hahm et al., 2003;
Οπτική χαρτογράφηση (Optical mapping)			✓	✓	Miller, 2013; Trongiit, &

					Chuanchue n, 2021
Ριβοτυποποίηση (Ribotyping)				✓	Carson et al., 2001; Anjum et al., 2023
Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA)				✓	Camelena et al., 2019; Farahani et al., 2020; Ozgen et al., 2023
Παλμική ηλεκτροφόρηση γέλης (Pulsed-field gel electrophoresis -PFGE)			✓	✓	Akindolire & Ateba, 2018; Dong et al., 2017; Bonyadian et al., 2024
Πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας (Multilocus sequence typing - MLST)				✓	Matsui et al., 2020; Nakamura et al., 2021; Jonare et al., 2023
Υψηλής απόδοσης PCR σε πραγματικό χρόνο (High throughput real time PCR)	✓	✓	✓		Tseng et al., 2014; Delannoy et al., 2023; Pakbin et al., 2023; Shan et al., 2024
Πολλαπλό PCR (Multiplex PCR)	✓	✓	✓		Ludwig et al., 2020; Shin et al., 2024
Αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος σε συνδυασμό με ανάλυση SNP (Whole genome sequencing and SNP analysis)	✓	✓	✓	✓	Reid et al., 2020; Cookson et al., 2022; Blankenship et al., 2023
Προφίλ γονιδίου μολυσματικότητας (Virulence gene profiles)				✓	Rubab & Oh, 2020; Allami et al., 2022; Fang et al., 2023

Τεχνολογία γενετικής CRISPRs				✓	Tong et al., 2021; Widney et al., 2024
Microarray (μικροσυστοιχία)	✓	✓	✓	✓	Jin et al., 2005; Rathore et al., 2024; Gwida et al., 2020;
Βιοαισθητήρες					
Οπτικοί βιοαισθητήρες (optical biosensors)					Pebdeni et al., 2022
Ανοσοαισθητήρες (immunosensors)					Mutlaq et al., 2021; Uda et al., 2024
Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες (transcription aptasensors)					Razmi et al., 2020
Αναλυτικές μέθοδοι					
PCR – mass spectroscopy	✓	✓	✓	✓	Stomberg et al., 2015

3.2 Καλλιέργεια

Η ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων, άρα και του *E.coli*, στα τρόφιμα παραδοσιακά πραγματοποιείται με μεθόδους που βασίζονται στην καλλιέργεια. Το σημαντικό πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η αξιοπιστία και η ακρίβεια, καθώς μπορούν να ανιχνεύσουν ένα και μόνο βιώσιμο κύτταρο που βρίσκεται στο δείγμα των τροφίμων και παράλληλα με τη χρήση κατάλληλων υποστρωμάτων μπορούν να ταυτοποιήσουν και να επιβεβαιώσουν την παρουσίας απομονώσεων *E.coli* (Wang et al., 2021).

Πρακτικά στη μικροβιολογία τροφίμων ως βιώσιμο θεωρείται ένας μικροοργανισμός ο οποίος μπορεί να αναπαραχθεί σε ένα κατάλληλο υγρό μέσο καλλιέργειας ή να παράγει αποικία η οποία είναι ορατή σε ένα στερεό μέσο

καλλιέργειας. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι περιβαλλοντικές συνθήκες (πίεση, θερμοκρασία, υγρασία, pH) μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη ή τον μεταβολισμό του, με αποτέλεσμα παροδικά να χάσει την ικανότητα ανάπτυξης είτε μέσα σε ένα τρόφιμο είτε σε ένα μέσο καλλιέργειας. Έτσι, εκτός από τους μικροοργανισμούς που είναι βιώσιμοι και πλήρως ικανοί να δημιουργήσουν αποικίες, διακρίνονται και άλλες τρεις μεταβολικές και φυσιολογικές καταστάσεις μεταξύ ζωής και θανάτου των μικροοργανισμών (Foddai & Grant, 2020):

- Υποθανατηφόρα τραυματισμένος. Παρουσιάζει βλάβες σε βασικές δομές του κυττάρου που επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργικές. Η ανάπτυξη του σε επιλεκτικά μέσα είναι περιορισμένη. Η παρουσία του αποδεικνύεται κυρίως με τη χρήση μη επιλεκτικών μέσων
- Βιώσιμος αλλά μη καλλιεργήσιμος. Παρουσιάζει μικρή, αλλά ανιχνεύσιμη μεταβολική δραστηριότητα, διατηρεί ακόμη αέραια την κυτταρική μεμβράνη, αλλά δεν μπορεί να σχηματίσει αποικίες σε στερεά μέσα καλλιέργειας.
- Αδρανής. Παρουσιάζει αμελητέα μεταβολική δραστηριότητα που δεν ανιχνεύεται.

Συνοπτικά, τα κυριότερα στάδια που πραγματοποιούνται κατά την ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων με καλλιέργεια είναι (Foddai & Grant,., 2020):

1. Το πρώτο στάδιο που πραγματοποιείται, συνήθως είναι ο προεμπλουτισμός των δειγμάτων. Χρησιμοποιείται ένα μη εκλεκτικό μέσο, στο οποίο τα μικροβιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται επαρκώς
2. Ακολουθεί το στάδιο του επιλεκτικού εμπλουτισμού του δείγματος το οποίο πραγματοποιείται σε εκλεκτικό μέσο, ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των κυττάρων του E.coli και να διακοπεί η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Ως εκλεκτικός παράγοντας στο στάδιο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ουσίες, όπως αντιβιοτικά, χρωμογόνες ουσίες, απορρυπαντικά, ανόργανες ή /και οργανικές ενώσεις
3. Ενοφθαλισμός σε στερεά καλλιεργητικά μέσα, τα οποία συνήθως περιέχουν και εκλεκτικούς παράγοντες ανάπτυξης.
4. Εφαρμογή βιοχημικών, ορολογικών ή μοριακών τεστ για την ταυτοποίηση και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των στελεχών.

Εάν δεν παρατηρηθεί ανάπτυξη αποικιών ή αν αναπτυχθούν λίγες αποικίες η καλλιέργεια θεωρείται στείρα. Η καλλιέργεια είναι μία τεχνική που εφαρμόζεται για την

ανίχνευση και ταυτοποίηση πολλών παθογόνων μικροοργανισμών, όπως είναι ο σταφυλόκοκκος, ο στρεπτόκοκκος ή το *E. coli*.

