



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και τροφιμογενή παθογόνα: Η περίπτωση της *Listeria monocytogenes*

Εισηγήτρια: Κουλουρίδη Ελένη (08042)

Επιβλέπουσα: Ανθιμία Μπατρίνου

ΑΘΗΝΑ 2021

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, 2021

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Ανθιμία Μπατρίνου, Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

2. Μέλος επιτροπής

Βασίλης Σπηλιώτης, Βιολόγος MSc, PhD, Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

3. Μέλος επιτροπής

Φώτης Μάντης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

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

Κουλουρίδη Ελένη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί αποτελούν μεγάλο πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες ακόμα και το θάνατο σε μεγάλα μέρη του πληθυσμού, κυρίως στις ευπαθείς ομάδες. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι ένα φαινόμενο που εξελίσσεται ραγδαία και συμβάλλει στην επικινδυνότητα μιας τροφιμογενούς μόλυνσης. Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστούν οι βασικές ομάδες αντιβιοτικών και μερικοί από τους τρόπους δράσης τους. Επίσης οι τρόποι με τους οποίους οι μικροοργανισμοί αντιστέκονται στα αντιβιοτικά. Θα αναλυθούν κάποια από τα κυριότερα τροφιμογενή παθογόνα, τα χαρακτηριστικά τους, οι πιθανές πηγές επιμόλυνσης από αυτά και πώς συνδέονται με επιδημίες. Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα ψυχρότροφο βακτήριο που προκαλεί τη λιστερίωση, μια σπάνια, αλλά μεγάλης θνησιμότητας ασθένεια. Μπορεί να αναπτυχθεί στα προϊόντα που συντηρούνται υπό ψύξη και στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα. Ο σύγχρονος τρόπος ζωής καθιστά δημοφιλή αυτά τα προϊόντα αυξάνοντας την πιθανότητα επιμόλυνσης με *L.monocytogenes*. Θα αναλυθούν οι πηγές επιμόλυνσης, η παθογένεια του μικροοργανισμού, οι τρόποι ανίχνευσης, αλλά και διάκρισης του από άλλα μη παθογόνα στελέχη και τα γενετικά στοιχεία που συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα του στα αντιβιοτικά. Τέλος, θα γίνει μια αναφορά, για τον τρόπο που προσεγγίζουν το πρόβλημα της χρήσης των αντιβιοτικών, ως αυξητικούς παράγοντες στη βιομηχανία κρέατος, στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις ΗΠΑ.

Λέξεις κλειδιά: Τροφιμογενές, παθογόνα, ανθεκτικότητα, αντιβιοτικά, *Listeria monocytogenes*

ABSTRACT

Foodborne pathogens, account for a big problem for the food industry, which can lead to severe illnesses and even death to a big part of the population. Antibiotic resistance is progressively evolving and makes foodborne illnesses even more dangerous. In this essay, the basic classes of antibiotics and their mechanisms of action will be presented. Also, the mechanisms in which, bacteria resist to antibiotics. Some of the most important foodborne pathogens, will be analysed and also their characteristics, the possible sources of contamination and some outbreaks in which they are involved. *Listeria monocytogenes*, is a psychrotrophic bacterium, that causes listeriosis, a rare but severe illness, with a high mortality rate. Its prevalence is very often in products that require refrigeration, and in Ready To Eat products. The modern way of living makes these products very popular and makes the possibility of contamination with *L.monocytogenes*, very possible. The sources of contamination will be also analyzed, the pathogenesis of the microorganism, some detection methods and the genetic elements that contribute to its antibiotic resistance. In the end of this essay, some comments will be mentioned, of how European Union and United States of America are dealing, with the problem of antibiotic misuse in the meat industry.

Keywords: Foodborne, pathogen, resistance, antibiotic, *Listeria monocytogenes*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	13
Αντιβιοτικά.....	13
1.1 Ιστορικά στοιχεία.....	13
1.1.1 Η εμφάνιση των αντιβιοτικών.....	13
1.1.2 Πρώτη δοκιμή σε άνθρωπο.....	13
1.1.3 Η πρώτη μαζική παραγωγή πενικιλίνης.....	14
1.1.4 Η χρήση τους ως αυξητικοί παράγοντες στη βιομηχανία κρέατος.....	15
1.1.5 Η λανθασμένη χρήση από τους καταναλωτές	16
1.2 Ορισμοί των αντιβιοτικών.....	16
1.2.1 Αντιβιοτικά και αντιμικροβιακά	17
1.2.2 Στενό φάσμα και ευρύ φάσμα.....	17
1.2.3 Βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά.....	17
1.3 Οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών και ο τρόπος δράσης τους.....	18
Ορισμός πεπτιδογλυκάνης.....	18
Ορισμός τρανσπεπτιδάσης.....	18
1.3.1 Οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών.....	18
1.3.1.1 Οι β – λακτάμες.....	19
Πενικιλίνη.....	19
Κεφαλοσπορίνες.....	20
1.3.1.2 Τετρακυκλίνες.....	21
Μηχανισμός δράσης της τετρακυκλίνης.....	22
1.3.1.3 Μακρολίδες	22
1.3.1.4 Αμινογλυκοσίδες.....	23
1.3.1.5 Κινολόνες.....	23
1.3.1.6 Γλυκοπεπίδια.....	23
Μηχανισμός δράσης της βανκομυκίνης.....	23
1.3.1.7 Σουλφοναμίδες.....	24
1.4 Μέθοδοι αντίστασης των μικροοργανισμών κατά των αντιβιοτικών.....	25

	<i>Αντίσταση κατά των αντιβιοτικών της β-λακτάμης</i>	25
	<i>Αντίσταση κατά των τερακυκλινών</i>	25
1.5	Τρόπος μεταφοράς των γονιδίων.....	27
1.5.1	<i>Τα μεταφερόμενα γενετικά στοιχεία</i>	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2		31
	Τροφιομογενή παθογόνα.....	32
2.1	<i>Escherichia coli</i>	32
2.1.1	<i>Κατηγορίες της E. coli</i>	32
2.1.2	<i>Κρούσματα</i>	33
2.1.3	<i>Παθογένεια</i>	33
2.1.4	<i>Πηγές</i>	33
2.1.5	<i>Ανάπτυξη και επιβίωση</i>	34
2.1.6	<i>Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά</i>	34
2.1.7	<i>Εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών της E.coli</i>	35
2.2	<i>Salmonella</i>	36
2.2.1	<i>Χαρακτηριστικά</i>	36
2.2.2	<i>Ανάπτυξη και επιβίωση</i>	37
2.2.3	<i>Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά</i>	37
	<i>Τα είδη S.Typhi και S.Paratyphi</i>	37
2.2.4	<i>Εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών</i>	38
2.2.5	<i>Εξάπλωση της ανθεκτικής Salmonella</i>	38
2.2.6	<i>Μηχανισμός ανθεκτικότητας</i>	39
2.2.7	<i>Παθογένεια</i>	39
2.2.8	<i>Πρόληψη</i>	39
2.3	<i>Campylobacter</i>	40
2.3.1	<i>Χαρακτηριστικά</i>	40
2.3.2	<i>Ευαισθησία</i>	40
2.3.3	<i>Παθογένεια</i>	41
2.3.4	<i>Ανθεκτικότητα</i>	41
2.3.4.1	<i>Ανθεκτικότητα στις φλοουροκινολόνες</i>	41
2.3.4.2	<i>Ανθεκτικότητα στις μακρολίδες</i>	41

2.3.4.3	Ο ρόλος των πρωτεϊνικών αντλιών στην ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά του <i>Campylobacter</i>	43
	Η πρωτεϊνική αντλία <i>CmeABC</i>	43
	Ο ρόλος των πρωτεϊνικών αντλιών στη χοληφόρο των πτηνών.....	43
	Μια μελλοντική πιθανότητα δημιουργίας <i>efflux pump</i> αναστολέων, για τον έλεγχο της καμπυλοβακτηρίωσης.....	44
2.4	<i>Yersinia</i>	45
2.4.1	Τα είδη της <i>Yersinia</i>	45
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	45
	Ταξινόμηση.....	46
2.4.2	Πηγές.....	46
2.4.3	Παθογένεια.....	46
2.4.4	Εναισθησία και αντοχή σε φυσικοχημικούς παράγοντες.....	47
2.4.5	Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά β-λακτάμης.....	47
2.4.6	Εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	49
	<i>Listeria monocytogenes</i>	49
3.1	Χαρακτηριστικά της <i>L.monocytogenes</i>	49
3.1.1	Η υψηλή προσαρμοστικότητα της <i>L. monocytogenes</i>	50
3.1.2	Εναισθησία - Ανθεκτικότητα της <i>Listeria monocytogenes</i> σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες.....	50
3.1.2.1	Επίδραση της θερμοκρασίας.....	50
3.1.2.2	Επίδραση του pH.....	51
3.1.2.3	Επίδραση της ενεργότητας νερού (<i>a_w</i>).....	51
3.1.2.4	Επίδραση της συγκέντρωσης αλάτων.....	51
3.1.2.5	Συνεργιστική δράση φυσικοχημικών παραγόντων.....	51
3.2	Διατροφικές απαιτήσεις της <i>L. monocytogenes</i>	52
3.2.1	Μεταβολισμός υδατανθράκων.....	52
3.2.2	Μεταβολισμός αμινοξέων.....	52
3.2.3	Μεταβολισμός σιδήρου (<i>Fe</i>).....	53
3.3	Πηγές της <i>L.monocytogenes</i>	53

3.3.1	Περιβάλλον.....	53
3.3.2	Ζώα.....	53
3.3.3	Άνθρωποι.....	54
3.3.4	Εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων.....	54
3.4	Η παρουσία της <i>Listeria monocytogenes</i> στα τρόφιμα.....	55
3.4.1	Σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και <i>Listeria monocytogenes</i>	55
3.4.2	Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση.....	55
3.4.3	Το γάλα και τα γαλακτοκομικά.....	55
3.4.3.1	Διάφορες έρευνες για την <i>Listeria monocytogenes</i> , στο γάλα και τα γαλακτοκομικά.....	56
3.4.3.2	Τυριά.....	57
3.4.4	Προϊόντα κρέατος και πουλερικά.....	58
3.4.5	Θαλασσινά.....	58
3.4.6	Αγορανομικός κανονισμός για την <i>Listeria monocytogenes</i>	59
3.5	Ανίχνευση της <i>L.monocytogenes</i>	60
3.5.1	Φαινοτυπικές μέθοδοι ανίχνευσης.....	60
3.5.1.1	Ανοσολογικές μέθοδοι.....	61
3.5.1.2	Βιοχημικές μέθοδοι.....	61
3.5.1.2.1	Μέθοδοι κυτταρικής καλλιέργειας.....	62
3.5.1.2.2	Ανίχνευση εστεράσης.....	63
3.5.1.3	Διάκριση με βάση τον ορότυπο- οροαποτύπωση.....	64
3.5.1.4	Διάκριση με βάση τον τύπο του βακτηριοφάγου.....	64
3.5.2	Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης.....	64
3.5.2.1	Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) στην <i>L.monocytogenes</i>	65
	Γονίδια “στόχοι” της <i>L.monocytogenes</i> στις μοριακές αναλύσεις.....	65
	Μειονεκτήματα της μεθόδου PCR.....	65
3.5.2.2	Ηλεκτροφόρηση ενζύμου πολλαπλής εστίασης MLEE (Multi-locus enzyme electrophoresis).....	65
3.5.2.3	Ηλεκτροφόρηση πήγματος παλλόμενου πεδίου PFGE (Pulse field gel electrophoresis).....	66

3.6	Λιστερίωση.....	66
3.6.1	Χαρακτηριστικά της ασθένειας.....	66
3.6.2	Συμπτώματα της λιστερίωσης.....	67
3.6.3	Παθογένεια.....	67
3.6.4	Αντιβιοτική θεραπεία της λιστερίωσης και η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών.....	68
3.7	<i>L.monocytogenes</i> και ανθεκτικότητα.....	69
3.7.1	Μηχανισμοί ανθεκτικότητας της <i>L.monocytogenes</i>	69
3.7.1.1	Πλασμίδια.....	69
3.7.1.2	Η <i>L.innocua</i> και τα είδη <i>Enterococcus</i> και <i>Streptococcus</i> ως δότες γονιδίων.....	70
3.7.1.3	Η ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και τα υπεύθυνα γονίδια.....	70
3.7.1.4	<i>Efflux pumps</i>	71
	Μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών αντλιών <i>efflux</i> - Η μέθοδος <i>Cartwheel</i>	71
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	73
	Ανθεκτική <i>L.monocytogenes</i> και τεχνολογία τροφίμων.....	73
	Τα πολυανθεκτικά στελέχη οφείλονται στην δράση των <i>efflux pumps</i> ;.....	74
	Παράγοντες που επηρεάζουν την ανθεκτικότητα της <i>L.monocytogenes</i>	75
	Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά σε παγκόσμιο επίπεδο.....	77
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Η απλούστερη β-λακτάμη.....	15
Σχήμα 2: Μηχανισμός σύνθεσης του τοιχώματος πεπτιδογλυκάνης και αντίδραση της πενικιλίνης με την πεπτιδική αλυσίδα της DD-τρανσπεπτιδάσης.....	19
Σχήμα 3: Η πενικιλίνη G (φυσική πενικιλίνη) και ορισμένα παράγωγά της που διαφέρουν μόνο ως προς τη φύση της ομάδας R της αμιδικής ομάδας.....	20
Σχήμα 4: Η χημική δομή της πενικιλίνης και της κεφαλοσπορίνης.....	21
Σχήμα 5: Η σκελετική δομή της τετρακυκλίνης και οι αριθμημένοι δακτύλιοι.....	22
Σχήμα 6: Η λειτουργική ομάδα της σουλφοναμίδης.....	24
Σχήμα 7: Το φαινόμενο drug efflux.....	26
Σχήμα 8: Ένα πλασμίδιο σε 3D απεικόνιση.....	28
Σχήμα 9: Η δομή ενός τρανσποζονίου.....	29
Σχήμα 10: Ο τρόπος μεταφοράς ενός τρανσποζονίου, διαμέσου δύο γονιδιωμάτων (DNA A, DNA B).....	29
Σχήμα 11: Βακτηριακά στελέχη της <i>Salmonella</i>	36
Σχήμα 12: Περίπτωση καμπυλοβακτηρίωσης.....	40
Σχήμα 13: Το βακτήριο της πανούκλας, η <i>Yersinia pestis</i> , σε 3D απεικόνιση, που δείχνει τη δομή του κυττάρου με το χρωμοσωμικό DNA, τα πλασμίδια και τα ριβοσώματα.....	45
Σχήμα 14: Απεικόνιση του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> , το gram-θετικό βακτήριο, που προκαλεί τη λιστερίωση.....	49
Σχήμα 15: Μέθοδος ανίχνευσης αντλιών efflux. Τα φθορίζοντα στοιχεία είναι κύτταρα που διαθέτουν την προς ανίχνευση αντλία efflux.....	71
Σχήμα 16: Αναπαράσταση των διαφόρων ειδών πρωτεϊνικών αντλιών στα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια. Φαίνονται οι πέντε μεγάλες οικογένειες των αντλιών efflux. Απεικονίζονται οι ουσίες που χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και τα αντιβιοτικά τα οποία αποβάλλουν.....	72

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ορίζεται ως η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να αντιστέκεται, (δηλαδή να επιβιώνει ή και να αναπτύσσεται), μιας αντιβιοτικής ουσίας.