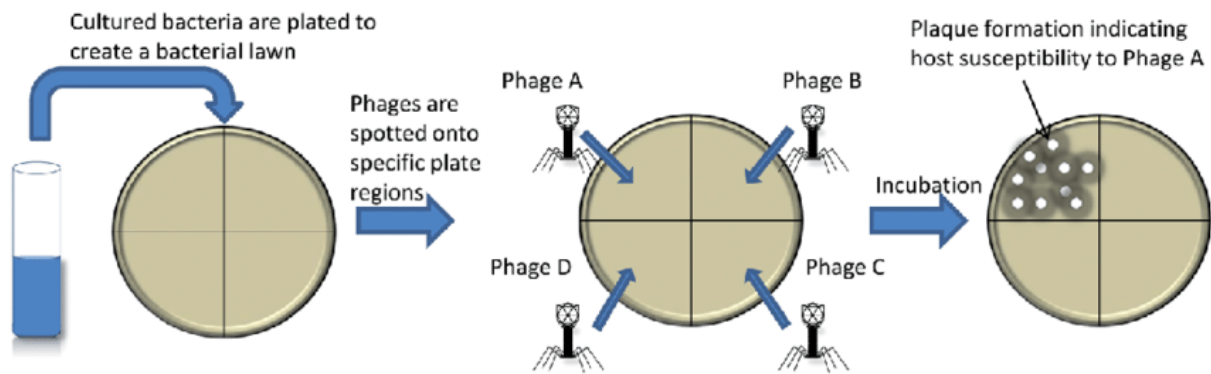
Το κυριότερο μειονέκτημα την καλλιέργειας είναι ότι είναι μία διαδικασία που απαιτεί χρόνο, εξειδίκευση και προσοχή (Wang et al., 2021)

3.3 Φαινοτυπικές μέθοδοι

3.3.1 Ταυτοποίηση με βακτηριοφάγους

Η τεχνική ταυτοποίησης ή προσδιορισμού με βακτηριοφάγους (bacteriophage typing) στηρίζεται στην ευαισθησία που παρουσιάζουν τα βακτηριακά κύτταρα σε έναν ή περισσότερους βακτηριοφάγους. Οι βακτηριοφάγοι ή απλά φάγοι είναι ιοί, οι οποίοι δεσμεύονται στην επιφάνεια του ξενιστή – βακτηριακού κυττάρου και εγχέουν το γονιδίωμα τους στο κυτταρόπλασμα. Πρόκειται για μία μέθοδο με την οποία επιτυγχάνεται η διάκριση μεταξύ βακτηρίων ή βακτηριακών στελεχών, καθώς παρατηρείται υψηλή εξειδίκευση μεταξύ φάγου και βακτηριακών κυττάρων, δηλαδή συγκεκριμένοι βακτηριοφάγοι προσβάλλουν συγκεκριμένα βακτήρια. Συγκριτικά με τις μεθόδους ανίχνευσης με καλλιέργεια ή μοριακή ανίχνευση, η ταυτοποίηση με βακτηριοφάγους είναι ακριβής και αξιόπιστη τεχνική, με χαμηλό κόστος (Wang et al., 2021).

Η πορεία της ταυτοποίησης με βακτηριοφάγους περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα 3. Τα βακτήρια που έχουν απομονωθεί και καλλιεργηθεί τοποθετούνται σε κατάλληλο υπόστρωμα. Το υπόστρωμα διακρίνεται σε περιοχές στις οποίες τοποθετούνται διαφορετικοί φάγοι. Ο σχηματισμός πλάκας σε συγκεκριμένες περιοχές υποδεικνύει σε ποιο φάγο το βακτήριο παρουσιάζει ευαισθησία.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση ανίχνευσης και ταυτοποίησης παθογόνων βακτηρίων με τη βοήθεια βακτηριοφάγων

Πηγή: Van Der Merwe et al., 2014

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τους Ahmed et al., (1987). Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά 16 βακτηριοφάγοι οι οποίοι διέκριναν 14 τύπους *E.coli* σε 97 απομονώσεις *E.coli* από δείγματα ανθρώπινων κοπράνων από ασθενείς με αιμορραγική κολίτιδα ή αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και από μολυσμένο κρέας (Ahmed et al., 1987)

Μία δεκαετία αργότερα, οι Krause et al. (1996) εφάρμοσαν τη συγκεκριμένη τεχνική σε 124 ταυτοποιημένες απομονώσεις *E.coli* με ορότυπο O157:H7. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν δεν θεωρήθηκαν ικανοποιητικά (Krause et al., 1996).

Τα τελευταία χρόνια, η ταυτοποίηση με βακτηριοφάγους συνδυάστηκε με άλλες σύγχρονες τεχνικές όπως φθορισμός, ανοσολογικές μέθοδοι, νανοτεχνολογία και τεχνολογία βιοαισθητήρων. Οι συνδυαστικές τεχνολογίες εφαρμόστηκαν με επιτυχία για την ταχεία ανίχνευση *E.coli* σε τρόφιμα (Wang et al., 2021).

Επίσης δημιουργήθηκαν γενετικά τροποποιημένοι φάγοι οι οποίοι περιλαμβάνουν γονίδια που οδηγούν σε φαινοτυπικά ανιχνεύσιμα χαρακτηριστικά και τα οποία μεταφέρονται στον ξενιστή- βακτήριο. Για παράδειγμα, έχουν δημιουργηθεί συστήματα γονιδίων που προκαλούν φωταύγεια (Zhang et al., 2016; Kim et al., 2017), φθορισμό (Oda et al., 2004; Vinay et al., 2018) ή είναι χρωμογόνα (Choi et al., 2022; Hong et al., 2023).

3.3.2. Πολυτοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση

Η πολυτοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση (Multilocus enzyme electrophoresis – MLEE) είναι μία τεχνική που σκοπό έχει τον υπολογισμό της γενετικής ετερογένειας

των διαφορετικών βακτηριακών ειδών αλλά και στελεχών. Ανιχνεύει αλληλουχικές διακυμάνσεις, έως και σε 25 γονίδια ταυτόχρονα, με κριτήριο την διαφορετική κινητικότητα που παρουσιάζουν τα γονιδιακά προϊόντα τους (Feil & Enright, 2004). Εντοπίζει δηλαδή του πολυμορφισμούς που συντελούνται στο γονιδίωμα των παθογόνων μικροοργανισμών. Με την πάροδο του χρόνου τα γονίδια των παθογόνων συσσωρεύουν ορισμένες μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα ένζυμα που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά. Τα μεταλλαγμένα ένζυμα κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γέλης, διακρίνονται λόγω διαφορετικής κινητικότητας από το αρχικό ένζυμο. Μέσω αυτής της διαδικασίας μπορούν να διακριθούν διαφορετικοί ορότυποι των παθογόνων (High et al., 2015).

Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε από τον Milkman το 1973. Εφαρμόστηκε σε 829 κλώνους *E.coli*, τα οποία απομονώθηκαν από 156 δείγματα προερχόμενα από διαφορετικές φυσικές πηγές (Milkman, 1973). Αργότερα η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε και σε άλλα παθογόνα, όπως η *Listeria monocytogenes* (Graves et al., 1994) και *Bordetella bronchiseptica* (Van der Zee et al., 1997).