(WHO, 2018). Αποτελεί μεγάλη απειλή για την παγκόσμια υγεία και την ασφάλεια των τροφίμων και μπορεί μακροπρόθεσμα να αυξήσει τη θνησιμότητα, το χρόνο παραμονής στα νοσοκομεία και τα έξοδα για την ιατροφαρμακευτική περίθαλψη. Οι μικροοργανισμοί και ιδιαίτερα τα βακτήρια, αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο στα αντιβιοτικά και στα υπόλοιπα αντιμικροβιακά και αυτό εξαρτάται από τον τρόπο που έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα το κάθε ένα εξελικτικά, καθώς και από το γενετικό υλικό που έχει ανταλλάξει με τους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντός του (Olaimat et al.).

Οι τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί, αποτελούν για τη βιομηχανία τροφίμων μια συνεχή πρόκληση. Κυρίως με τη δυνατότητά τους να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν των χειρισμών που υφίστανται τα τρόφιμα κατά την επεξεργασία τους. Η συνεχής έκθεσή τους σε μικρές δόσεις αντιβιοτικών και αντιμικροβιακών που χρησιμοποιούνται σε όλη την αλυσίδα τροφίμων, τους καθιστά με τον καιρό όλο και ανθεκτικότερους.

Η *L.monocytogenes*, είναι ένα από τα σημαντικότερα τροφιμογενή παθογόνα του ανθρώπου, καθώς η λιστερίωση προκαλεί σοβαρές επιπλοκές στην υγεία και είναι δύσκολο να ανιχνευτεί έγκαιρα, η πηγή της επιμόλυνσης. Οι διεθνείς νομοθεσίες που έχουν θεσπιστεί για την ασφάλεια των τροφίμων, απαιτούν ελάχιστη έως και μηδενική παρουσία της *L.monocytogenes* στα τρόφιμα. Η ανθεκτικότητα της *L.monocytogenes*, καθώς και άλλων σημαντικών παθογόνων μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά έχει μία διαρκή αύξουσα πορεία. Στην παρούσα μελέτη θα γίνει μια προσπάθεια διερεύνησης των τρόπων με τους οποίους οι μικροοργανισμοί ανταλλάσσουν γενετικό υλικό, καθώς και τα στοιχεία που φέρουν τα γονίδια ανθεκτικότητας. Επίσης θα διερευνηθούν οι παράγοντες που προκαλούν αυτή την ανταλλαγή, μέσα στην αλυσίδα τροφίμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Αντιβιοτικά

1.1.1 Η εμφάνιση των αντιβιοτικών:

Το 1928 άρχισε η συστηματική μελέτη της πενικιλίνης. Αιτία υπήρξε μια σχεδόν τυχαία παρατήρηση της δράσης της πάνω στους σταφυλόκοκκους από τον γιατρό Alexander Fleming (1881-1955), ο οποίος διεξήγαγε μια έρευνα πάνω στις ιδιότητες των σταφυλόκοκκων (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012). Ο Fleming θεωρείται ως ο "πατέρας της πενικιλίνης", επειδή υπήρξε ο πρώτος ο οποίος ορθά υπέθεσε την ύπαρξή της και το γεγονός ότι παράγεται από μύκητες. Η πραγματική έρευνα πάνω στην πενικιλίνη όμως, ξεκίνησε περίπου 10 χρόνια μετά τις πρώτες παρατηρήσεις του Fleming, από την "ομάδα της Οξφόρδης". Το 1939, ο φαρμακολόγος και παθολόγος Howard Florey, με τον συνεργάτη του βιοχημικό Ernst Boris Chain και μια ομάδα ερευνητών ιατρών και βιοχημικών, στη Σχολή Παθολογίας του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης απέδειξαν την in vivo βακτηριοκτόνο δράση της πενικιλίνης σε ποντίκια. Μια πρόκληση που έπρεπε να αντιμετωπίσουν αρχικά οι ερευνητές ήταν η απομόνωση της πενικιλίνης σε καθαρή μορφή. Η απομόνωση της καθαρής πενικιλίνης από τις καλλιέργειες ήταν μια πολύ δύσκολη διαδικασία, κυρίως λόγω της χημικής αστάθειάς της. Στην απομόνωσή της συνέβαλαν κυρίως οι βιοχημικοί της ομάδας.

1.1.2 Πρώτη δοκιμή σε άνθρωπο:

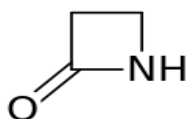
Οι δοκιμές με καθαρή πενικιλίνη σε πειραματόζωα υπήρξαν επιτυχείς και απέδειξαν ότι η ουσία σε καθαρή μορφή δεν είναι τοξική. Όμως, η πρώτη δοκιμή σε άνθρωπο απέτυχε λόγω των μικρών ποσοτήτων πενικιλίνης που διέθετε η ομάδα των ερευνητών. Η πρώτη δοκιμή της πενικιλίνης σε ασθενή έγινε το 1941. Ο συγκεκριμένος, είχε μολυνθεί με στρεπτόκοκκο και σταφυλοκοκκο και ήταν σχεδόν ετοιμοθάνατος. Αφού του χορηγήθηκαν ενδοφλεβίως 160 mg πενικιλίνης, έδειξε σαφή σημεία βελτίωσης, όμως η θεραπεία δεν μπορούσε να συνεχιστεί λόγω έλλειψης της απαραίτητης ποσότητας του αντιβιοτικού και ο άτυχος ασθενής πέθανε μετά από έναν περίπου μήνα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι οι ακούραστοι ερευνητές προσπαθούσαν ακόμη και από τα ούρα του ασθενούς να παραλάβουν την πενικιλίνη για να του την επαναχορηγήσουν. Και αυτό γιατί το 80% της πενικιλίνης αποβάλλεται αναλλοίωτη από τον ανθρώπινο οργανισμό ταχύτατα μέσω των νεφρών (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012). Επίσης, η ποσότητα πενικιλίνης που χρειαζόταν για ένα μόνο ασθενή απαιτούσε την

επεξεργασία και εκχύλιση εκατοντάδων λίτρων υγρών καλλιέργειας του μύκητα. Για την ανακάλυψη και τη θεραπευτική χρήση της πενικιλίνης, οι Fleming, Florey και Chain τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel ιατρικής και φυσιολογίας του 1945.

1.1.3 Η πρώτη μαζική παραγωγή πενικιλίνης:

Στις αρχές της δεκαετίας του 1940 η επιστημονική κοινότητα είχε πλέον πεισθεί για την τεράστια θεραπευτική χρησιμότητα της πενικιλίνης, οπότε οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στη μαζική παραγωγή της. Ένας επιπλέον λόγος ήταν η θεραπευτική κάλυψη του πλήθους των τραυματιών των μαχών του 2ου Παγκοσμίου Πολέμου. Το κέντρο βάρους της έρευνας πάνω στην μαζική παραγωγή πενικιλίνης μεταφέρθηκε στις ΗΠΑ και το έργο αυτό ανέλαβαν μεγάλες φαρμακευτικές εταιρείες, αλλά κάτω από κρατικό έλεγχο λόγω του πολέμου. Στις ΗΠΑ, οι ερευνητές των φαρμακευτικών βιομηχανιών σύντομα διαπίστωσαν ότι η τεχνική που χρησιμοποιούσε η ομάδα της Οξφόρδης για την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium chrysogenum*, σε επίπεδες φιάλες, δεν παρείχε ικανοποιητικές αποδόσεις. Την τεχνική αυτή αντικατέστησαν με την κατά πολύ αποδοτικότερη τεχνική της "βυθισμένης καλλιέργειας", όπου ο μύκητας μπορούσε να αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό μέσα σε μεγάλες δεξαμενές (ζυμωτήρες) υπό σταθερή ανάδευση και με συνεχή διαβίβαση αέρα (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012). Έτσι, η τεχνική των "τριών διαστάσεων" αντικατέστησε την λιγότερο αποδοτική τεχνική των "δύο διαστάσεων" και μπορούσε πλέον να χρησιμοποιηθεί όλη η μάζα του θρεπτικού υλικού. Μεγάλες βελτιώσεις έγιναν και στη σύνθεση του υποστρώματος, όταν χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υλικό ένα υγρό παραπροϊόν της άλεσης του καλαμποκιού, πλούσιο σε υδατάνθρακες, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Επίσης η προσθήκη λακτόζης στο υγρό αυτό διπλασίασε την απόδοση. Ωστόσο, αυτό που εκτόξευσε στα ύψη την απόδοση της καλλιέργειας και έκανε εφικτή την παραγωγή πενικιλίνης σε μεγάλες ποσότητες και χαμηλό κόστος, ήταν η απροσδόκητη ανακάλυψη ενός στελέχους του *Penicillium chrysogenum*, που βρέθηκε σε ένα μουχλιασμένο πεπόνι και ήταν ιδιαίτερα κατάλληλο για τις "βυθισμένες καλλιέργειες" του μύκητα. Το στέλεχος αυτό αποδίδει εκατονταπλάσιες ποσότητες πενικιλίνης σε σχέση με τα στελέχη που χρησιμοποιούσε ο Fleming και η ομάδα του (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012). Η επανάσταση στην ιατρική είχε γίνει πλέον πραγματικότητα. Οι εγχειρήσεις μπορούσαν πλέον να πραγματοποιούνται με ασφάλεια χωρίς τον κίνδυνο μολύνσεων. Οι τοκετοί έγιναν πολύ ασφαλέστεροι και η βρεφική θνησιμότητα μπορούσε να ελαττωθεί. Η πενικιλίνη εκτιμάται ότι έσωσε περίπου το 12-15% των τραυματιών κατά τη διάρκεια του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου.

Ο οργανικός χημικός και βιοχημικός Edward Abraham (1913-1999) της ομάδας Florey-Chain διατύπωσε πρώτος την υπόθεση για την παρουσία του τετραμελούς β-λακταμικού δακτυλίου στο μόριο της πενικιλίνης, που αποδείχθηκε καθοριστικός για τη φαρμακολογική δράση της. Το 1945, το θέμα της χημικής δομής της πενικιλίνης, λύθηκε οριστικά από την Dorothy Crowfoot Hodgkin (1910-1994), η οποία εξέτασε με ακτίνες X κρυστάλλους πενικιλίνης που της είχε παραχωρήσει ο Abraham και επιβεβαίωσε την υπόθεσή του για την παρουσία του β-λακταμικού δακτυλίου (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012).



Σχήμα 1: Η απλούστερη β-λακτάμη.

Η β-λακτάμη είναι ένα κυκλικό αμίδιο. Το άτομο του αζώτου βρίσκεται στο δεύτερο άτομο άνθρακα ως προς το καρβονύλιο. Οι β-λακτάμες είναι οι δομικές μορφές πολλών φαρμακευτικών ουσιών γιατί έχουν σημαντική θεραπευτική δράση.

Η ανακάλυψη της πενικιλίνης έφερε την «εκρηκτική» παραγωγή νέων αντιμικροβιακών ουσιών μεταξύ 1950 – 1990, όπου τα αντιβιοτικά έγιναν προϊόν της βιομηχανίας και άρχισαν να παράγονται σε μεγάλες ποσότητες. Έγιναν πολλές έρευνες για την εύρεση και απομόνωση νέων αντιβιοτικών και με την πρόοδο της οργανικής χημείας πολλά άρχισαν να συνθέτονται τεχνητά στο εργαστήριο. Η ζωή της ανθρωπότητας άλλαξε σημαντικά.

1.1.4 Η χρήση τους ως αυξητικοί παράγοντες στη βιομηχανία κρέατος:

Κατά τη δεκαετία του 1960 οι εκτροφείς βοοειδων στις ΗΠΑ, άρχισαν να χορηγούν στα ζώα, πολύ μικρές ποσότητες αντιβιοτικών μαζί με την τροφή τους. Στα συγκεκριμένα ζώα παρατηρήθηκε αύξηση της μυϊκής μάζας και διαπιστώθηκε ότι η αφομοίωση της τροφής γινόταν πιο αποτελεσματική. Η συγκεκριμένη τακτική υιοθετήθηκε σιγά σιγά από όλους τους μεγάλους παραγωγούς κρέατος και χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα, αν και σε πολλές χώρες η χρήση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων έχει απαγορευτεί. Δυστυχώς η χρήση των αντιβιοτικών και άλλων αντιμικροβιακών είναι πλέον αναπόφευκτη. Πολλοί τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί που συχνάζουν στα κόπρανα των ζώων, ή εγκαθίστανται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας προϊόντων κρέατος, έρχονται τόσο συχνά σε επαφή με αντιμικροβιακούς παράγοντες, που καταλήγουν να γίνονται ανθεκτικοί σε αυτούς, με διάφορους τρόπους. Οι επιπτώσεις των ανθεκτικών παθογόνων μικροοργανισμών εμφανίζονται πρωτίστως στις ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού.

1.1.5 Η λανθασμένη χρήση από τους καταναλωτές:

Οι χώρες με τη μεγαλύτερη κατανάλωση αντιβιοτικών, χαρακτηρίζονται και από τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά, ενώ όπου έχει καταβληθεί επιτυχημένη προσπάθεια για την μείωση της κατανάλωσης των αντιβιοτικών (π.χ. Βέλγιο, Γαλλία), αυτή συνοδεύεται και από την αντίστοιχη μείωση των ποσοστών αντοχής. Η Ελλάδα είναι από τις πρώτες χώρες στην Ευρώπη στην κατανάλωση αντιβιοτικών, σύμφωνα με το European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Έχει αποδειχθεί ότι το 75% της κατανάλωσης αντιβιοτικών αφορά σε λοιμώξεις του αναπνευστικού, για τις οποίες είναι γνωστό ότι το 70% των περιπτώσεων οφείλονται σε ιούς, έναντι των οποίων τα αντιβιοτικά δεν είναι δραστικά. Μπροστά στον κίνδυνο να μείνει η Ιατρική ουσιαστικά άοπλη στη μάχη κατά των λοιμώξεων, έχουν αναληφθεί σημαντικές πρωτοβουλίες σε παγκόσμιο επίπεδο. Στην αύξηση της αντοχής έρχεται να προστεθεί η έλλειψη νέων δραστικών αντιβιοτικών, ώστε σήμερα να αντιμετωπίζουμε το φαινόμενο του «τέλους των αντιβιοτικών».

1.2 Ορισμοί των αντιβιοτικών:

Τα αντιβιοτικά είναι χημειοθεραπευτικά φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ή πρόληψη βακτηριακών λοιμώξεων. Είναι είτε φυσικές, είτε συνθετικές, είτε ημισυνθετικές ουσίες. Τα αντιβιοτικά είτε δρουν βακτηριοστατικά όπου αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, είτε βακτηριοκτόνα όπου σκοτώνουν τα βακτηριακά κύτταρα. Αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων με το να βλάπτουν το κυτταρικό τους τοίχωμα και να επεμβαίνουν στη σύνθεση των πρωτεϊνών και των γονιδίων τους. Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση ή το μηχανισμό δράσης τους. Ο όρος αντιβιοτικό εισήχθη το 1942 από τον βιοχημικό και μικροβιολόγο Selman Waksman (1888-1973), ο οποίος ανακάλυψε τη στρεπτομυκίνη το 1943. Ο όρος "αντιβιοτικό" χρησιμοποιούνταν για να περιγράψει κάθε ουσία που παράγεται από έναν μικροοργανισμό, η οποία σε μεγάλες αραιώσεις δρα ανταγωνιστικά στην ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών ή προκαλεί τον θάνατό τους. Με βάση τον ορισμό αυτό, ως αντιβιοτικά δεν μπορούν να ονομαστούν ουσίες που σκοτώνουν τα βακτήρια, αλλά δεν παράγονται από μικροοργανισμούς (π.χ. το ιώδιο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου). Χάρη στην πρόοδο της Φαρμακευτικής Χημείας, τα περισσότερα σύγχρονα αντιβιοτικά είναι πλέον και ημισυνθετικές ενώσεις, που συχνά παρασκευάζονται με χημικές τροποποιήσεις φυσικών ενώσεων.

1.2.1 Αντιβιοτικά και αντιμικροβιακά:

Τα αντιμικροβιακά περιλαμβάνουν ουσίες που αντιμετωπίζουν ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, όπως ιούς, ζύμες, μύκητες και βακτήρια. Χρησιμοποιούνται για θανάτωση ή περιορισμό των μικροοργανισμών στόχων και έχουν πολλούς μηχανισμούς δράσης. Συνήθως χρησιμοποιούνται ένζυμα-αναστολείς, που εμποδίζουν τα λειτουργικά ένζυμα του κυττάρου. Άλλοτε, πχ στους ιούς, χρησιμοποιούνται ανάλογα νουκλεοσιδίων, δηλαδή τμήματα DNA που μοιάζουν με τμήματα του DNA του ιού. Το ψεύτικο τμήμα αντικαθιστά αυτό που προυπήρχε και έτσι η αντιγραφή του κυττάρου σταματάει. Τα αντιβιοτικά στοχεύουν συγκεκριμένα τα βακτήρια. Είναι σημαντικό για το ευρύ κοινό να κατανοήσει πόσο εξειδικευμένη είναι δράση των αντιβιοτικών, γιατί ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού όταν εμφανίσει συμπτώματα γρίπης, προσπαθεί να τα αντιμετωπίσει με τη λήψη αντιβιοτικών.

1.2.2 Στενό φάσμα και ευρύ φάσμα:

Τα αντιβιοτικά, μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την εστίαση της δράσης τους σε αντιβιοτικά «στενού - φάσματος». Τα αντιβιοτικά που σκοτώνουν τόσο τα Gram-θετικά όσο και τα Gram-αρνητικά είναι τα ευρέως φάσματος. Τα αντιβιοτικά που σκοτώνουν μόνο τα Gram-θετικά ή μόνο τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι γνωστά ως αντιβιοτικά στενού φάσματος. [Ένα παράδειγμα αντιβιοτικών στενού φάσματος είναι οι παλαιότερες πενικιλίνες. (πενικιλίνη G), οι μακρολίδες και η βανκομυκίνη. Ενώ, παράδειγμα ευρέως φάσματος αντιβιοτικά είναι οι αμινογλυκοσίδες, οι συνθετικές πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες 2ης και 3ης γενεάς.]

1.2.3 Βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά:

Μερικά αντιβιοτικά καταστρέφουν τα βακτήρια (βακτηριοκτόνα), καταστρέφοντας συγκεκριμένα τμήματά τους, όπως η μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα τους, ή επιδρώντας στον αναπνευστικό τους κύκλο, ενώ άλλα αποτρέπουν τα βακτήρια από τον πολλαπλασιασμό (βακτηριοστατικά).

1.3 Οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών και ο τρόπος δράσης τους:

Τα περισσότερα αντιβιοτικά, δρουν με έναν ή και περισσότερους από τους ακόλουθους μηχανισμούς :

1. Αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος
2. Επεμβαίνουν στη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης
3. Αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση και
4. Αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων

Ορισμός πεπτιδογλυκάνης:

Η πεπτιδογλυκάνη, είναι δομικό στοιχείο στο κυτταρικό τοίχωμα των περισσότερων βακτηρίων, που συντίθεται από δύο παράγωγα σακχάρων και μια μικρή ομάδα αμινοξέων. Σχηματίζει μια άκαμπτη στιβάδα στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων.

Ορισμός DD-τρανσπεπτιδάσης:

Η DD-τρανσπεπτιδάση είναι το ένζυμο που συνδέει τις αλυσίδες της πεπτιδογλυκάνης.

Ορισμός β-λακταμάσης:

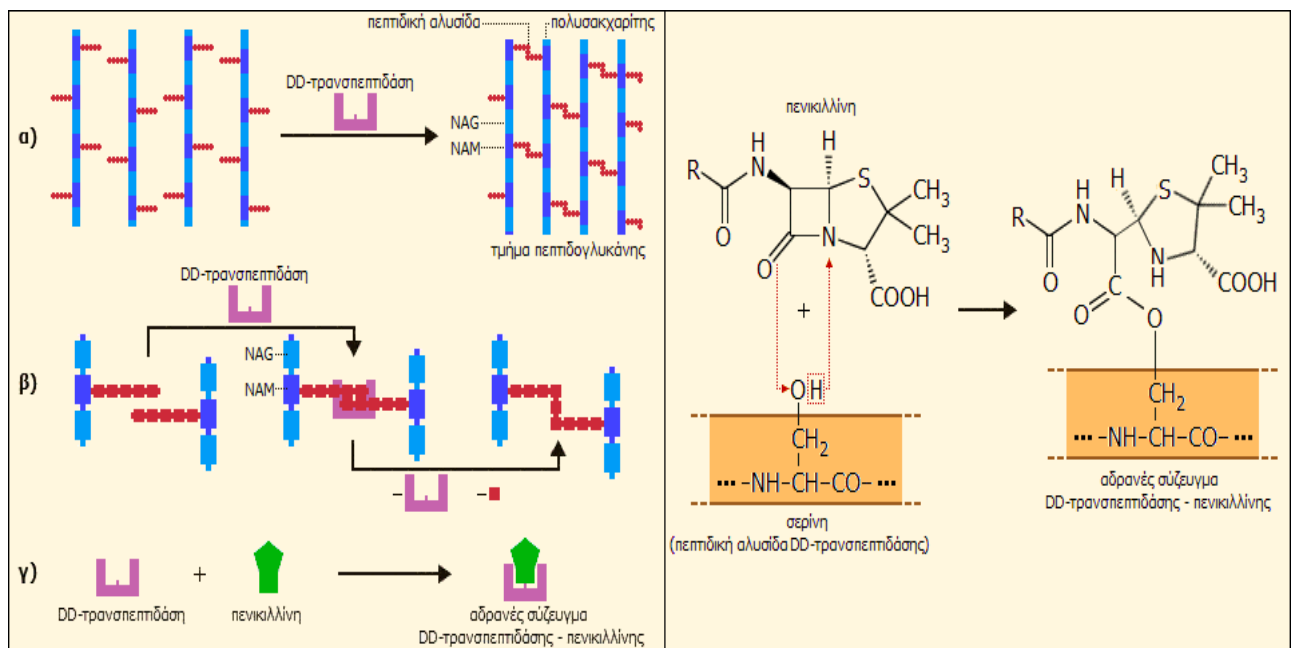
Η β-λακταμάση είναι ένα ένζυμο, το οποίο χρησιμοποιούν ορισμένα βακτήρια, κυρίως Gram-αρνητικά ραβδοειδή βακτήρια, για να προφυλαχθούν από τα αντιβιοτικά της β-λακτάμης.

1.3.1 Οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών είναι :

1. β – λακτάμες
2. Τετρακυκλίνες
3. Μακρολίδες
4. Αμινογλυκοσίδες
5. Κινολόνες
6. Γλυκοπεπτίδια
7. Λινκοζαμίδες
8. Σουλφοναμίδες

1.3.1.1 Οι β – λακτάμες:

Οι β-λακτάμες είναι κυκλικά αμίδια. Όλα τα αντιβιοτικά που περιέχουν β-λακτάμη, δρουν παρεμποδίζοντας το σχηματισμό του τοιχώματος των βακτηρίων, το οποίο συνίσταται από πεπτιδογλυκάνη. Πιο συγκεκριμένα, αδρανοποιούν τη DD-τρανσπεπτιδάση, το ένζυμο που συνδέει τις αλυσίδες της πεπτιδογλυκάνης. Το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου σταδιακά εξασθενεί εφόσον δεν μπορεί να αναπληρώσει τα σημεία φθοράς του και τελικά το βακτήριο υπόκειται σε κυτταρόλυση.



Σχήμα 2: Αριστερά: Μηχανισμός σύνθεσης του τοιχώματος πεπτιδογλυκάνης: α) οι αλυσίδες πολυσακχαριτών ενώνονται με πεπτιδικές αλυσίδες μέσω του ενζύμου DD-τρανσπεπτιδάση. β) Στάδια του μηχανισμού. γ) η πενικιλίνη συνδέεται σταθερά με το ένζυμο DD-τρανσπεπτιδάση, καθιστώντας αδύνατη τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. **Δεξιά:** Αντίδραση πενικιλίνης μετά τη διάνοιξη του β-λακταμικού δακτυλίου με το υδροξύλιο του αμινοξέος σερίνης της πεπτιδικής αλυσίδας της DD-τρανσπεπτιδάσης.

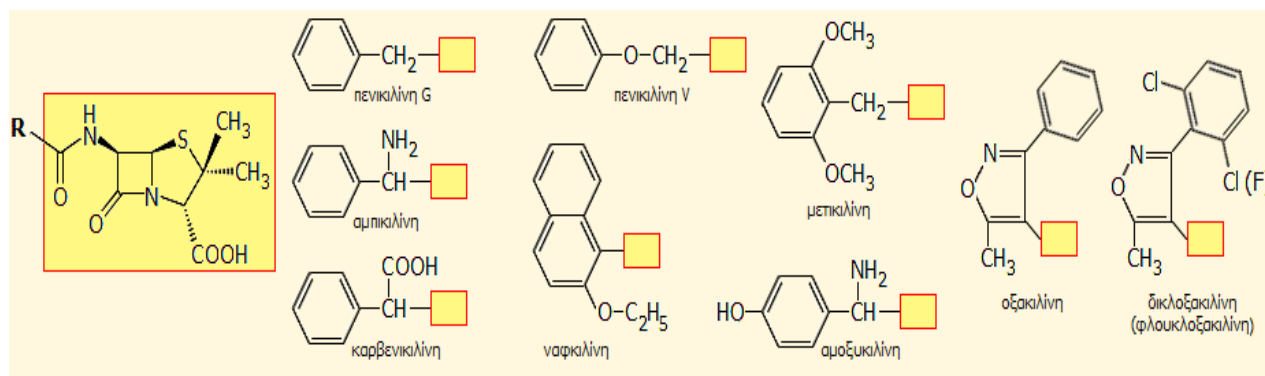
Είναι μια από τις σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών, τόσο από ιστορική όσο και από ιατρική άποψη. Στα αντιβιοτικά της β-λακτάμης ανήκουν οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες και οι κεφαμυκίνες και η αμικικιλίνη. (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012).

Πενικιλίνη:

Η πενικιλίνη, είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης, κάποιων ειδών του μύκητα *Penicillium*. Παράγεται κάτω από συνθήκες στρες του μύκητα και όχι κατά την κανονική του ανάπτυξη.

Συνθετικά παράγωγα της πενικιλίνης:

Πάρα πολλά παράγωγα της πενικιλίνης έχουν κατασκευαστεί, για να αντιμετωπίσουν βακτήρια που είναι ανθεκτικά στη φυσική μορφή της πενικιλίνης, (πενικιλίνη G). Οι κυριότερες διαφορές εντοπίζονται στη φύση των ομάδων R, που συνδέονται με την αμιδική ομάδα. Στα πλήρως συνθετικά αντιβιοτικά β-λακτάμης, έχει αντικατασταθεί και ο πλευρικός θειαζολινικός δακτύλιος της φυσικής πενικιλίνης.



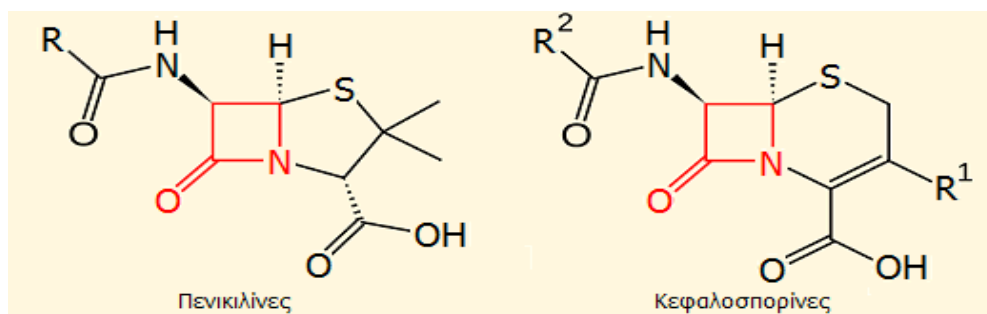
Σχήμα 3: Η πενικιλίνη G (φυσική πενικιλίνη) και ορισμένα παράγωγά της που διαφέρουν μόνο ως προς τη φύση της ομάδας R της αμιδικής ομάδας.

Μηχανισμός δράσης της πενικιλίνης:

Η πενικιλίνη, όπως και όλα τα άλλα αντιβιοτικά β-λακτάμης αδρανοποιούν την DD-τρανσπεπτιδάση. Η πενικιλίνη, μέσω του β-λακταμικού τμήματός της, "μιμείται" το καταληκτικό τμήμα της πεπτιδικής αλυσίδας, το οποίο κανονικά συνδέεται με το δραστικό τμήμα του ενζύμου. Έτσι επέρχεται μια σταθερή σύνδεση της πενικιλίνης με την DD-τρανσπεπτιδάση, η οποία αδρανοποιείται (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012). Διακόπτεται ο σχηματισμός πεπτιδογλυκάνης και εξασθενίζει το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου, αφού δεν μπορεί να αναπληρώσει τα σημεία φθοράς του.

Κεφαλοσπορίνες:

Οι κεφαλοσπορίνες διαφέρουν από τις πενικιλίνες ως προς τον πλευρικό δακτύλιο της β-λακτάμης ο οποίος είναι εξαμελής και διαθέτει διπλό δεσμό. Το πρώτο μέλος της ομάδας των κεφαλοσπορινών απομονώθηκε το 1956 από έναν μύκητα που βρίσκεται στους υπονόμους, τον *Cephalosporium acremonium*.



Σχήμα 4: Η χημική δομή της πενικιλίνης και της κεφαλοσπορίνης. Με κόκκινο χρώμα διακρίνεται ο β-λακταμικός δακτύλιος.