Η MLEE χρησιμοποιήθηκε για την διάκριση των διαφορετικών στελεχών του *Escherichia coli* στη μελέτη των Selander et al. (1986). Μελετήθηκε η γενετική απόσταση μεταξύ ζευγών απομονώσεων συναρτήσει της αναλογίας των τόπων που δεν είναι όμοια, δηλαδή παρουσιάζουν αναντιστοιχία (Selander et al., 2016). Πρόκειται για μία διαδικασία που αν και αποτελεσματική, δεν γνώρισε μεγάλη απήχηση στη διάκριση κλώνων των τροφιμογενών παθογόνων (Feil & Enright, 2004).

3.3.3 MALDI- TOF

Η μέθοδος MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization of flight mass spectrometry) τις τελευταίες δεκαετίες χρησιμοποιείται όλο και συχνότερα για την ταχεία αναγνώριση κυρίως του γένους ή του είδους βακτηρίων (Chui et al., 2015).

Οι Chui et al. (2015) μελέτησαν την εξειδίκευση και την ευαισθησία μία ταχείας μεθόδου ταυτοποίησης του αντιγόνου Η (μαστιγιακό αντιγόνο) του *Escherichia coli* με τη βοήθεια μίας πλατφόρμας MALDI-TOF MS. Σκοπός της μεθόδου ήταν η αναγνώριση των οροτύπων του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Μαστίγια των βακτηριακών κυττάρων παγιδεύτηκαν σε μια μεμβράνη φίλτρου και πραγματοποιήθηκε πέψη θρυψίνης εντός του φίλτρου. Τα προϊόντα της πέψης με θρυψίνη κάθε μαστίγιου συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν. Για την πειραματική πορεία

χρησιμοποιήθηκαν 61 στελέχη αναφοράς με 53 τύπους αντιγόνων H. Επίσης, εφάρμοσαν τη μέθοδο MALDI-TOS MS και 85 απομονωμένα κλινικά στελέχη και με τη βοήθεια των δειγμάτων αναφοράς ταυτοποιήθηκαν με επιτυχία 88,2% των οροτύπων. Το υψηλό ποσοστό επιτυχίας δείχνει ότι η συγκεκριμένη πλατφόρμα MALDI -TOS μπορεί να αποτελέσει μία ταχεία, οικονομική και αποδοτική τεχνική αναγνώρισης των οροτύπων του *E. coli* (Chui et al., 2015).

Οι Mclean et al. (2018) επικεντρώθηκαν στην διάκριση του ορότυπου *E.coli* O157:H7 από άλλα στελέχη που παράγουν τοξίνη Shiga ή ανήκουν στην οροομάδα O157. Ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο όπου η τεχνική MALDI- MS συνδυάστηκε με μία βάση δεδομένων αναφοράς κατάλληλα προσαρμοσμένη ώστε να αναγνωρίζει τους βιοδείκτες που καθορίζουν τον συγκεκριμένο ορότυπο. Μεταξύ των ορότυπων O157, η διάκριση του ορότυπου O157:H7 πραγματοποιείται με ζύμωση σορβιτόλης. Η συγκεκριμένη διαδικασία φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την προστασία της δημόσιας υγείας σε περιόδους εξάρσεων, καθώς επιτυγχάνεται άμεση αναφορά και διάγνωση (Mclean et al., 2018).

Με την διάκριση μεταξύ ορότυπων *E.coli* που παράγουν τοξίνη Shiga (STEC) και αυτών που δεν παράγουν ασχολήθηκε και η μελέτη των Kubo et al., (2021). Από 66.000 δείγματα κοπράνων κατά τη χρονική περίοδο 2009-2014 απομονώθηκαν συνολικά 234 στελέχη *E.coli*. Επιλέχθηκαν τυχαία 83 στελέχη (35 στελέχη που παράγουν τοξίνη Shiga και 48 στελέχη που δεν παράγουν τοξίνη Shiga) για να παραχθούν μοντέλα ανίχνευσης STEC με τη βοήθεια τριών αλγορίθμων. 151 στελέχη λειτούργησαν ως δείγματα επικύρωσης των αλγορίθμων ώστε να υπολογιστεί η απόδοση ανίχνευσης των STEC. Η τεχνική MALDI Biotyper φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει μία χρήσιμη και ταχεία διαγνωστική μέθοδο για τη μόλυνση από STEC, καθώς ένας από τους επιλεγμένους αλγόριθμους (Quick Classifier) παρουσίασε υψηλή ευαισθησία (84,1%) και εξειδίκευση (94,4%) (Kubo et al., 2021).

Οι Manfredi et al. (2023) αξιολόγησαν την ικανότητα της τεχνικής MALDI-TOS να αναγνωρίσει και να διαφοροποιήσει το στέλεχος O157: H7 από άλλους παθογόνους ορότυπους *E.coli*. Χρησιμοποίησαν 60 κλινικές απομονώσεις για τον εντοπισμό των διαφορών μεταξύ των πεπτιδικών αποτυπωμάτων του STEC O157:H7 και άλλων στελεχών *E. coli*. Σε ένα σύνολο από 142 δειγμάτων, τα 141 δείγματα ταξινομήθηκαν σωστά (99,3%) (Manfredi et al., 2023).

3.4 Μοριακές μέθοδοι

3.4.1 Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Length Polymorphism- RFLP)

Η τεχνική πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Length Polymorphism –RFLP) είναι μία μοριακή μέθοδος βασίζεται στον μοριακό πολυμορφισμό των γονιδίων της πρωτεΐνης *fliC* (φλαγγελίνη), η οποία είναι η κύρια πρωτεΐνη των μαστιγίων (Η-αντιγόνο). Σύμφωνα με μελέτη των Prager et al., (2003), πρόκειται για ένα ξεκάθαρο τρόπο ταξινόμησης, ο οποίος μπορεί να αναπαραχθεί και να χρησιμοποιηθεί εύκολα, Πρόκειται για μία μέθοδο που παρουσιάζει πολύ καλή συσχέτιση με τον ορότυπο των αντιγόνων Η (Prager et al., 2003).

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Moreno et al., (2006). Ο συνήθης τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται ο προσδιορισμός του ορότυπου του *E.coli*, βασίζεται στον προσδιορισμό των Ο- και Η- αντιγόνων Σε μελέτη που πραγματοποίησαν σύγκριναν την αποτελεσματικότητα, την ακρίβεια και την ευκολία της συνήθης μεθόδου με μία νέα τεχνική RFLP-PCR, η οποία βασίζεται στον προσδιορισμό του αντιγόνου Η. Η τεχνική RFLP- PCR αποδείχθηκε ταχύτερη, καθώς ολοκληρώθηκε σε χρόνο μικρότερο από το 1/3 του χρόνου που απαιτήθηκε για την κλασική οροτυποποίηση. Αποδείχθηκε μέθοδο ακριβείας, καθώς για κάθε ένα μαστιγιακό αντιγόνο βρέθηκε ένα μόνο αλληλόμορφο του γονιδίου *fliC* από στελέχη ETEC, με εξαίρεση τον ορότυπο H21. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η RFLP-PCR θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά και για των χαρακτηρισμών και άλλων στελεχών, εκτός των ETEC (Moreno et al., 2006).