Οι κεφαλοσπορίνες δρουν βακτηριοκτόνα, αναστέλλοντας την σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων. Όπως οι πενικιλίνες, το ίδιο και οι κεφαλοσπορίνες είναι πολύτιμες λόγω της μικρής τοξικότητάς τους και του ότι είναι ευρέως φάσματος, δηλαδή δραστικές έναντι βακτηρίων και θετικών και αρνητικών κατά Gram. Έτσι, οι κεφαλοσπορίνες χρησιμοποιούνται εξίσου με τις διάφορες πενικιλίνες και καταλαμβάνουν περίπου το 30% της αγοράς των αντιβιοτικών φαρμάκων. Οι κεφαλοσπορίνες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες.

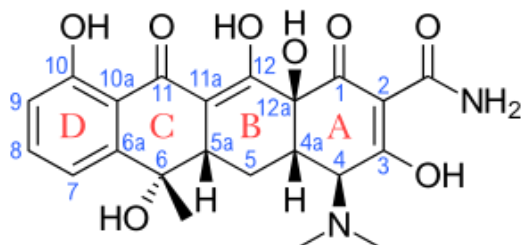
- Οι πρώτης γενεάς κεφαλοσπορίνες, που διακρίνονται για την υψηλή δραστηριότητα κατά των σταφυλοκόκκων και των παραγωγών β-λακταμάσης.
- Οι δεύτερης γενεάς κεφαλοσπορίνες έχουν υψηλότερη ανθεκτικότητα κατά της β-λακταμάσης.
- Η τρίτη γενεά έχει ευρύτερο φάσμα δράσης, καλύπτει δηλαδή επιπλέον βακτήρια.

Σημάνσεις όπως «4η» ή «5η» γενεά είναι εμπορικοί, διαφημιστικοί χαρακτηρισμοί. Οι πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες συνιστούν πάνω από το 50% του συνόλου των αντιβιοτικών που παράγονται και χρησιμοποιούνται παγκοσμίως (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012).

1.3.1.2 Τετρακυκλίνες:

Οι τετρακυκλίνες θεωρούνται ως τα πρώτα αντιβιοτικά ευρέως φάσματος, καθώς δρούν βακτηριοστατικά ενάντια σε πολλά είδη μικροοργανισμών, gram θετικών και gram αρνητικών βακτηρίων, αλλά και σε μερικά πρωτόζωα. Οι τετρακυκλίνες έχουν μια κοινή βασική δομή και είτε απομονώνονται από διάφορα είδη του *Streptomyces*, ή παράγονται ημισυνθετικά. Το μόριο της τετρακυκλίνης αποτελείται από τέσσερις δακτύλιους ενωμένους

γραμμικά, (όπου αριθμούνται ως A, B, C and D) που πάνω τους προσδένονται διάφορες λειτουργικές ομάδες. Ενώ όλες οι τετρακυκλίνες έχουν κοινή δομή, διαφέρουν ως προς την παρουσία και τη θέση, των μεθυλίων, των υδροξυλίων και των χλωριδίων που περιέχουν.



Σχήμα 5: Η σκελετική δομή της τετρακυκλίνης και οι αριθμημένοι δακτύλιοι.

Η ανθεκτικότητα των *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, που είναι αναερόβια μέλη των Enterobacteriaceae, στην τετρακυκλίνη είναι πλέον αρκετά συχνή. Η τετρακυκλίνη (tetracycline) αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, αναστέλλοντας την μετάφραση, αποτρέποντας την σύνδεση του tRNA στο σύμπλεγμα mRNA-ριβოსώματος.

Μηχανισμός δράσης της τετρακυκλίνης:

Η τετρακυκλίνη αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου. Συγκεκριμένα, προσδένεται στην υποομάδα 30S του μικροβιακού ριβοσώματος μπλοκάροντας τη μετάφραση του κυττάρου. Έτσι αποτρέπει την παραγωγή νέων αμινοξέων, κατά την πρωτεϊνοσύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η δράση της είναι αναστρέψιμη με τη διακοπή της χορήγησης. Οι τετρακυκλίνες και τα αντιβιοτικά β – λακτάμης είναι οι δυο σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών ουσιών στην ιατρική. Οι τετρακυκλίνες χρησιμοποιούνται ευρέως και στην κτηνιατρική, σε ορισμένες μάλιστα χώρες χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα διατροφής στα ορνιθοτροφεία και στα χοιροτροφεία. Η εκτεταμένη χρήση κλινικά σημαντικών αντιβιοτικών σε μη ιατρικές εφαρμογές είχε ως συνέπεια την ανάπτυξη πολλών στελεχών που εμφανίζουν αντοχή στα εν λόγω αντιβιοτικά. Έτσι η χρήση τους σήμερα σε τέτοιες εφαρμογές, γίνεται προσπάθεια να αποφευχθεί.

1.3.1.3 Μακρολίδες:

Οι μακρολίδες ανήκουν στα βακτηριοστατικά φάρμακα, έχουν ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων αφού εμποδίζουν την μεταφορά ή και την μετάθεση των πεπτιδίων. Το γνωστότερο μακρολιδικό αντιβιοτικό είναι η ερυθρομυκίνη.

1.3.1.4 Αμινογλυκοσίδες:

Τα αντιβιοτικά αυτά είναι βακτηριοκτόνα για τα αερόβια βακτήρια. Οι αμινογλυκοσίδες περιέχουν αμινοσακχαρα που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικό δεσμό. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν χρήσιμα αντιβιοτικά, μεταξύ των οποίων η στρεπτομυκίνη και οι συγγενικές με αυτήν καναμυκίνη, γενταμυκίνη και νεομυκίνη.

1.3.1.5 Κινολόνες:

Οι κινολόνες είναι ευρέος φάσματος συνθετικά βακτηριοκτόνα. Δρουν παρεμβαίνοντας στη σύνθεση του DNA των βακτηρίων. Στην ομάδα ανήκουν το ναλιδιξικό οξύ, η φωσφομυκίνη και οι φλουοροκινολόνες, όπως η σιπροφλοραξίμη.

1.3.1.6 Γλυκοπεπτίδια:

Πρόκειται για μια μεγάλη ομάδα ουσιών που παράγονται από μύκητες και αποτελούνται από μεγάλα κυκλικά μόρια με αμινοξέα ενωμένα με σάκχαρα. Ανήκουν στα βακτηριοκτόνα και δρουν αναστέλλοντας τη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκανης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Ένα τυπικό παράδειγμα είναι η βανκομυκίνη.

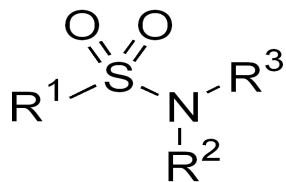
Μηχανισμός δράσης της βανκομυκίνης:

Η βανκομυκίνη ενδείκνυται για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων από θετικά κατά Gram βακτήρια που δεν ανταποκρίνονται σε άλλα αντιβιοτικά. Δρα με το να αναστέλλει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των Gram θετικών οργανισμών.

Ενώ τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος με το να συνδέονται στο ενεργό κέντρο της τρανσπεπτιδάσης, η βανκομυκίνη δρα με ένα εντελώς διαφορετικό μηχανισμό. Δεσμεύεται στο άκρο της πρόδρομης πεπτιδογλυκάνης και σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο, το οποίο εμποδίζει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Η βανκομυκίνη αναστέλλει το τελικό στάδιο σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης. Οποιαδήποτε διαδικασία επεμβαίνει στη σύνδεση της βανκομυκίνης με την πρόδρομη πεπτιδογλυκάνη στο κυτταρικό τοίχωμα, μειώνει τη δραστηριότητα του φαρμάκου .

1.3.1.7 Σουλφοναμίδες:

Πρόκειται για μια ομάδα συνθετικών αντιμικροβιακών ουσιών που περιέχουν ως λειτουργική ομάδα τη σουλφοναμίδη.



Σχήμα 6: Η λειτουργική ομάδα της σουλφοναμίδης

Τα φάρμακα της σουλφοναμίδης δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς ενός συγκεκριμένου ενζύμου, που σχετίζεται με τη σύνθεση του φυλλικού οξέος στα βακτήρια. Επομένως δρουν βακτηριοστατικά, καθώς αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, αλλά δεν τα θανατώνουν. Τα φάρμακα της σουλφοναμίδης, ήταν τα πρώτα αντιβακτηριδιακά ευρέως φάσματος που χρησιμοποιήθηκαν μαζικά και έθεσαν το δρόμο, για την επανάσταση των αντιβιοτικών στην ιατρική. Στην ομάδα αυτή ανήκει η σουλφιζοξαζόλη.

Η περίπτωση του Prontosil:

Το Prontosil, που βγήκε στην αγορά το 1935, ήταν το πρώτο πατενταρισμένο φάρμακο, που μπορούσε να θεραπεύσει ένα μεγάλο εύρος βακτηριακών λοιμώξεων μέσα στο σώμα, καθώς κατά το μεταβολισμό του απελευθερώνεται η δραστική ουσία της σουλφοναμίδης. Το Prontosil, ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό εναντίων των gram θετικών κόκκων και κυρίως των στρεπτόκοκκων. Τα φάρμακα με βάση τη σουλφοναμίδη, ήταν η μόνη αποτελεσματική λύση, έναντι των βακτηρίων στα χρόνια πριν την ανακάλυψη της πενικιλίνης, κυρίως κατά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, που χρησιμοποιούνταν σαν είδος πρώτης ανάγκης. Μέχρι τότε στις πληγές χρησιμοποιούνταν τοπικά αντισηπτικά και υπήρχαν πολύ λίγα αντιμικροβιακά φάρμακα που μπορούσαν να χορηγηθούν με ασφάλεια στον ασθενή (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012).

1.4 Μέθοδοι αντίστασης των μικροοργανισμών κατά των αντιβιοτικών:

Αντίσταση κατά των αντιβιοτικών της β-λακτάμης:

Σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την ευρεία χρήση της πενικιλίνης και των άλλων αντιβιοτικών β-λακτάμης, διαπιστώθηκε ότι σε πολλές περιπτώσεις τα βακτήρια αναπτύσσουν μια "αντίσταση" κατά των αντιβιοτικών αυτών. Κυριότερη αιτία αυτής της αντίστασης είναι η ικανότητά τους, να δημιουργούν τα ένζυμα β-λακταμάσες τα οποία υδρολύουν τον β-λακταμικό δακτύλιο αχρηστεύοντας έτσι το δραστικό κέντρο του αντιβιοτικού, πριν προλάβει να δράσει επί του βακτηρίου. Δηλαδή, τα βακτήρια όταν καταλάβουν πως δέχονται "επίθεση" από την πενικιλίνη, "αντεπιτίθεται" εκλύοντας β-λακταμάσες. Για την αντιμετώπιση αυτού του είδους της αντίστασης, οι πενικιλίνες μπορούν να χορηγηθούν με αναστολείς της β-λακταμάσης. Τυπικό παράδειγμα φαρμακευτικού σκευάσματος, το οποίο συνδυάζει αντιβιοτικό και αναστολέα, είναι το σκεύασμα με την εμπορική ονομασία Augmentin, που αποτελείται από την ημισυνθετική πενικιλίνη αμοξυκιλλίνη και τον αναστολέα της β-λακταμάσης κλαβουλανικό οξύ. Άλλος τρόπος ανάπτυξης αντίστασης των βακτηρίων κατά των αντιβιοτικών β-λακτάμης είναι το ότι αναπτύσσουν παράπλευρες πεπτιδικές αλυσίδες στο τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης τους με τη βοήθεια ενός ενζύμου που μοιάζει στην DD-τρανσπεπτιδάση, στο οποίο όμως δεν μπορούν να συνδεθούν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου 2012).

Αντίσταση κατά των τετρακυκλινών:

Τα βακτήρια συνήθως αποκτούν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη με οριζόντια μεταφορά γονιδίου, που είτε κωδικοποιεί μια αντλία efflux, είτε μια ριβοσωματική προστατευτική πρωτεΐνη. Οι αντλίες αποβάλλουν την τετρακυκλίνη από το κύτταρο, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συγκεντρωθεί στο κυτταρόπλασμα και να δράσει ανασταλτικά. Οι ριβοσωμικές προστατευτικές πρωτεΐνες αποσυνδέουν την τετρακυκλίνη απ το ριβόσωμα, επιτρέποντας να συνεχιστεί η μετάφραση (Σακοράφα 2012).

Συνοπτικά, οι μηχανισμοί δράσης των μικροοργανισμών έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων είναι κυρίως οι εξής:

1. Χημική απενεργοποίηση του φαρμάκου:

Οι μικροοργανισμοί παράγουν ένζυμα που υδρολύουν το φάρμακο, για παράδειγμα τις β-λακταμάσες, τις κεφαλοσπορινάσες και τις πενικιλινάσες. Άλλες φορές προσθέτουν μια χημική ομάδα στην φαρμακευτική ουσία και την καθιστά ανενεργή.

2. Μεταβολή του στόχου δράσης του φαρμάκου:

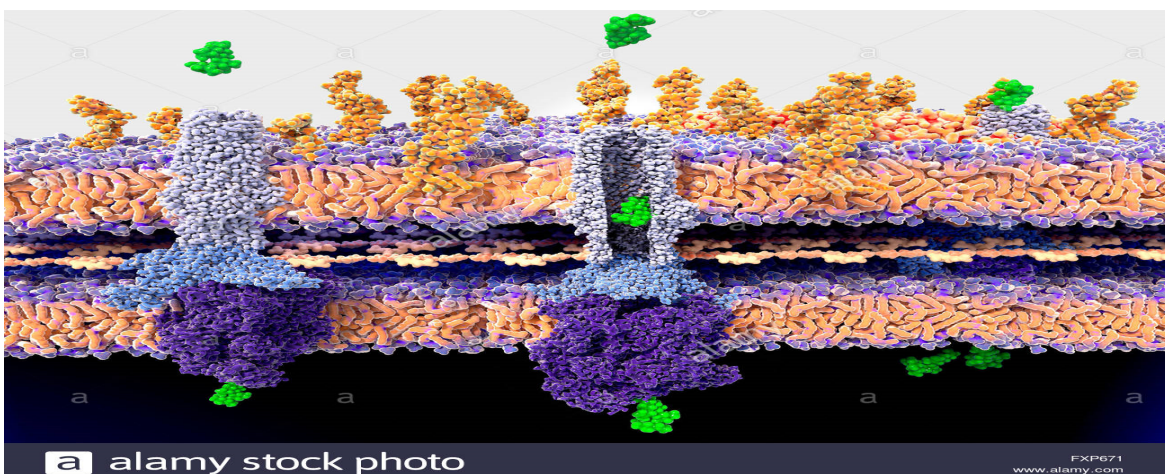
Σε αυτή την περίπτωση το σημείο πρόσδεσης του φαρμάκου στην κυτταρική μεμβράνη μεταβάλλεται, συνήθως λόγω κάποιας μετάλλαξης και το αντιμικροβιακό χάνει τον στόχο του.

3. Μείωση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης:

Αυτή τη τακτική παρατηρείται κυρίως στα gram αρνητικά βακτήρια, τα οποία προκαλούν τα κανάλια της κυτταρικής τους μεμβράνης να κλείσουν κι έτσι η χημική ουσία αδυνατεί να εισέλθει στο κύτταρο.