Οι Kottowski et al. (2020) εφάρμοσαν τη μέθοδο RFLP -PCR σε στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν από συμπτωματικούς με κυστίτιδα ασθενείς και εφάρμοσαν τη μέθοδο RFLP-PCR με σκοπό να προσδιορίσουν τον γονότυπό τους. Χρησιμοποίησαν 53 (ήδη γνωστές από προηγούμενες έρευνες) αλληλουχίες αναφοράς των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αντιγόνα Η, το *fliC* και τα ομόλογά τους ώστε να δημιουργήσουν τους κατάλληλους εκκινητές για τη μέθοδο RFLP -PCR. Για την ενίσχυση του γονιδίου *fliC* οι αλληλουχίες εκκινητών PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: FLIC1: 5'-GGT-CAG-GCG-ATT-GCT-AAC-CG-3' και FLIC2: 5'-TTG-GAC-ACT-TCG-GTC- GCA-TAG-TC-3'. Με την RFLP-PCR προσδιορίστηκαν με επιτυχία 29 διαφορετικοί γονότυποι στο σύνολο των δειγμάτων (Kottowski et al., 2020).

Η μέθοδος RFLP-PCR που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει ή και να αντικαταστήσει την κλασική διαδικασία οροτυποποίησης των στελεχών του *E.coli*.

3.4.2 Πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας

Ο πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας (Multilocus sequence typing-MLST) είναι μία μοριακή μέθοδος η οποία εστιάζει στις διαφορές στις αλληλουχίες DNA και έχει χρησιμοποιηθεί για την οροτυποποίηση των βακτηριακών κυττάρων *E.coli*. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη διαδικασία διακρίνονται τα διαφορετικά στελέχη χρησιμοποιώντας τα μοτίβα των αλληλόμορφων γονιδίων που λαμβάνονται. Είναι μέθοδος που χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι αναγνωρίζει τις διαφορές σε αλληλουχίες γονιδίων σε πολλές περιοχές. Ελέγχονται 5-7 γονιδιακές περιοχές και για κάθε διαφορά εκχωρούνται διαφορετικοί αριθμοί αλληλόμορφων. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι επίπονη και δαπανηρά, οπότε είναι οικονομικά δύσκολο να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο πολλαπλών δειγμάτων, κάτι που στη βιομηχανία τροφίμων είναι απαραίτητο (Nakamura et al., 2021)

Πρόκειται για μία μέθοδος, όμως με πολλές εφαρμογές σε κλινικές μελέτες σε δείγματα κοπράνων ή ούρων. Οι Matsui et al. (2020) πραγματοποίησαν έρευνα σε απομονώσεις *E. coli* τις οποίες έλαβαν από δείγματα κοπράνων υγιών εθελοντών και δείγματα ούρων ασθενών με ουρολοίμωξη που ελήφθησαν από ένα πανεπιστημιακό κέντρο υγείας. Σκοπός τους ήταν να εξετάσουν αν τα στελέχη *E. coli* που προκαλούν ουρολοίμωξη αποτελούσαν μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας. Ο προσδιορισμός των διαφορετικών γονότυπων των απομονώσεων ούρων και κοπράνων έγινε με τη μέθοδο MLST. Τα αποτελέσματα της έρευνας συγκλίνουν στην άποψη ότι τα ουροπαθογόνα *E.coli* δεν αποτελούν μέρος της χλωρίδας του ανθρώπινου εντέρου, αλλά πιθανότατα να το αποικίζουν παροδικά (Matsui et al., 2020).

Για να μειωθεί το κόστος και ο απαιτούμενος χρόνος για την εφαρμογή της MLST, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία βελτιωμένη εκδοχή της μεθόδου, η cgMLST, δηλαδή η MLST του πυρήνα του γονιδιώματος. Είναι μία ανάλυση που χρησιμοποιείται κυρίως για επιδημιολογικές μελέτες, αλλά φαίνεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ακόμη και για τη διαχείριση της υγιεινής σε μονάδες παραγωγής τροφίμων. Οι Nakamura et al., (2021) εφάρμοσαν τη μέθοδο cgMLST σε μία μονάδα παραγωγής τροφίμων όπου ανιχνεύτηκαν επιβλαβή βακτήρια *Escherichia coli* στο

τελικό προϊόν. Θέλοντας να εντοπίσουν την πηγή μόλυνσης ώστε να αποφύγουν στο μέλλον παρόμοια επεισόδια, συνέλεξαν δείγματα από το χώρο (δάπεδο (26 στελέχη), αποστραγγιστική τάφρο (5 στελέχη), δοχείο (4 στελέχη), γραμμή παραγωγής μετά τη θέρμανση (1 στέλεχος)) από το ενδιάμεσο (1 στέλεχος) και το τελικό προϊόν (3 στελέχη). Συνολικά συγκεντρώθηκαν 40 απομονώσεις και ταξινομήθηκαν με τη μέθοδο cgMLST σε 17 γονοομάδες. Τα τέσσερα στελέχη που εντοπίστηκαν στο ενδιάμεσο και στο τελικό προϊόν ταξινομήθηκαν σε 2 γονοομάδες. Καθώς, ορισμένα από τα στελέχη του περιβάλλοντος ταξινομήθηκαν επίσης σε αυτές τις γονοομάδες, εντοπίστηκε η πηγή μόλυνσης (Nakamura et al., 2021).

Η μέθοδος cgMLST εφαρμόστηκε και σε έρευνα για την εξάπλωση του παθογόνου *Escherichia coli* των πτηνών, το οποίο προκαλεί κυτταρίτιδα στο κρέας και οικονομικές απώλειες για τους πτηνοτρόφους. Συλλέχθηκαν δείγματα από 101 σφάγια, τα οποία θανατώθηκαν λόγω δερματίτιδας/κυτταρίτιδας και τα οποία ανήκαν σε 6 σμήνη από 5 εμπορικά αγροκτήματα. Από τα δείγματα αυτά, λήφθηκαν 46 απομονώσεις και με τη βοήθεια της ανάλυσης cgMLST μελετήθηκαν ως προς τη γενετική ομοιότητα που παρουσιάζουν. Παρατηρήθηκε ομοιότητα μεταξύ των απομονώσεων των πτηνών από το ίδιο κοπάδι και μεταξύ των κοπαδιών. Το 20% των απομονώσεων *Escherichia coli* προήλθε από υποδόρια δείγματα, ενώ σε 20 κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, το *E. coli* απομονώθηκε από όργανα σε καθαρή καλλιέργεια ή αναμίχθηκε με αραιή ανάπτυξη άλλων βακτηρίων. Σε οκτώ από αυτά, υπήρξαν μεταθανάτια ευρήματα που υποδηλώνουν συστηματική βακτηριακή εξάπλωση. Η πλειονότητα των απομονώσεων από το ίδιο πτηνό και κοπάδι ανήκε στον ίδιο ορότυπο και τύπο αλληλουχίας και ήταν γενετικά δυσδιάκριτα, αλλά μεταξύ των σμηνών οι απομονώσεις παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές (Jonare et al., 2023).

3.5 Οπτικοί Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση των παθογόνων στελεχών *E.coli* σε δείγματα τροφίμων, ιατρικά ή περιβαλλοντικά δείγματα. Η χρήση βιοαισθητήρων αποτελεί μία οικονομική, αξιόπιστη, ταχεία και ευαίσθητη διαδικασία (Pebdeni et al., 2022).

Οι βιοαισθητήρες συνδυάστηκαν με άλλες νέες τεχνολογίες για την ανίχνευση *E.coli* ώστε να ενισχυθούν τα χαρακτηριστικά τους. Έτσι, για παράδειγμα, βελτιστοποιήθηκαν με σύζευξη με νανοτεχνολογία και νανοϋλικά που έχουν

συγκεκριμένες οπτικές ιδιότητες, όπως είναι ο φθορισμός, η χρωματομετρία, η φασματοσκοπία Raman ενισχυμένης επιφάνειας, ο συντονισμός επιφανειακού πλάσμονιου, ο εντοπισμένος επιφανειακός συντονισμός πλάσμονιου και η χημειοφωταύγεια (Pebdeni et al., 2022).

Η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην κατασκευή βιοαισθητήρων επιτρέπει την σύλληψη ακόμη και μικροσκοπικών κυττάρων. Οι οπτικοί βιοαισθητήρες μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριους τύπους:

- Ο πρώτος τύπος χρησιμοποιεί οποιαδήποτε πιθανή αλλαγή στις εσωτερικές οπτικές ιδιότητες ενός βιομορίου λόγω της αλληλεπίδρασής του με τον αναλυτή-στόχο. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να συμβούν στην απορρόφηση, την εκπομπή, την πόλωση ή τη μείωση της φωταύγειας.
- Ο δεύτερος τύπος χρησιμοποιεί δείκτες και οπτικούς ανιχνευτές. Σε αυτά τα συστήματα ανίχνευσης που διαμεσολαβούνται από αντιδραστήρια, η αλλαγή στην οπτική απόκριση ενός ενδιάμεσου, συνήθως ενός έγχρωμου μορίου, ευαίσθητου στον αναλυτή, χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της συγκέντρωσης του αναλυτή.

Συμπεράσματα

Η ανίχνευση των διαφορετικών οροτύπων του *E. coli* είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς φαίνεται ότι οι ορότυποι συνδέονται με την παθογένεια του βακτηρίου, δηλαδή με την ικανότητά του να προκαλεί ασθένειες. Διαφορετικοί ορότυποι προκαλούν διαφορετικές ασθένειες, με διαφορετική συμπτωματολογία και απαιτούν και διαφορετική προσέγγιση.

Νέες, καινοτόμες μεθόδους έχουν εισαχθεί για τη διάκριση και την ταυτοποίηση των οροτύπων. Παραδοσιακά για την ανίχνευση του *E.coli* σε ένα κλινικό δείγμα ή σε ένα δείγμα τροφίμου χρησιμοποιείται η καλλιέργεια σε κατάλληλο υπόστρωμα υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Είναι μία ακριβής και ευαίσθητη διαδικασία, καθώς μπορεί να ανιχνεύει ακόμη και την παρουσία ενός και μόνο βακτηριακού κυττάρου που βρίσκεται σε ένα δείγμα. Το κυριότερο μειονέκτημα της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι ο μεγάλος χρόνος αναμονής που απαιτείται.

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι επιστήμονες καταβάλουν προσπάθειες να ελαχιστοποιήσουν τον απαιτούμενο χρόνο ανάλυσης, αλλά και να διατηρήσουν υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Έτσι, κατά καιρούς έχουν εφαρμοστεί νέες τεχνικές για τον προσδιορισμό των ορότυπων του *E.coli*, οι οποίες βασίζονται στο φαινοτυπικές, μοριακές ή ανοσιολογικές ιδιότητες του βακτηρίου. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές πειραματικές μελέτες σε εργαστηριακό ή και σε βιομηχανικό ακόμη επίπεδο με καινοτόμες και σύγχρονες διαδικασίες, όπως η ταυτοποίηση με βακτηριοφάγους, MALDI – TOF MS, ο πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας (MLST), το πολλαπλό PCR ή η υψηλής απόδοσης PCR σε πραγματικό χρόνο. Ιδιαίτερα αποτελεσματική, ακριβής και ταχεία φαίνεται ότι είναι η χρήση βιοαισθητήρων.

Μελλοντικά, θα ήταν χρήσιμο οι μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί να ομαδοποιηθούν και μέσα από βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις και μεταanalύσεις να διακριθούν οι αποτελεσματικότερες. Η έρευνα για νέες μεθόδους, ταχείες και υψηλής ευαισθησίας δεν θα πρέπει να σταματήσει. Τα παθογόνα στελέχη του *Escherichia coli* μπορούν να απειλήσουν την ανθρώπινη υγεία και παράλληλα σε μία βιομηχανία τροφίμων η παρουσία τους αποτελεί σημάδι ελλιπούς υγιεινής, προκαλεί καθυστερήσεις και απώλειες στην παραγωγή και κατά συνέπεια οικονομική ζημία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Ahmed, R., Bopp, C., Borczyk, A., Kasatiya, S.** (1987). Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157: H7. *The Journal of Infectious Diseases*, 155(4): 806-809. <https://www.jstor.org/stable/30105855>
2. **Akindolire, M.A. & Ateba, C.N.** (2018). Use of pulsed field gel electrophoresis genetic typing for tracing contamination with virulent *Escherichia coli* O157:H7 in beef-cattle producing farms. *Gene Reports*, 13: 59-65. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2452014418301110>
3. **Allami, M., Bahreini, M., Sharifmoghadam, M.R.** (2022). Antibiotic resistance, phylogenetic typing, and virulence genes profile analysis of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients in southern Iraq. *Microbial Genetics*, 64: 401-412. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13353-022-00683-2>
4. **Anjum, F., Maherchandani, S., Gahlot, K., Purva, M.** (2023). Clonal diversity and zoonotic potential of MDR *Escherichia coli* isolated from poultry at different age intervals. *British Poultry Science*, 64 (5): 650-657. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00071668.2023.2236038>
5. **Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Kock, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H.** (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with a outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11 (9): 671-676. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1473309911701657>
6. **Blankenshop, H.M., Dietrich, S.E., Burgess, E., Wholehan, J., Soehnlén, M., Manning, S.D.** (2023). Whole-genome sequencing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* for characterization and outbreak investigation. *Microorganisms*, 11 (5): 1298. <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/5/1298>
7. **Bonyadian, M., Haidari, F.I., Sami, M.** (2024). Virulence genes and pulsed-field electrophoresis profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from different food samples and patients with acute diarrhea. *Iranian Journal of Microbiology*, 16 (3): 329-336. <https://ijm.tums.ac.ir/index.php/ijm/article/view/4489>
8. **Camelena, F., Smail, Y., Courroux, C., Mariani-Kurkdjian, P., Le Hello, S., Bonacorsi, S., Bidet, P.** (2019). Rapid and simple universal *Escherichia coli* genotyping method based on multiple-locus variable-number tandem-repeat

analysis using single-tube multiplex PCR and standard gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 85 (6): e02812-18.
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.02812-18>