4. Efflux pumps:

Το φαινόμενο drug efflux, εμφανίζεται όταν το αντιμικροβιακό έχει εισέλθει στο βακτηριακό κύτταρο. Τότε ενεργοποιούνται κάποιες προστατευτικές πρωτεΐνες, που κανονικά δρουν ως αντλίες λιπόφιλων μορίων και αποβάλλουν τον αντιμικροβιακό παράγοντα έξω από το κύτταρο. Συνήθως η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνικών αντλιών μεταξύ τους, είναι που δημιουργεί τις πολυανθεκτικές πρωτεϊνικές αντλίες (multidrug efflux pumps), οι οποίες μπορούν να αποβάλλουν παραπάνω από ένα τύπο φαρμάκου (Σακοράφα 2012).



Σχήμα 7: Το φαινόμενο drug efflux. Εδώ, το gram αρνητικό βακτήριο, αποβάλλει τα μόρια του αντιβιοτικού, (συγκεκριμένα της στρεπτομυκίνης με πράσινο χρώμα) με τη βοήθεια των πρωτεϊνικών αντλιών efflux (με μωβ και μπλε χρώμα).

5. Δημιουργία βιοφίλμ:

Σε αυτή την περίπτωση, τα βακτηριακά κύτταρα προστατεύονται από ένα βιοφίλμ που παράγει μια κοινότητα μικροοργανισμών. Στο βιοφίλμ συμμετέχουν πολλοί μικροοργανισμοί αλλά και προϊόντα αυτών, δημιουργώντας ένα προστατευτικό τείχος, έτσι ώστε καθίσταται αδύνατο για τη χημική ουσία να εισέλθει στο κύτταρο (Σακοράφα 2012).

1.5 Τρόπος μεταφοράς των γονιδίων:

Όλες αυτές οι αλλαγές στη λειτουργία του βακτηριακού κυττάρου, οφείλονται σε γονίδια, τα οποία ονομάζονται γονίδια ανθεκτικότητας, λόγω του αποτελέσματος της έκφρασής τους.

Τα γονίδια αυτά εμφανίζονται με δυο τρόπους:

- Ως αποτέλεσμα μεταλλαξιογένεσης
- Με οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού

Πρόκειται είτε για γονίδια του ίδιου του βακτηρίου που υπέστησαν μετάλλαξη, είτε για γονίδια βακτηρίων που παράγουν αντιβιοτικά και έχουν μηχανισμούς αυτοπροστασίας είτε τέλος γονίδια βακτηρίων του εδάφους που διαθέτουν φυσική ανθεκτικότητα (Σακοράφα 2012). Δηλαδή οι μηχανισμοί αντοχής προκύπτουν είτε μέσα από μεταλλάξεις στα βακτηριακά χρωμοσωμικά γονίδια που κωδικοποιούν την ευαισθησία στα αντιβιοτικά, είτε μέσω της μεταφοράς εξωχρωμοσωμικών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια, τα ιντεγκρόνια και τα τρανσποζόνια. Τα στοιχεία μεταφέρονται μεταξύ των βακτηρίων μέσω σύζευξης (επαφή κυττάρου με κύτταρο), μεταγωγής (εισαγωγή βακτηριοφάγου) ή μετασχηματισμού (πρόσληψη γυμνού DNA). Η σύζευξη θεωρείται ο πιο σημαντικός τρόπος μεταφοράς. Η μεταφορά αυτών των γονιδίων πραγματοποιείται όταν υπάρχουν συνθήκες στενής γειννίας των βακτηριακών κυττάρων (όπως συμβαίνει π χ στον εντερικό σωλήνα), με σύζευξη, ή μέσω βακτηριοφάγων (Σακοράφα 2012). Η μεταφορά των γονιδίων ανάμεσα στα βακτήρια, μπορεί να συμβεί ανεξαρτήτως του είδους και του γένους αυτών και συμβαίνει ακόμα και μεταξύ gram διαφορετικών βακτηρίων.

1.5.1 Τα μεταφερόμενα γενετικά στοιχεία:

Τα γενετικά στοιχεία που μεταφέρονται είναι:

α) Πλασμίδια:



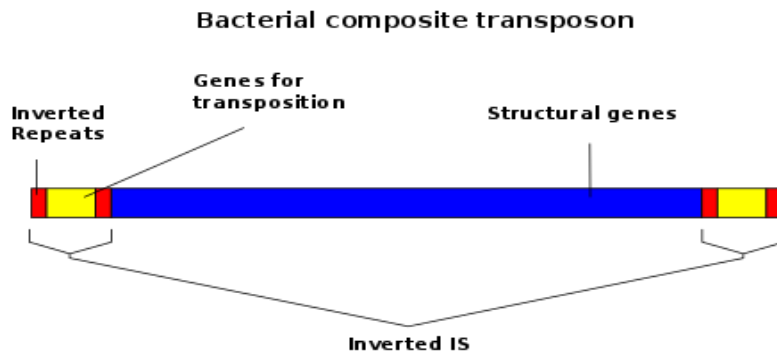
Σχήμα 8: Ένα πλασμίδιο σε 3D απεικόνιση

Πρόκειται για μικρά κυκλικά μόρια DNA που περιέχουν το 1-2% της γενετικής πληροφορίας του κυττάρου και μπορούν να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από το κύριο βακτηριακό DNA. Τα πλασμίδια έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και από κυτταρο σε κυτταρο. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό τόσο μεταξύ τους όσο και με το κύριο μόριο DNA του βακτηρίου, στο οποίο βρίσκονται. Αυτό είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό για την εξάπλωση της ανθεκτικότητας, γιατί μέσω των πλασμιδίων, ένα βακτήριο αποκτά ιδιότητες που δεν είχε πριν. Επίσης εμπόδια, του είδους και του γένους μπορούν εύκολα να υπερπηδηθούν. (Σακοράφα 2012) Ο τρόπος με τον οποίο μεταφέρεται το DNA σε αυτές τις περιπτώσεις ονομάζεται σύζευξη και είναι ένα από τα φαινόμενα της οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού. Ένα αξιοσημείωτο γεγονός είναι πως η αναλογία της μεταφοράς πλασμιδίων φαίνεται να αυξάνεται περισσότερο σε πιο ετερογενείς κοινότητες.

(R-πλασμίδια: Πρόκειται για κατηγορία πλασμιδίων που μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας. Η συσσώρευση πολλών R πλασμιδίων, που το καθένα κωδικοποιεί διαφορετικό γονίδιο ανθεκτικότητας, συμβάλλει στο φαινόμενο της πολυανθεκτικότητας των βακτηρίων.)

β) Transposons:

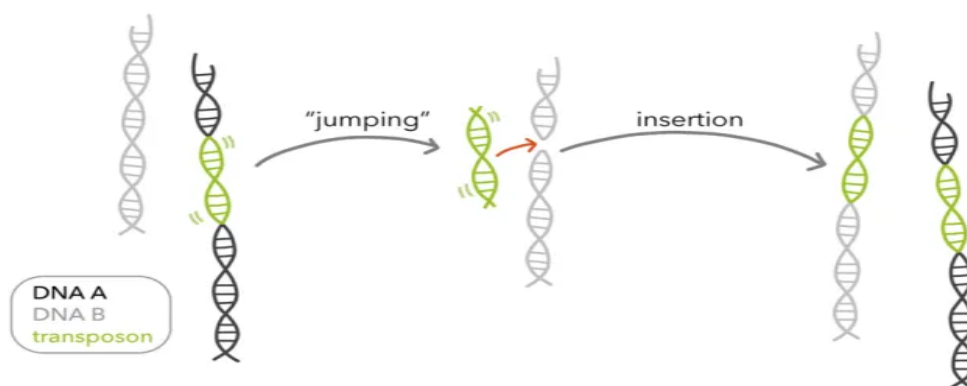
Είναι κομμάτια γενετικού υλικού που έχουν τη δυνατότητα να κινούνται ενδοκυτταρικά, αλλά και μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Περιέχουν ένα ή περισσότερα γονίδια.



Σχήμα 9: Η δομή ενός τρανσποζονίου

Τρανσποζόνια σύζευξης:

Τα κινητά γενετικά στοιχεία (MGE, Mobile Genetic Elements), παίζουν σημαντικό ρόλο στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT, Horizontal Gene Transfer) ανάμεσα στα βακτήρια. Ένα τέτοιο στοιχείο ενσωμάτωσης και σύζευξης είναι τα τρανσποζόνια σύζευξης που μεταφέρονται ανεξάρτητα και είναι ευρέως διαδεδομένα στα βακτήρια. Έχουν ενοποιητικές ιδιότητες και ιδιότητες σύζευξης. Εκτός από τα γονίδια που εμπλέκονται στην κινητικότητα τους, στη ρύθμιση ή στη συντήρησή τους, μεταφέρουν και άλλους καθοριστικούς παράγοντες, όπως γονίδια αντιβιοαντοχής (Σακοράφα 2012).



Σχήμα 10: Ο τρόπος μεταφοράς ενός τρανσποζονίου (πράσινο χρώμα), διαμέσου δύο γονιδιωμάτων (DNA A, DNA B).

γ) Intergrons:

Είναι σχηματισμοί που περιέχουν μια ομάδα γονιδίων μαζί με ένα γονίδιο κωδικοποίησης μιας ιντεργκράσης. Οι ιντεργκράσεις είναι ένζυμα, που συμβάλλουν στη διαδικασία ενσωμάτωσης σε μόριο DNA (Σακοράφα 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Τροφιμογενή παθογόνα

Οι τροφιμογενείς ασθένειες δημιουργούν μεγάλο πρόβλημα στην παγκόσμια υγεία. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα που εξέδωσε το CDC (US Centers for disease control and prevention), 76 εκατομμύρια παθήσεις, 325.000 εισαγωγές στο νοσοκομείο και 5000 θάνατοι, κάθε χρόνο, οφείλονται σε τροφιμογενείς ασθένειες, στις Ηνωμένες Πολιτείες. Πέντε, είναι τα κυρίαρχα παθογόνα, στα οποία οφείλεται το 90% των θανάτων, εξαιτίας τροφοδηλητηρίασης: Η *Salmonella*, *Listeria*, *Yersinia*, *Campylobacter* και *Escherichia Coli* O157:H7. (White et al. 2002). Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις, τα συμπτώματα που εμφανίζονται, (κυρίως διάρροια), ολοκληρώνουν τον κύκλο τους, χωρίς επιπλοκές, άτομα που ανήκουν σε ευπαθείς ομάδες χρειάζονται φαρμακευτική περίθαλψη. Είναι πλέον ευρέως γνωστό, ότι η χρήση αντιβιοτικών από ανθρώπους και ζώα εκτροφής, μπορεί να δημιουργήσει βακτηριακά στελέχη με ανθεκτικότητα. Στα ζώα εκτροφής, αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για δύο λόγους. Για πρόληψη και θεραπεία τυχόν βακτηριακών λοιμώξεων και για αύξηση του βάρους του ζώου. Μια ανεπιθύμητη συνέπεια αυτής της τακτικής, είναι η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και καταφέρνουν να μεταδοθούν στον άνθρωπο, σαν επιμόλυνση μέσα από τα τρόφιμα. Ανθεκτικοί φαινότυποι, έχουν ανιχνευθεί σε πάρα πολλά παθογόνα ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένης της *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* και *Yersinia enterocolitica*. Παρακάτω θα ασχοληθούμε αναλυτικότερα με καθένα από τα προαναφερθέντα παθογόνα και την ικανότητά τους να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. (White et al. 2002)

Είδος (Species): Ομάδα οργανισμών ενός γένους με συγκεκριμένα φαινοτυπικά, βιοχημικά ή γενετικά χαρακτηριστικά, **spp.:** Πολλαπλά είδη.

Στέλεχος ή Κλώνος: Απόγονος ενός κυττάρου.

Τύπος: Είδος που θεωρείται πρότυπο του γένους.

Φαινότυπος: είναι όλα τα μορφολογικά, παραγωγικά, ηθολογικά κ.λ.π. χαρακτηριστικά που εκδηλώνει ένας οργανισμός σε μία δεδομένη στιγμή, δηλαδή το μέρος του γονοτύπου του οργανισμού το οποίο μπορούμε (άμεσα ή έμμεσα) να παρατηρήσουμε.

Αντιγόνα (Serotypes): Ονομάζονται τα στοιχεία των μικροοργανισμών που ομαδοποιούνται με βάση τη δομή τους (πχ το σώμα και το μαστίγιο του βακτηρίου).

Ορότυπος: Στελέχη του ίδιου είδους που διαφέρουν ως προς την αντιγονική τους σύσταση

Οροαποτύπωση (Serotyping): Είναι μία φαινοτυπική μέθοδος διάκρισης των μικροοργανισμών με βάση τα αντιγονικά τους στοιχεία (serotypes).

Παθογένεια: Η μελέτη της δημιουργίας μιας παθολογικής κατάστασης και κατ' επέκταση, το αίτιο που την προκαλεί.

Shiga-τοξίνες, ή τοξίνες (Stx): Είναι μια από τις ισχυρότερες γνωστές βακτηριακές τοξίνες. Δρουν με το να αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση των ευκαρυωτικών κυττάρων.

STEC: (Shiga toxin-producing *E. coli*), ονομάζονται οι Shiga-τοξίνες, που παράγονται από την *E.coli*.

2.1 *Escherichia coli*:

Η *E. coli*, είναι ένα gram αρνητικό, προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο βακτήριο. Είναι κομμάτι του φυσιολογικού μικροβιακού πληθυσμού μέσα στο εντερικό σύστημα του ανθρώπου και στα θερμόαιμα ζώα. Τα περισσότερα στελέχη της δηλαδή, είναι αβλαβή, όμως μερικά στελέχη είναι παθογόνα και προκαλούν λοιμώξεις. Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως τροφιμογενές παθογόνο το 1982.

2.1.1 Κατηγορίες της *E. coli*:

Οροτυπικά:

Η *E. coli* κατηγοριοποιείται με βάση τρία σημαντικά αντιγόνα, το σωματικό (O), το καψιδιακό (K) και το μαστιγιακό (H).

Με βάση το μηχανισμό παθογένειας:

Εντεροτοξική *Escherichia coli* - (ETEC)-γαστρεντερίτιδα

Εντεροπαθογόνος *Escherichia coli* (EPEC)-παιδική διάρροια

Εντεροαιμορραγική *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC)-αιμοραγική κολίτιδα

Εντεροδιεισδυτική *Escherichia coli* - (EIEC)-δυσεντερία

Η *E.coli* O157:H7, είναι ο πιο συνηθισμένος ορότυπος της EHEC, και τα περισσότερα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί, σχετίζονται με αυτόν τον ορότυπο.