9. **Carson, C.A., Shear, B.L., Eilersieck, M.R., Asfaw, A.** (2001). Identification of Fecal *Escherichia coli* from Humans and Animals by Ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (4): 1503-1507.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92761/>

10. **Carter, J.M., Lin, A., Clotilde, L., Lesho, M.** (2016). Rapid multiplexed characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates using suspension array technology. *Frontiers in Microbiology*, 7: 439.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4873620/>

11. **Chaudhuri, R.R. & Henderson, I.R.** (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, 12 (2): 214-226.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134812000068>

12. **Choi, I., Lee, J.-S., Han, J.** (2022). Application of bacteriophage to develop indicator for *Escherichia coli* detection and modulation of its biochemical reaction to improve detection ability: A proof-of-concept study. *Food Control*, 139: 109082. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713522002754>

13. **Chui, H., Chan, M., Hernandez, D., Chong, P., Mc Corrister, S., Robinson, A., Walker, M., Peterson, L.A.M., Ratnam, S., Haldane, D.J.M., Bekal, S., Wylie, J., Chui, L., Westmacott, G., Xu, B., Drebot, M., Nadon, C., Knox, J.D., Wang, G., Cheng, K.** (2015). Rapid, sensitive, and specific *Escherichia coli* H antigen typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-based peptide mass fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (8): 2480-2485.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4508425/>

14. **Cobo- Simón, M., Hart, R., Ochman, H.** (2023). *Escherichia coli*: What is and which are? *Molecular Biology and Evolution*, 40 (1): msac273.
<https://doi.org/10.1093%2Fmolbev%2Fmsac273>

15. **Cookson, A.L., Marshall, J.C., Biggs, P.J., Rogers, L.E., Collis, R.M., Devane, M., Stott, R., Wilkinson, D.A., Kamke, J., Brightwell, G.** (2022). Whole-genome sequencing and virulome analysis of *Escherichia coli* isolated from New Zealand environments of contrasting observed land use. *Applied and Environmental Microbiology*, 88 (9): e00277-22.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9088250/>

16. **Delannoy, S., Hoffer, C., Tran, M.-L., Madec, J-Y., Brisabois, A., Fach, P., Haenni, M.** (2023). High throughput qPCR analyses suggest that Enterobacterales of French sheep and cow cheese rarely carry genes conferring resistances to critically important antibiotics for human medicine. *International Journal of Food Microbiology*, 403: 110303. https://anses.hal.science/anses-04143864/file/Delannoy_qPCRcheese_IJFM2023.pdf
17. **Dong, H.-J., Lee, S., Kim, W., An, J.-U., Kim, J., Kim, D., Cho, S.** (2017). Prevalence, virulence potential, and pulsed-field gel electrophoresis profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from cattle. *Gut Pathogens*, 9: 22. <https://link.springer.com/article/10.1186/s13099-017-0169-x>
18. **Duguid, J.P., Smith, I.W., Dempster, G., Edmuds, N.** (1955). Non-flagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 70 (2): 335-348. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1700700210>
19. **Edgar, R.C.** (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*, 34 (14): 2371-2375. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty113>
20. **ΕΟΔΥ** (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας). (2021α). Εντεροαιμορραγικό Κολοβακτηρίδιο (EHEC, STEC, VTEC). Γενικές πληροφορίες. Διατίθεται στο διαδίκτυο. Τελευταία πρόσβαση (17/07/2024): <https://eody.gov.gr/disease/kolovaktiridio-enteroaimorragiko-ehcstecvtec/>
21. **ΕΟΔΥ** (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας). (2021β). Επιδημιολογικά δεδομένα της λοίμωξης από εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο (EHEC) στην Ελλάδα 2004-2020. Σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων. *Τμήμα Τροφιμογενών και Υδατογενών Νοσημάτων*. Διατίθεται στο διαδίκτυο. Τελευταία πρόσβαση (17/07/2024): <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2021/09/ehc-2004-2020-gr.pdf>
22. **ΕΟΔΥ** (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας). (2024). Εντεροαιμορραγικό Κολοβακτηρίδιο (EHEC, STEC, VTEC). Διατίθεται στο διαδίκτυο. Τελευταία πρόσβαση (17/07/2024): <https://eody.gov.gr/disease/kolovaktiridio-enteroaimorragiko-ehcstecvtec/>
23. **Fang, Y., Tran, F., Stanford, K., Yang, X.** (2023). Stress resistance and virulence gene profiles associated with phylogeny and phenotypes of *Escherichia coli*

from Cattle. *Journal of Food Protection*, 86 (9): 100122.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X23068060>

24. **Farahani, O., Ranjbar, R., Honarmand Jahromy, S., Arabzadeh, B.** (2020). Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat analysis for geno-typing of *Escherichia coli* strains isolated from hospital wastewater, Tehran, Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 49 (12): PMC8215070.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8215070/>

25. **Feil, E., Enright, M.** (2004). Analyses of clonality an the evolution of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 7 (3): 308-313.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527404000396>

26. **Foddai, A.C.G. & Grant, I.R.** (2020). Methods for detection of viable foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104 (10): 4281-4288:
<https://doi.org/10.1007%2Fs00253-020-10542-x>

27. **Fratamico, P.M., DebRoy, C., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M., Feng, P.** (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7: 644:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4853403/>

28. **Graves, L.M., Swaminathan, B., Reeves, M.W., Hunter, S.B., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Schuchat, A.** (1994). Comparison of ribotyping and multilocus enzymes electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (12): 2936-2943.
<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jcm.32.12.2936-2943.1994>

29. **Gwida, M., Awad, A., El-Ashker, M., Hotzel, H., Monecke, S., Ehricht, R., Muller, E., Reibig, A., Barth, S.A., Berens, C., Braun, S.D.** (2020). Microarray-based detection of resistance and virulence factors in commensal *Escherichia coli* from livestock and farmers in Egypt. *Veterinary Microbiology*, 240: 108539.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378113519307515>

30. **Hacker, J. & Blum-Oehler.** (2007). In appreciation of Theodor Escherich. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 902:
<https://www.nature.com/articles/nrmicro1810>

31. **Hahm, B.-K., Maldonado, Y., Schreiber, E., Bhunia, A.K., Nakatsu, C.H.** (2003). Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. *Journal of Microbiological*

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701202002592>

32. High, N.J., Fan, F., Schwartzman, J.D. (2015). Chapter 97 – *Haemophilus influenzae*. In the book: Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I. Schwartzman, J. (eds). *Molecular Medical Microbiology*, vol.3: 1709-1728.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123971692000974>

33. Hong, B., Li, Y., Wang, W., Ma, Y., Wang, J. (2023). Separation and colorimetric detection of *Escherichia coli* by phage tail fiber protein combined with nano-magnetic beads. *Microchimica Acta*, 190: 202.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-023-05784-1>

34. Huang, Y., Su, Z., Li, W., Ren, J. (2022). Recent Progresses on Biosensors for *Escherichia coli* Detection. *Food Analytical Methods*, 15: 338-366.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-021-02129-7>

35. Jin, H.-Y., Tao, K.-H., Li, Y.-X., Li, F.-Q., Li, S.-Q. (2005). Microarray analysis of *Escherichia coli* O157 : H7. *World Journal of Gastroenterology*, 11 (37): 5811-5815.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4479681/>

36. Jonare, L., Ostlund, E., Soderlund, R., Hansson, I., Aspan, A., Jansson, D.S. (2023). Core genome Multilocus sequence typing (cgMLST) confirms systemic spread of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in broilers with cellulitis.

Veterinary Microbiology, 282: 109755.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113523001074>

37. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. EE L 338. Document 02005R2073-20200308. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο. Τελευταία πρόσβαση 17/7/2024:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02005R2073-20200308>

38. Kim, J., Kim, M., Kim, S., Ryu, S. (2017). Sensitive detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 from foods using a luciferase-reporter phage phiV10lux.

International Journal of Food Microbiology, 254: 11-17.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160517301927>

39. Kotlowski, R., Grecka, K., Kot, B., Szweda, P. (2020). New Approaches for *Escherichia coli* Genotyping. *Pathogens*, 9 (2): 73:

<https://www.mdpi.com/2076-0817/9/2/73>

40. Krause, U., Thomson-Carter, F.M., Pennington, T.H. (1996). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (4): 959-961. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc228925/>
41. Kubo, Y., Ueda, O., Nagamitsu, S., Yamanishi, H., Nakamura, A., Komatsou, M. (2021). Novel strategy of rapid typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using MALDI Biotyper and ClinProTools analysis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 27 (8): 1137-1142. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1341321X21000714>
42. Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A.P., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P.R., Knirel, Y.A., Wang, L. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 44 (6): 655-683: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31778182/>
43. Ludwig, J.B., Shi, X., Shridhar, P.B., Roberts, E.L., DeBRoy, C., Phebus, R.K., Bai, J., Nagaraja, T.G. (2020). Multiplex PCR assays for the detection of one hundred and thirty-seven serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated with cattle. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 378. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7403468/>
44. Manfredi, E., Rocca, M.F., Zintgraff, J., Irazu, L., Miliwebsky, E., Carbonari, C., Deza, N., Prieto, M., Chinen, I. (2023). Rapid and accurate detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O157:H7 by mass spectrometry directly from the isolate, using 10 potential biomarker peaks and machine learning predictive models. *Journal of the Medical Microbiology*, 72 (5). <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001675#>
45. Matsui, Y., Hu, Y., Rubin, J., De Assis, R.S., Suh, J., Riley, L.W. (2020). Multilocus sequence typing of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection patients and from fecal samples of healthy subjects in a college community. *MicrobiologyOpen*, 9 (6): e1032. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7294302/>
46. Mclean, K., Palarea-Albaladejo, J., Gurrie, C.G., Imrie, L.H.J., Manson, E.D.T., Fraser-Pitt, D., Wright, F., Alexander, C.J., Pollock, K.G.J., Allison, L., Hanson, M., Smith, D.G.E. (2018). Rapid and robust analytical protocol for *E. coli* STEC bacteria subspecies differentiation using whole cell MALDI mass

spectrometry. *Talanta*, 182: 164-170.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914018300638>

47. **Milkman, R.** (1973). Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science AAAS* 7 (182): 1024-1026.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4584002/>

48. **Miller, J.M.** (2013). Whole-Genome Mapping: a New Paradigm in Strain Typing Technology. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (4): 1066-1070.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3666824/>

49. **Moreno, A.C.R., Guth, B.E.C., Martinez, M.B.** (2006). Can the fliC PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism technique replace classic serotyping methods for characterizing the H antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains? *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (4): 1453-1458.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1448681/>

50. **Mutlaq, S., Albiss, B., Al-Nabulsi, A.A., Jaradat, Z.W., Olaimat, A.N., Khalifeh, M.S., Osaili, T., Ayyash, M.M., Holley, R.A.** (2021). Conductometric Immunosensor for *Escherichia coli* O157:H7 Detection based on Polyaniline/Zinc Oxide (PANI/ZnO) Nanocomposite. *Polymers (Basel)*, 13 (19): 3288. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8512834/>

51. **Nakamura, A., Takahashi, H., Arai, M., Tsuchiya, T., Wada, S., Fujimoto, Y., Shimabara, Y., Kuda, T., Kimura, B.** (2021). Molecular subtyping for source tracking of *Escherichia coli* using core genome Multilocus sequence typing at a food manufacturing plant. *PLoS One*, 16(12): e0261352. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0261352>

52. **Oda, M., Morita, M., Unno, H., Tanji, Y.** (2004). Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by using green fluorescent protein-labeled PP01 bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (1): 527-534. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.70.1.527-534.2004>

53. **Ozgen, E.K., Yanmaz, B., Bagatir, P.S.** (2023). Investigation of virulence factors, phylogenetic grouping, multiple-locus variable number tandem repeat analysis, and antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolated from aborted bovine fetal tissue. *Letters in Applied Microbiology*, 76 (9): ovad 100. <https://academic.oup.com/lambio/article-abstract/76/9/ovad100/7259143>

54. **Pakbin, B., Bruck, W.M., Bruck, T.B., Allahyari, S., Tamai, I.A.** (2023). A quantitative prevalence of *Escherichia coli* O157 in different food samples using real-

time qPCR method. *Food Science & Nutrition*, 11 (1): 228-235.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.3055>

55. Prager, R., Strutz, U., Fruth, A., Tschape, H. (2003). Sybtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus fliC polymorphisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292 (7-8): 477-486.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422104701241>

56. Pebeni, A.B., Roshani, A., Mirsadoughi, E., Behzadifar, S., Hosseini, M. (2022). Recent advances in optical biosensors for specific detection of E.coli bacteria in food and water. *Food Control*, 135: 108822.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713522000159>

57. Punia, M., Maan, S., Batra, K., Kumar, A., Maan, N.S., Gahlawat, S.K. (2024). Development of a multiplexed Luminex assay for simultaneous detection of enteric viruses in cattle. *Veterinary Research Forum*, 15 (1): 13-19.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10921133/>