2.1.2 Κρούσματα:

Η *E.coli* O157:H7 έχει προκαλέσει πολλά κρούσματα μολύνσεων στις ΗΠΑ, στον Καναδά, στην Ιαπωνία και το Ηνωμένο Βασίλειο με εκατοντάδες περιστατικά. Το κυριότερο κρούσμα παγκοσμίως συνέβη το 1996 στην Ιαπωνία, με 11.000 καταγεγραμμένα περιστατικά. (White et al. 2002) Αν και η *E.coli* O157:H7 παραμένει ο κυρίαρχος ορότυπος της εντεροαιμορραγικής *E.coli*, υπάρχουν και άλλοι ορότυποι που έχουν προκαλέσει σποραδικά περιστατικά, όπως η *E.coli* O157:NM, που προκάλεσε μια επιδημία με χιλιάδες περιστατικά, μετά από πόση μολυσμένου νερού, στην Ελβετία και στη Νότια Αφρική. Σε κάποιες χώρες οι μολύνσεις από εντεροαιμορραγικούς ορότυπους πλην του O157 είναι συχνότερες. Επίσης είναι δύσκολη η παρακολούθηση αυτών των βακτηρίων γιατί δεν διαθέτουν διακριτούς βιοχημικούς φαινότυπους. Το CDC εκτιμά πως η *E.coli*, κρύβεται πίσω από 73.000 ασθένειες και 61 θανάτους κάθε χρόνο στις Η.Π.Α. και στελέχη εκτός του O157:H7 είναι υπεύθυνα για 37.740 περιπτώσεις εκ των οποίων 30 θάνατοι. Το 85% αυτών των περιπτώσεων οφείλεται σε επιμολύνσεις που μεταδόθηκαν μέσω του φαγητού. (White et al. 2002)

2.1.3 Παθογένεια:

Τα περισσότερα στελέχη της *E.coli* O157:H7, προσδένονται στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή και αποικούν το παχύ έντερο. Έπειτα, παράγουν τοξίνες Stx_s, οι οποίες προκαλούν το αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο (HUS), μια σοβαρή και συχνά θανατηφόρα κατάσταση. Η *E.coli* O157:H7 έχει προκαλέσει πολλά κρούσματα μόλυνσης ανα τον κόσμο. Η σιγκουατοξίνη που παράγεται από την *E.coli* (STEC), αναγνωρίστηκε ως επικίνδυνο παθογόνο για τον άνθρωπο, για πρώτη φορά το 1982, όπου το στέλεχος O157:H7, θεωρήθηκε υπεύθυνο για δύο περιπτώσεις έξαρσης αιμορραγικής κολίτιδας που συνέβη από την κατανάλωση μοσχαρίσιου μπιφτεκιού που δεν είχε μαγειρευτεί επαρκώς. Από τότε, πάνω από 200 STEC ορότυποι, έχουν αναγνωριστεί και απομονωθεί, από ζώα, φαγητό και άλλες πηγές. Παρόλα αυτά, μόνο 60 από αυτούς σχετίζονται με ανθρώπινα νοσήματα. (White et al. 2002)

2.1.4 Πηγές:

Ένα μεγάλο υδατογενές κρούσμα συνέβη στη Νέα Υόρκη το 1999, με περισσότερα από 900 περιστατικά και τρεις θανάτους από HUS, λόγω κατανάλωσης ροφημάτων από μη χλωριωμένο νερό από πηγάδι. Πολλά κρούσματα που προέρχονται από κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, ή προϊόντων αυτών (πχ μηλίτης), έχει αποδειχθεί ότι μολύνθηκαν από

κοπριά ζώων που έβοσκαν σε γειτονικά χωράφια, κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση τους σε μέρη που μπορεί να υπήρχε κοπριά, ή κατα τους χειρισμούς αυτών με μολυσμένο νερό. (Montville & Matthews 2008) Επίσης η χρησιμοποίηση της κοπριάς αυτής ως λίπασμα των φυτών, έχει προκαλέσει συχνά προβλήματα λοιμώξεων. Η επαφή των τροφίμων με κρέας ,περιττώματα ή νερό μολυσμένο με *E.coli O157:H7* δεν είναι η μόνη πηγή επιμόλυνσης. Πολλές επιδημίες έχουν προκληθεί από τη μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο.

2.1.5 Ανάπτυξη και επιβίωση:

Η *E.coli O157:H7* είναι αρκετά θερμοευαίσθητη. Έτσι ο κύριος τρόπος καταπολέμησης της στα τρόφιμα, είναι η θερμική επεξεργασία. Μπορεί να αδρανοποιηθεί με την παστερίωση του γάλακτος. Η παρουσία ορισμένων ουσιών στα τρόφιμα μπορεί να αυξήσει την αντοχή της κατα τη θέρμανση, όπως πχ η παρουσία λίπους στον κιμά. Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισής της είναι η ακτινοβόληση. Όπου έχει το πλεονέκτημα να μην ασκεί θερμική βλάβη στο προϊόν, έναντι της θερμικής επεξεργασίας. Τα τροφογενή παθογόνα είναι σχετικά ευαίσθητα στην ακτινοβόληση. Ένα χαρακτηριστικό που διαχωρίζει την *E.coli O157:H7* από τα υπόλοιπα τροφογενή παθογόνα, είναι ότι πολλά στελέχη της είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε όξινα περιβάλλοντα. Το ελάχιστο pH για την ανάπτυξη της *E.coli O157:H7* είναι μεταξύ 4,0 και 4,5 αλλά εξαρτάται από την αλληλεπίδραση του pH με άλλους παράγοντες, όπως το μίγμα οργανικών οξέων που περιέχουν οξικό, κιτρικό και γαλακτικό οξύ. (Montville & Matthews 2008) Η κατάσταση ανθεκτικότητας σε οξέα μπορεί να διαρκέσει για αρκετό χρονικό διάστημα (28 μέρες) σε θερμοκρασία ψύξης. Επίσης είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η κατάσταση ανθεκτικότητας σε οξέα στην *E.coli O157:H7*, μπορεί να αυξήσει την ανθεκτικότητα και σε άλλες καταπονήσεις, όπως τη θέρμανση, την ακτινοβολία και τις αντιμικροβιακές ουσίες.

2.1.6 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά:

Τα αντιβιοτικά δεν είναι η λύση που προτείνεται για αντιμετώπιση λοιμώξεων από *E. coli O157:H7* σε ανθρώπους. Και αυτό γιατί κατα τη δράση του αντιβιοτικού, τα βακτήρια που θανατώνονται απελευθερώνουν τις ενδοτοξίνες τους (Stx) και η ασθένεια χειροτερεύει. Στα αρχικά κλινικά στάδια, τα απομονωμένα στελέχη της *E. coli O157:H7*, ήταν ευπαθή στα περισσότερα αντιβιοτικά των gram αρνητικών βακτηρίων. Αρκετές μελέτες έδειχναν, ότι το συγκεκριμένο στέλεχος δεν εμφανίζει ανθεκτικότητα. Ωστόσο γίνεται συνεχώς ανθεκτικότερη, κυρίως στο τριο: στρεπτομυκίνη-σουλφισοξαζόλη-τετρακυκλίνη. (White et al. 2002)

Τα ανθεκτικά στελέχη κατέχουν ένα εκλεκτικό πλεονέκτημα έναντι των υπολοίπων βακτηρίων που αποικούν το έντερο των ζώων και υποβάλλονται σε θεραπείες με αντιβιοτικά. Γιατί έπειτα από εκλεκτική καταπόνηση με αντιβιοτικά, τα ανθεκτικά στελέχη της *E.coli*, θα είναι τα κυρίαρχα στα κόπρανα των ζώων. Το 1989, στο Μιζούρι, λόγω μολυσμένων υδάτων, εμφανίστηκε μία έξαρση της *E.coli* O157:H7, και το συγκεκριμένο στέλεχος, έδειξε ανθεκτικό στη στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη και σουλφισοξαζόλη. Μια άλλη έρευνα από το Ουάσιγκτον, εξετάζοντας δείγματα από ανθρώπινα κόπρανα, το 1989 με 1991, έδειξε ότι 13 από τα 176 στελέχη ήταν ανθεκτικά στα τρία συγκεκριμένα αντιβιοτικά. (White et al. 2002) Την ίδια εποχή αναφέρθηκε, ότι 30 από τα 125 είδη της *E.coli* O157:H7 και O157:NM, που απομονώθηκαν από ζώα, τρόφιμα και ανθρώπους, εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό και 24 από αυτά, ήταν ανθεκτικά σε τρία ή περισσότερα. Ο πιο συχνά εμφανιζόμενος φαινότυπος, ήταν αυτός που έχει ανθεκτικότητα στην στρεπτομυκίνη-τετρακυκλίνη-σουλφισοξαζόλη, σε ποσοστό 70% έναντι των υπολοίπων στελεχών. Επίσης, δύο από τα δείγματα της *E.coli* O157:NM, που απομονώθηκαν από βοοειδή, ήταν ανθεκτικά σε έξι αντιβιοτικά: αμικιλίνη, καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη και σουλφισοξαζόλη. Η ανθεκτικότητα στη φωσφομυκίνη, που είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό για γαστρεντερικές λοιμώξεις σε παιδιά στην Ιαπωνία, είχε αυξανόμενη πορεία.(White et al. 2002) Η εξάπλωση και διασπορά της αντιμικροβιακής αντοχής των STEC στελεχών, έχει σοβαρές επιδημιολογικές επιπτώσεις. Τα βοοειδή είναι ο κύριος ξενιστής των STEC στελεχών. Είναι πολύ πιθανό, το συγκεκριμένο στέλεχος να επικρατήσει έναντι άλλων εντερικών βακτηρίων, υπό την παρουσία αντιβιοτικών, στα βοοειδή. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε περισσότερες επιμολύνσεις με STEC. Γι αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η έρευνα, ο έλεγχος και περιορισμός των στελεχών, που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα.

2.1.7 Εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών της *Escherichia coli* :

Έχει πρόσφατα αναφερθεί η παρουσία στελεχών της *Escherichia coli* με πολυανθεκτικό φαινότυπο, συγκεκριμένα παρουσιάστηκαν ανθεκτικά σε τέσσερις και παραπάνω οικογένειες αντιβιοτικών (Saenz et al. 2004). Το γεγονός αυτό είναι πολύ ανησυχητικό για την παγκόσμια υγεία. Η μεταφορά ανθεκτικών γονιδίων από τα κινητά γενετικά στοιχεία όπως τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και οι γενετικές κασέτες των *integrons*, φαίνεται να είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες εκ των οποίων τα βακτήρια αποκτούν πολυανθεκτικούς φαινότυπους (Saenz et al. 2004). Μελετήθηκε το προφίλ της αντιβιοαντοχής, από 515 μη παθογόνα στελέχη της *E.*

coli, που πάρθηκαν από δείγματα τροφίμων, άλλα είχαν ζωική προέλευση και τα υπόλοιπα από δείγματα κοπράνων από ανθρώπους και ζώα. Δεκαεφτά στελέχη της *E. coli* από αυτές τις ομάδες, (τέσσερα από τα τρόφιμα, οχτώ από τα ζώα και πέντε από ανθρώπινα κόπρανα) εμφάνισαν πολυανθεκτικούς φαινότυπους και συγκεκριμένα, ανθεκτικότητα στο ναλιδιξικό οξύ, στη αμπικιλίνη, χλωραμφενικόλη, σουλφαμεθοξαζόλη, στρεπτομυκίνη και τετρακυκλίνη (Saenz et al. 2004). Τα αποτελέσματα δείχνουν πως μια μεγάλη ποικιλία ανθεκτικών γονιδίων έχει συμβάλει στο φαινόμενο της πολυανθεκτικότητας των μη παθογόνων στελεχών της *E. coli* από ανθρώπους, ζώα και προϊόντα τροφίμων. Επομένως αυτά τα περιβάλλοντα μπορούν να δράσουν ως δότες και δέκτες κινητών γενετικών στοιχείων. Η ενσωμάτωση γονιδίων ανθεκτικότητας μέσα στα ιντεργκρόνια, είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για να συνδυαστεί η αντιβιοαντοχή μικροοργανισμών, από διαφορετικά οικοσυστήματα. (Saenz et al. 2004)

2.2 *Salmonella*:



Σχήμα 11 : Βακτηριακά στελέχη της *Salmonella*

2.2.1 Χαρακτηριστικά:

Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει πάνω από 2400 διαφορετικούς τύπους. Στις αρχές του 19ου αιώνα, η ασθένεια που προκαλεί αναγνωρίστηκε ως τυφοειδής πυρετός. Στις αρχές του 20ου αιώνα έγιναν μεγάλες προσπάθειες στην ορολογική ανίχνευση των σωματικών (O) και μαστιγιακών αντιγόνων της. Η *Salmonella* είναι gram αρνητικό, προαιρετικά αναερόβιο, ραβδόμορφο βακτήριο. Η *Salmonella*, είναι ικανή να χρησιμοποιεί ένα μεγάλο εύρος οργανικών υποστρωμάτων (White et al. 2002).

2.2.2 Ανάπτυξη και επιβίωση:

Η *Salmonella* μπορεί να επιβιώνει σε θερμοκρασίες ψύξης, κατάψυξης και δωματίου. Η παρατεταμένη έκθεση σε θερμική καταπόνηση, δίνει τη δυνατότητα σε κάποια στελέχη της να αναπτύσσονται ακόμη και στους 54°C. Η θερμοανθεκτικότητα της αυξάνεται επίσης κατά τη μείωση της a_w , σ ένα υπόστρωμα που θερμαίνεται. Το εύρος του pH στο οποίο αναπτύσσεται είναι πολύ μεγάλο, σε τιμές από 4,5 ως 9,5, με βέλτιστες τιμές από 6,5 με 7,5. Τα συντηρούμενα υπό ψύξη τρόφιμα, τα οποία συσκευάζονται υπό κενό ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, προκαλούν μεγάλη ανησυχία, εφόσον η *Salmonella* αναπτύσσεται και υπό αναερόβιες συνθήκες και μάλιστα ενισχύεται υπό υψηλή αλατοπεριεκτικότητα. (Montville & Matthews 2008). Τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα αποτελούν επίσης πρόκληση για τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς η παρουσία της *Salmonella*, ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα, μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες για τη δημόσια υγεία.

2.2.3 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά:

Η θεραπεία που χρησιμοποιείται ευρέως για μόλυνση από *Salmonella* είναι η αμπικιλίνη, η χλωραμφενικόλη και η σουλφαμεθοξαζόλη. Η αξιοσημείωτη παγκόσμια αύξηση της ανθεκτικότητας των τυφοειδών οργανισμών σε αυτά τα αντιβακτηριακά φάρμακα τις τελευταίες δεκαετίες έχει περιορίσει την αποτελεσματικότητά τους (White et al. 2002). Το πρώτο περιστατικό ανθεκτικής *Salmonella* που καταγράφηκε, ήταν το 1960, στη χλωραμφενικόλη. Από τότε η συχνότητα απομόνωσης στελεχών της *Salmonella* με ανθεκτικότητα σε έναν ή παραπάνω αντιμικροβιακούς παράγοντες έχει αυξηθεί σε πάρα πολλές χώρες συμπεριλαμβανομένων των ΗΠΑ, του Ηνωμένου Βασιλείου και της Σαουδικής Αραβίας (White et al. 2002). Ανθεκτικοί φαινότυποι έχουν καταγραφεί σε είδη της *Salmonella* σε όλο τον κόσμο. Για παράδειγμα, μία επταετής έρευνα στην Ισπανία έδειξε ότι είδη της *Salmonella* ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, αυξήθηκαν από 8 σε 44%, στην τετρακυκλίνη από 1 σε 42% και στο ναλιδιξικό οξύ, από το 0,1 στο 11%

Τα είδη *S. Typhi* και *S. Paratyphi*:

Τα δύο είδη που εμφανίζουν πολυανθεκτικότητα εδώ και αρκετές δεκαετίες είναι η *S. Typhi* και σε μικρότερο βαθμό η *S. Paratyphi* (Eng et al. 2015). Η *S. Typhi* έχει βρεθεί συχνά στην Αφρική και στην Ασία και συγκεκριμένα, ο πολυανθεκτικός της τύπος. Σε μια έρευνα που διεξήχθη σε πέντε ασιατικές χώρες, συγκεκριμένα στην Ινδία, στο Πακιστάν και στο Βιετνάμ, τα ποσοστά της πολυανθεκτικής *S. Typhi* που απομονώθηκαν ήταν υψηλότερα απ ότι στην

Ινδονησία και στη Κίνα. Άλλες έρευνες παρουσιάζουν παρόμοια δεδομένα και δείχνουν πως τα MDR στελέχη της *S. Typhi* στο Πακιστάν, στην Ινδία και στο Βιετνάμ είναι υψηλότερα από ότι στη Κίνα, στην Ινδονησία και στο Λάος (Eng et al. 2015). Εφόσον εξαπλώθηκε η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνταν αρχικά, για την *S.Typhi*, επιλέχθηκαν ως κατάλληλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες για την πολυανθεκτική *S.Typhi*, οι φλουοροκινολόνες και οι ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες (Eng et al. 2015). Δυστυχώς όμως, έρευνες δείχνουν ότι οι περιπτώσεις σαλμονέλας, ανθεκτικής στις φλουοροκινολόνες έχουν αυξηθεί. Σε χώρες που έχει βρεθεί μεγάλος αριθμός MDR στελεχών, η *S. Paratyphi* εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικότητας στις φλουοροκινολόνες σε σχέση με την *S. Typhi* (Eng et al. 2015).

2.2.4 Η εμφάνιση των πολυανθεκτικών στελεχών της *Salmonella*:

Η ανθεκτικότητα στο ναλιδιξικό οξύ που χρησιμοποιείται ως δείκτης μειωμένης ευαισθησίας στις φλουοροκινολόνες και στο ciprofloxacin, έχει απομονωθεί από το Πακιστάν, την Ινδία και το Βιετνάμ σε ανησυχητικά μεγάλα ποσοστά των 59%, 57% και 44%, (Eng et al. 2015). Ο αριθμός των στελεχών που αναπτύσσουν πολυανθεκτικό φαινότυπο έχει αυξηθεί σε πολλές χώρες από το 1990 που παρουσιάστηκε το πρώτο πολυανθεκτικό στέλεχος της *S. Typhimurium*, το DT104 (Eng et al. 2015).

2.2.5 Εξάπλωση της ανθεκτικής *Salmonella*:

Η χρήση αντιβιοτικών στις ζωοτροφές, για αύξηση του βάρους των ζώων και επίσης για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων, είναι ο κύριος λόγος εξάπλωσης των ανθεκτικών στελεχών. Τα πολυανθεκτικά στελέχη της *Salmonella*, μεταφέρονται μετέπειτα από τα ζώα στον άνθρωπο είτε με άμεση επαφή, είτε έμμεσα, μέσω κατανάλωσης τροφίμων αυτών ή επιμολυσμένου νερού. Επίσης, πολυανθεκτικά στελέχη της *Salmonella* έχουν βρεθεί σε εξωτικά κατοικίδια ζώα, όπως χελώνες καθώς και στο περιβάλλον διαβίωσής τους.(Eng et al. 2015). Αν και η *Salmonella* μεταδίδεται και από άνθρωπο σε άνθρωπο και από τον άνθρωπο στα τρόφιμα, το 95% των περιπτώσεων που λαμβάνουν χώρα στις ΗΠΑ ετησίως, έχουν προέλθει από τροφιμογενείς λοιμώξεις. Φαγητό προερχόμενο από ζώα, ευθύνεται για πολλές εξάρσεις της *Salmonella* κατά καιρούς. Πολλές περιπτώσεις ασθενών οφείλονται στο στέλεχος *S.typhimurium* που βρίσκεται κατα βάσιν στα ζώα. Από το 1960 έχουν αναφερθεί περιπτώσεις επιμόλυνσης από άμεση επαφή των ασθενών με ζώα φάρμας.

Η διασπορά και εξάπλωση του συγκεκριμένου είδους, οδήγησε σε μια γενικότερη μείωση της ευαισθησίας της *Salmonella* σε πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

2.2.6 Μηχανισμός ανθεκτικότητας:

Έρευνες έδειξαν ότι οι ορότυποι της *Salmonella* που φέρουν πολυανθεκτικό φαινότυπο, φέρουν διαφόρων ειδών, υβριδικά πλασμίδια. Η πλειονότητα του γονιδιώματος που φέρουν αυτά τα πλασμίδια, έχει να κάνει με γονίδια ανθεκτικότητας στα κλασικά αντιβιοτικά όπως στην χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνες, αμικικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Eng et al. 2015). Οι ορότυποι της *Salmonella* που παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στο ciprofloxacin είναι προϊόν χρωμοσωμικής μετάλλαξης του γονιδίου gyrA. (Eng et al. 2015). Το γονίδιο gyrA, που κανονικά προσφέρει ανθεκτικότητα στις κινολόνες, εμφανίζεται μεταλλαγμένο σε πολλούς ορότυπους της *Salmonella* με μειωμένη ευαισθησία στο ciprofloxacin. Επίσης, διάφοροι ορότυποι της *Salmonella* εμφανίζονται ανθεκτικοί στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και αυτό οφείλεται σε μεταλλαγμένα γονίδια, που κωδικοποιούν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες, οι οποίες υδρολύουν όλα τα αντιβιοτικά με β-λακταμικό δακτύλιο όπως οι κεφαλοσπορίνες και οι κεφαμυκίνη (Eng et al. 2015).

2.2.7 Παθογένεια:

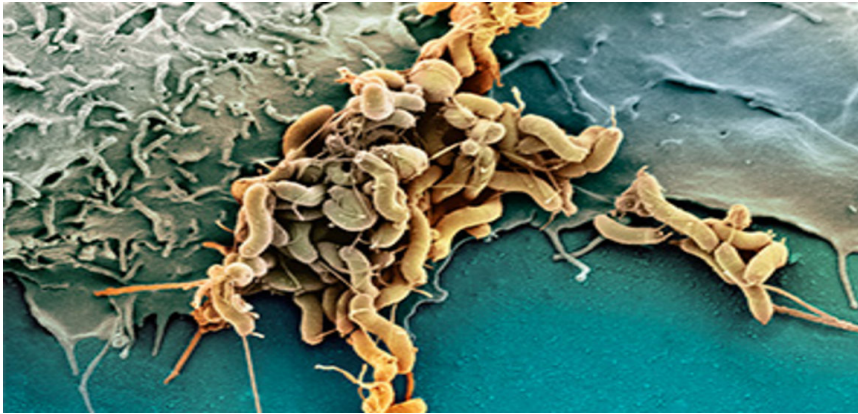
Η *Salmonella* στον άνθρωπο, έχει ως κύρια συμπτώματα τη διάρροια και τον εντερικό (τυφοειδή) πυρετό. Τα συμπτώματα του πυρετού εμφανίζονται έπειτα από μία περίοδο επώασης 7 έως 20 ημερών. Η διάγνωση της ασθένειας γίνεται από την απομόνωση του μολυσματικού παράγοντα από το αίμα και τα ούρα του ασθενούς στα αρχικά κλινικά στάδια, ή τα κόπρανα μετά την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Η *Salmonella* μπορεί να προκαλέσει συστηματικές μολύνσεις προκαλώντας χρόνια συμπτώματα, όπως η αρθρίτιδα.

2.2.8 Πρόληψη:

Ο εντερικός πυρετός προκαλείται κυρίως από την κατανάλωση επιμολυσμένου φαγητού ή νερού. Ιστορικά, στις ΗΠΑ και στη Δυτική Ευρώπη, υπήρξαν πολλές επιδημίες εντερικού πυρετού στο παρελθόν. Όμως τα περιστατικά μόλυνσης από *Salmonella* μειώθηκαν σημαντικά με την ανάπτυξη των παραεντερικών εμβολίων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται το τυφοειδές εμβόλιο, που παράγεται από κύτταρα του μικροοργανισμού αποδυναμωμένα με φαινόλη, ή θέρμανση. (Montville & Matthews, 2010) Η πρόοδος των πρακτικών υγιεινής, στις εγκαταστάσεις τροφίμων με την χρήση της παστερίωσης στο γάλα και τα υπόλοιπα

γαλακτοκομικά προϊόντα, την πρόσβαση σε πόσιμο νερό, τη σωστή απολύμανση, είναι τα κυρίαρχα προληπτικά μέτρα ενάντια στον εντερικό πυρετό (Eng et al. 2015). Αυτό έχει επιτευχθεί στις ανεπτυγμένες χώρες, αλλά όχι στις αναπτυσσόμενες (White et al. 2002). Η σωστή μεταχείριση και το μαγείρεμα του φαγητού είναι επίσης σημαντικά μέτρα πρόληψης.

2.3 *Campylobacter*:



Σχήμα 12: Περίπτωση καμπυλοβακτηρίωσης

2.3.1 Χαρακτηριστικά του οργανισμού:

Το *Campylobacter* είναι το πιο αντιπροσωπευτικό είδος, μέσα στην οικογένεια *Campylobacteriaceae*. Είναι gram αρνητικά, σχήματος S, ραβδόμορφα, μη σπορογόνα βακτήρια. Τα διάφορα είδη είναι μικροαερόφιλα. Το *Campylobacter* είναι φυσική μικροχλωρίδα, του εντερικού σωλήνα των κοτόπουλων (Quinn et al. 2007).

C.Jejuni και *C.coli*:

Τα *C.Jejuni* και *C.coli* είναι τα πιο συνηθισμένα είδη του *Campylobacter* που σχετίζονται με διάρροια.

2.3.2 Ευαισθησία:

Ο οργανισμός, είναι ευαίσθητος σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και σε χαμηλό pH. Θανατώνεται σε pH 2,3. Επίσης, παραμένει ζωντανός και αναπτύσσεται σε χολικά άλατα στους 37°C.

2.3.3 Παθογένεια:

Τα συμπτώματα της μόλυνσης από *C.Jejuni* και *C.coli* είναι ο πυρετός και η διάρροια, επίσης μπορεί να προκύψει βακτηραιμία και μολύνσεις στο ουροποιητικό. Σπάνια αναφέρονται θάνατοι που μπορεί να προκύψουν από το *C.Jejuni*. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των λοιμώξεων από *Campylobacter*, είναι ότι σχετίζονται με την κατανάλωση κοτόπουλου που δεν έχει μαγειρευτεί επαρκώς (Quinn et al. 2007)

2.3.4 Ανθεκτικότητα:

Το *Campylobacter* μπορεί να μεταδοθεί από τα ζώα στον άνθρωπο. Γι αυτό η ανάπτυξη αντιβιοτικής αντοχής ανάμεσα στα στελέχη του *Campylobacter* spp., εξαιτίας της χορήγησης αντιβιοτικών στα κοτόπουλα, είναι ένα θέμα που έχει προκαλέσει ανησυχία. Ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών του *C. jejuni* συνεχώς αυξάνεται και κάνει πολύ δύσκολη την αντιμετώπιση της λοίμωξης. Οι περιπτώσεις της βακτηραιμίας που προκαλεί κάνουν τη θεραπεία πολύ δύσκολη.

2.3.4.1 Ανθεκτικότητα στις φλουοροκινολόνες:

Το *Campylobacter* εμφανίζεται ανθεκτικό στις φλουοροκινολόνες και στις μακρολίδες που είναι τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της γαστρεντερικών λοιμώξεων. Έρευνες πάνω στην ευαισθησία του, επιβεβαιώνουν επίσης, ότι η ανθεκτικότητα στο ciprofloxacin αυξάνεται ραγδαία.(White et al. 2002). Τα ποσοστά ανθεκτικών στελεχών στις φλουοροκινολόνες, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες που έγιναν στην Ταϊβάν,Ταϊλάνδη και Ισπανία έχουν ανέβει στο 90%. Αυτά τα ποσοστά δείχνουν πως η θεραπεία με φλουοροκινολόνες στα έθνη αυτά, πλέον δεν είναι επαρκής. Αν και σε άλλες χώρες τα ποσοστά εμφανίζονται πιο χαμηλά, γύρω στο 45%, έρευνες δείχνουν πως η ανθεκτικότητα αυξάνεται. Η τόσο δραματική αύξηση της ανθεκτικότητας στις φλουοροκινολόνες έχει να κάνει με την ευρεία χρήση τους ως κτηνιατρικά φάρμακα. Έχουν απομονωθεί στελέχη του *Campylobacter*, ανθεκτικά στις φλουοροκινολόνες από ασθενείς, που είναι πανομοιότυπα με στελέχη που βρέθηκαν σε ορνιθοτροφεία της Μινεσότα ως αποτέλεσμα της παρατεταμένης χρήσης φλουοροκινολών. (Quinn et al. 2007)

2.3.4.2 Ανθεκτικότητα στις μακρολίδες:

Μέχρι το 1990, παρατηρήθηκε μια μεγάλη αύξηση στην παρουσία ανθεκτικών στελεχών *Campylobacter* στις μακρολίδες, που απομονώθηκαν από ασθενείς. Η ευρεία χρήση των