58. Rathore, P., Basnet, A., Kilonzo-Nthenge, A., Dumenyo, K., Yadegari, Z., Taheri, A. (2024). Rapid detection of pathogenic *E. coli* based on CRISPR Cas system. *Frontiers in Microbiology*, 15:
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1423478/full>

59. Razmi, N., Hasanzadeh, M., Willander, M., Nur, O. (2020). Recent Progress on the Electrochemical Biosensing of *Escherichia coli* O157:H7: Materials and Methods Overview. *Biosensors (Basel)*, 10 (5): 54.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7277213/>

60. Reid, C.J., Blau, K., Jechalke, S., Smalla, K, Djordjevic, S.P. (2020). Whole Genome Sequencing of *Escherichia coli* from store-bought produce. *Frontiers in Microbiology*, 10: 3050.
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.03050/full>

61. Rubab, M. & Oh, D.-H. (2020). Virulence characteristics and antibiotic resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources. *Antibiotics*, 9 (9): 587. <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/9/587>

62. Scheutz, F., Cheasty, T., Woodward, D., Smith, H.R. (2004). Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin – producing *E. coli* (VTEC): O176, O177,

O178, O179, O180 AND O181. *APMIS*. 112 (9): 569-584:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15601305/>

63. Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S. (1986). Methods of Multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (5): 873-884. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc238981/>

64. Shan, S., Li, R., Xia, W., Tong, X., Huang, Y., Tan, Y., Peng, S., Liu, C., Wang, S., Liu, D. (2024). High-resolution melting real-time polymerase chain reaction assays for subtyping of five diarrheagenic *Escherichia coli* by a single well in milk. *Journal of Dairy Science*, 107 (8): 5416-5426. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030224005691>

65. Shin, E.-J., Lee, S.-J., Jeong, H.-J., Lee, J.-H. (2024). Development of a novel serogrouping method for the rapid detection of 21 *Escherichia coli* O-serotypes using multiplex real-time PCR. *Food Control*, 157: 110171. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713523005716>

66. Shrinet, G., Chhabra, R., Sharma, A., Batra, K., Talukdar, S.J., Maan, S. (2023). High throughput Luminex beads based multiplex assay for identification of six major bacterial pathogens of mastitis in dairy animals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13: 1125562. <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2023.1125562/full>

67. Silipo, A., Erbs, G., Shinya, T., Maxwell, D., J.M., Parrilli, M., Lanzetta, R., Shibuya, N., Newman, M.-A., Molinaro. (2009). Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology*, 20 (4): 406-419. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20018942/>

68. Stromberg, Z.R., Baumann, N.W., Lewis, G.L., Severt, N.J., Cernicchiaro, N., Renter, D.G., Marx, D.B., Phebus, R.K., Moxley, R.A. (2015). Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157 on hides and preintervention carcass surfaces on feedlot cattle at harvest. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12 (7): 631-638. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26125496/>

69. Swelum, A.A., Elbestawy, A.R., El-Saadony, M.T., Hussein, E.O.S., Alhotan, R., Suliman, G.M., Taha, A.E., Ba-Awadh, H., El-Tarabily, K.A., El-Hach, M.E.A. (2021). Ways to minimize bacterial infections, with special reference to *Escherichia coli*, to cope for the first-week mortality in chicks: an updated overview.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579121000730>

70. Tong, Y., Jorgensen, T.S., Whitford, C.M., Weber, T., Lee, S.Y. (2021). A versatile genetic engineering toolkit for *E. coli* based on CRISPR-prime editing. *Nature communications*, 12: 5206. <https://www.nature.com/articles/s41467-021-25541-3>

71. Tseng, M., Fratamico, P.M., Bagi, L., Delannoy, S., Fach, P., Manning, S.D., Funk, J.A. (2014). Diverse virulence gene content of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from finishing wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (20): 6395-6402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4178630/>

72. Trongiit, S. & Chuanchuen, R. (2021). Whole genome sequencing and characteristics of *Escherichia coli* with co-existence of ESBL and *mcr* genes from pigs. *PLoS One*, 16 (11): e0260011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8594834/>

73. Van den Broeck, W., Cox, E., Oudega, B., Goddeeris, B.M. (2000). The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Veterinary Microbiology*, 71 (3-4): 223-224 : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10703706/>

74. Van der Merve, R., Van Helden, P., Warren, R.M., Sampson, S, Van Pitius, N.C.G. (2014). Phage-based detection of bacterial pathogens. *The Analyst*, 139 (11): 2617-2626. https://www.researchgate.net/figure/Phage-typing-The-bacterial-sample-to-be-typed-is-plated-together-with-a-series-of_fig4_261034087

75. Van der Zee, A., Mooi F, Van Embden, J., Musser, J. (1997). Molecular Evolution and Host adaptation of *Bordetella spp.*: Phylogenetic Analysis Using Multilocus Enzyme Electrophoresis and Typing with Three Insertion Sequences. *Journal of Bacteriology*, 179 (21):6609-6617. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.179.21.6609-6617.1997>

76. Vinay, M., Franche, N., Gregori, G., Fantino, J.-R., Pouillot, F., Ansaldi, M. (2015). Phage-based fluorescent biosensor prototypes to specifically detect enteric bacteria such *E. coli* and *Salmonella enterica Typhimurium*. *PLoS ONE* 10 (7): e0131466. <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0131466&type=printable>

77. Uda, M.N.A., Dafhalla, A.K.Y., Dhahi, T.S., Adam, T., Gopinath, S.C.B., Ambek, A.B., Uda, M.N.A., Mohammed, M., Parmin, N.A., Ibrahim, N.H., Hashim, U. (2024). Conductometric immunosensor for specific *Escherichia coli* O157:H7 detection on chemically functionalized interdigitated aptasensor. *Heliyon*, 10 (5): e26988. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024030196>
78. Wang, J., Kanach, A., Han, R., Applegate, B. (2021). Application of bacteriophage in rapid detection of *Escherichia coli* in foods. *Current Opinion in Food Science*, 39: 43-50. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799320301715>
79. WHO (World Health Organization). (2024). Estimating the burden of foodborne diseases. Available online (20/7/2024): <https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>
80. Widney, K.A., Yang, D.-D., Rusch, L.M. (2024). CRISPR-Cas9-assisted genome editing in *E. coli* elevates the frequency of unintended mutations. Preprint: 38562785. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10983943/>
81. Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glockner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rossello-Mora, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12 (9): 635-645. [doi: 10.1038/nrmicro3330](https://doi.org/10.1038/nrmicro3330)
82. Zhang, D., Coronel-Aguilera, C.P., Romero, P.L., Perry, L., Minocha, U., Rosenfield, C., Gehring, A.G., Paoli, G.C., Bhunia, A.K., Applegate, B. (2016). The use of a novel Nanoluc-Based reporter phage for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific Reports*, 6: 33235. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5021930/>