μακρολίδων στην κτηνιατρική φαίνεται να έχει επηρεάσει την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού. Η ανθεκτικότητα στις μακρολίδες μπορεί επίσης να αναπτυχθεί με την αντιβιοτική θεραπεία σε ανθρώπους, όμως τέτοια περιστατικά έχουν σπάνια αναφερθεί. Αν και τα ποσοστά ανθεκτικότητας στις μακρολίδες παραμένουν σταθερά ή σχετικά χαμηλά, σε μερικές χώρες όπως η Ιαπωνία, η Σουηδία, η Φινλανδία και κάποια μέρη του Καναδά, δεν ισχύει το ίδιο για άλλες χώρες του κόσμου όπου παρατηρείται αυξητική τάση. Ευτυχώς η παρουσία του ανθεκτικού *C. jejuni* στην ερυθρομυκίνη έχει παραμείνει σε χαμηλά ποσοστά, περίπου κάτω από το 12% . Αντίθετα, το είδος *C. coli* εμφανίζει πολύ υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας (πάνω από 70%) και είναι υπεύθυνο για το 10% των μολύνσεων σε ανθρώπους. Ομοίως, στα κρεατοπαραγωγικά ζώα, η παρουσία ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη εμφανίζεται υψηλότερη στο είδος *C. coli* από ότι στο *C. jejuni*. Συγκεκριμένα, υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στις μακρολίδες βρέθηκαν σε στελέχη *C.coli* που πάρθηκαν από χοίρους και προφανώς είναι η επίπτωση της αλόγιστης χρήσης τους στη βιομηχανία χοίρων. Ως εκ τούτου οι χοίροι μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή μόλυνσης ανθεκτικών στελεχών *C. coli* στην ερυθρομυκίνη. Παγκοσμίως, τα πολυανθεκτικά στελέχη του *Campylobacter* έχουν προκαλέσει ανησυχία. Η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν ορισμένα στελέχη στις μακρολίδες αλλά και στις φλουοροκινολόνες, είναι αρκετά επικίνδυνη, γιατί αυτά είναι τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως πρώτη επιλογή για τη θεραπεία της καμπυλοβακτηρίωσης. Ως εναλλακτική θεραπεία χρησιμοποιούνται οι τετρακυκλίνες, που όμως λόγω της χρήσης τους ως αυξητικοί παράγοντες στην κτηνοτροφία για πολλές δεκαετίες τώρα, αλλά και για πρόληψη των μολύνσεων, η επιλογή τους είναι πλέον μάλλον ακατάλληλη. Σε πιο σοβαρές περιπτώσεις λοιμώξεων, όπως η βακτηραιμία, προτείνεται ως έσχατη λύση, η ενδοφλέβια χορήγηση αμινογλυκοσιδών. Ευτυχώς όμως, η οικογένεια των *Campylobacter spp.* παραμένει ακόμη σχετικά ευπαθής στη χλωραμφενικόλη και την κλινδαμυκίνη (Quinn et al. 2007)

2.3.4.3 Ο ρόλος των πρωτεϊνικών αντλιών στην ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά του *Campylobacter*:

Η πρωτεϊνική αντλία *CmeABC*:

Το 2002, ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά η πρωτεϊνική αντλία efflux *CmeABC* από το *C.jejuni*. Το efflux σύστημα *CmeABC*, αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, την *CmeB*, που είναι μία πρωτεϊνική αντλία ενεργειακά ανεξάρτητη, την *CmeC*, που συνθέτει τα κανάλια της εξωτερικής μεμβράνης και την *CmeA*, την πρωτεΐνη πρόσδεσης. Η *CmeB* λειτουργεί μαζί με την *CmeA* και *C*, σαν ένα σύμπλοκο. Μέχρι σήμερα ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχουν συνδέσει το ρόλο της αντλίας *CmeABC*, με την ανθεκτικότητα στις φλουοροκινολόνες και τις μακρολίδες, αλλά και με τα πολυανθεκτικά στελέχη του *Campylobacter*. Αν και έχουν ταυτοποιηθεί και άλλες πρωτεϊνικές αντλίες, όπως για παράδειγμα η *CmeDEF*, φαίνεται πως δεν συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα του *Campylobacter* στην ερυθρομυκίνη, τη χλωραμφενικόλη και τις τετρακυκλίνες (Quinn et al. 2007). Παρόλα αυτά, υπάρχουν πρόσφατες ενδείξεις ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αντλιών, *CmeDEF* και *CmeABC*, είναι που προσφέρει ανθεκτικότητα στο ciprofloxacin και στις τετρακυκλίνες σε πολλά στελέχη. Η αλληλεπίδραση των efflux pumps παίζει σημαντικό ρόλο στον τρόπο που αποκτούν ανθεκτικότητα τα βακτήρια και είναι ένα φαινόμενο που πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο.

Ο ρόλος των πρωτεϊνικών αντλιών στη χοληφόρο των πτηνών:

Τα κοτόπουλα είναι φυσικοί φορείς του *C. jejuni*. Το οποίο αποικεί κυρίως τα κατώτερα μέρη του εντερικού σωλήνα τους. Αντίθετα, για τα θηλαστικά αποτελεί παθογόνο, που προκαλεί την καμπυλοβακτηρίωση. Για να επιβιώσει μέσα στον ξενιστή, το *Campylobacter* και άλλα εντεροβακτήρια πρέπει να αντισταθούν σε πάρα πολλά εμπόδια του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως την αντιμικροβιακή δράση της χολής και διαφόρων πεπτιδίων, την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα και την επίθεση του ανοσοποιητικού. Η χολή που παράγεται στο συκώτι, συνίσταται κυρίως από χολικά άλατα και σε μικρότερο βαθμό από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. Εκτός από το να βοηθούν στο μεταβολισμό και την απορρόφηση των λιπιδίων τα χολικά άλατα λειτουργούν και ως αντιμικροβιακοί παράγοντες με το να αποδομούν τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηρίων. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα άλατα της χολής διαπερνούν κατευθείαν την κυτταρική μεμβράνη, προκαλώντας τη λύση τους. Επομένως, η επιβίωση των εντεροβακτηρίων μέσα στον εντερικό σωλήνα, επέφερε την

εξέλιξη πολλών μηχανισμών άμυνας αυτών, κατά των αλάτων της χολής. Ενας εξ αυτών, είναι και οι πρωτεϊνικές αντλίες efflux, που παράγουν υδρολάσες των χολικών αλάτων. Μέχρι σήμερα, ο γνωστότερος μηχανισμός της ανθεκτικότητας των *Campylobacter* στα χολικά άλατα είναι οι αντλίες efflux. Η αντλία *CmeABC* είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του *Campylobacter* στον εντερικό σωλήνα των κοτόπουλων. Φαίνεται πως η *CmeABC* και η *CmeDEF* αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να διατηρήσουν τη βιωσιμότητα του *Campylobacter*, τουλάχιστον μία από τις δυο χρειάζεται για τη βέλτιστη ανάπτυξή του και είναι ένα σημαντικό κομμάτι στη φυσιολογία του *Campylobacter* (Quinn et al. 2007).

Μια μελλοντική πιθανότητα δημιουργίας efflux pump αναστολέων, για τον έλεγχο της καμπυλοβακτηρίωσης:

Η συνεργιστική δράση διαφόρων αντλιών efflux, για την επίτευξη ανθεκτικότητας σε διάφορα είδη αντιβιοτικών, αλλά και για την υψηλή προσαρμοστικότητα σε διάφορα περιβάλλοντα είναι ένα πεδίο που δεν έχει διερευνηθεί ακόμα επαρκώς. Όμως η συνεισφορά της αντλίας *CmeABC*, στην αντιβιοαντοχή του *Campylobacter*, είναι πλέον γνωστή (Quinn et al. 2007). Επομένως, η συγκεκριμένη αντλία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως στόχος για την καταπολέμηση των λοιμώξεων από *Campylobacter*. Μια ενδεχομένως λειτουργική εφαρμογή, θα ήταν η δημιουργία αναστολέων, ικανών να αναστείλουν τη λειτουργία της αντλίας *CmeABC* και να ανατραπεί με αυτό τον τρόπο η ανθεκτικότητα στις φλουροκινολόνες, μακρολίδες και πιθανόν στις τετρακυκλίνες. Μια πολύ ελπιδοφόρα πιθανότητα, θα ήταν η χορήγηση των αναστολέων της *CmeABC*, μέσω των ζωοτροφών στην βιομηχανία πουλερικών, σαν μέθοδος πρόληψης ή και ελάττωσης της παρουσίας του *Campylobacter* (Quinn et al. 2007). Τέλος, η αποσαφήνιση της δομής και λειτουργίας των υπολοίπων αντλιών efflux που εμφανίζονται στο *Campylobacter*, μπορεί στο μέλλον να καθορίσει την προσέγγιση της θεραπείας της καμπυλοβακτηρίωσης.

2.4 *Yersinia*:



www.shutterstock.com · 1774540772

Σχήμα 13: Το βακτήριο της πανούκλας, η *Yersinia pestis*, σε 3D απεικόνιση, που δείχνει τη δομή του κυττάρου με το χρωμοσωμικό DNA, τα πλασμίδια και τα ριβοσώματα.

Η *Yersinia* ανήκει στην Οικογένεια *Yersiniaceae*. Είναι ένας gram αρνητικός, προαιρετικά αναερόβιος βάκιλος.

2.4.1 Τα είδη της *Yersinia*:

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 11 είδη της *Yersinia* και κατατάσσεται στην Οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Τα είδη της *Yersinia* είναι gram αρνητικοί, ραβδοειδείς, προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Εκ των 11 ειδών, τρία έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνα.

Η *Y. pestis*, η *Y. enterocolitica* και *Y. pseudotuberculosis*. Η *Y. pestis*, είναι το αίτιο της πανούκλας. Μάλιστα, μετά από γενετική ανάλυση, αποκαλύφθηκε πως είναι κλώνος της *Y. pseudotuberculosis* και ότι εξελίχθηκε λίγο πριν την πρώτη γνωστή πανδημία ανθρώπινης πανούκλας. Η *Y. pseudotuberculosis*, είναι ένα παθογόνο των τρωκτικών το οποίο προκαλεί περιστασιακά ασθένεια στον άνθρωπο. Η *Y. enterocolitica*, έχει προκαλέσει μεγάλα κρούσματα τροφιμογενών ασθενειών (Montville & Matthews, 2010).

***Yersinia enterocolitica*:**

Η *Y. enterocolitica* έχει απομονωθεί από πολλούς τύπους κλινικών και μη δειγμάτων παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένης της Ευρώπης, της Σκανδιναβίας και του Καναδά. Πρωτοεμφανίστηκε ως παθογόνο του ανθρώπου το 1982, με μια μεγάλη επιδημία με τουλάχιστον 170 περιστατικά, όπου νόσησαν παιδιά κάτω των 5 ετών. Όλοι οι ασθενείς είχαν καταναλώσει παστεριωμένο γάλα μιας συγκεκριμένης εταιρείας. Το στέλεχος της *Yersinia enterocolitica* που απομονώθηκε από τους ασθενείς, δεν βρέθηκε στο γάλα, αλλά σε ένα καφάσι με γάλατα σε φάρμα χοίρων, όπου ληγμένες παρτίδες γάλακτος ταΐζονταν στους

χοίρους. Είναι πιθανό, η απουσία εξυγιάνσης των καφασιών να ήρθε σε επαφή με τις χάρτινες συσκευασίες του γάλακτος που προοριζόταν για τους καταναλωτές. (Montville & Matthews, 2010).

Ταξινόμηση:

Τα περισσότερα στελέχη της *Yersinia* κατηγοριοποιούνται οροτυπικά σε πάνω από 50 ορότυπους σύμφωνα με το σωματικό τους αντιγόνο O. Πολύ λίγοι ορότυποι όμως, είναι αυτοί που προκαλούν εντερικές λοιμώξεις για να θεωρηθούν παθογόνα.

Επίσης μια ακόμα μέθοδος ταξινόμησης των μικροοργανισμών είναι σε βιοποικιλίες. (1A, 1B, 2, 3, 4 κλπ). Δεν κατανέμονται σε μια βιοποικιλία όλα τα στελέχη της *Y. enterocolitica*. Κάποια στελέχη της (βιοποικιλία 1A), δεν διαθέτουν μολυσματικούς παράγοντες όπως οι τύποι της βιοποικιλίας 1B. Η οροομάδα O:3 της βιοποικιλίας 4, είναι αυτή που απομονώνεται πιο συχνά από τους ανθρώπους. Άλλες, είναι η O:9 (βιοποικιλία 2), και η O:5, 27 έχουν βρεθεί κυρίως στη Βόρεια Ευρώπη. Στις ΗΠΑ, οι εξάρσεις της *Y. enterocolitica* έχουν συσχετιστεί με τους ορότυπους O:8, O13:a, 13b και O:3 και τον O:1,2,3. Επίσης η *Y. enterocolitica* διακρίνεται σύμφωνα με το αντιγόνο του μαστιγίου της, (H αντιγόνα) και έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 18 τέτοια αντιγόνα. Ένας άλλος τρόπος υποδιαίρεσης των ειδών της *Yersinia* περιλαμβάνουν την αποτύπωση με τη χρήση βακτηριοφάγων. (White et al. 2002)

2.4.2 Πηγές:

Η *Yersinia enterocolitica*, εμφανίζεται συχνά στο έδαφος και σε υδάτινα συστήματα όπως λίμνες, ποτάμια, πηγάδια και νερά πηγών όπου μπορεί να επιβιώνει για παρατεταμένες χρονικές περιόδους, ιδιαίτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Πολλοί οργανισμοί *Yersinia enterocolitica* όμως, που απομονώθηκαν από το περιβάλλον δεν αποτελούν απειλή για την υγεία του ανθρώπου. Επίσης έχει ανακτηθεί από μια ποικιλία άγριων και κατοικίδιων ζώων αλλά οι χοίροι είναι το μοναδικό ζωικό είδος από το οποίο έχει απομονωθεί η *Yersinia enterocolitica* της βιοποικιλίας 4, του οροτύπου O:3, η ποικιλία που σχετίζεται συχνότερα από κάθε άλλη με την ανθρώπινη ασθένεια. Σε χώρες με υψηλά ποσοστά γερσινίωσης, η απομονώνεται συχνά από σφαγεία χοίρων (Montville & Matthews, 2010).

2.4.3 Παθογένεια:

Η *Y. enterocolitica* προκαλεί διαφόρων ειδών ασθένειες κυρίως στις νεαρές ηλικίες και είναι επίσης υπεύθυνη για διάφορες επιπλοκές μετά τη μόλυνση. Είναι ένα εντερικό παθογόνο.

Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς που υποφέρουν από υπερπρόσληψη σιδήρου, έχουν αυξημένη

ευαισθησία σε μολύνσεις από *Yersinia enterocolitica*. Η διαθεσιμότητα του σιδήρου στους ιστούς, ίσως να καθορίζει το αποτέλεσμα της γερσινίωσης. Η μόλυνση εκδηλώνεται ως διάρροια, αλλά μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως αυτοάνοση αρθρίτιδα και ασθένειες του θυρεοειδή.

2.4.4 Ευαισθησία και αντοχή σε φυσικοχημικούς παράγοντες:

Η *Y. enterocolitica*, μπορεί να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 4°C και να επιβιώνει σε κατεψυγμένα τρόφιμα. Γενικά, αναπτύσσεται καλύτερα σε θερμοκρασίες δωματίου και ψύξης. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της είναι ότι αναπτύσσεται πολύ περισσότερο σε μαγειρεμένα τρόφιμα απ ότι σε ωμά, μάλλον λόγω της διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών. Είναι ευαίσθητη στη θέρμανση και θανατώνεται εύκολα με παστερίωση (πχ στους 62,8°C για μισή ώρα). Επίσης είναι ευαίσθητη σε οργανικά οξέα όπως το κιτρικό και το γαλακτικό. Η προσθήκη νιτρικών αλάτων στα τρόφιμα μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εμπόδιο για την ανάπτυξη της (Montville & Matthews, 2010).

2.4.5 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά β-λακτάμης:

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά β-λακτάμης της *Y. enterocolitica*, οφείλεται στην παραγωγή δυο λακταμασών, οι λακταμάσες Α και Β. Ο τύπος της Α-λακταμάσης, υδρολύει μια μεγάλη ποικιλία πενικιλινών και κεφαλοσπορινών, ενώ ο τύπος της Β-λακταμάσης διαθέτει περισσότερες ενεργές κεφαλοσπορινάσες. Αυτές οι δυο λακταμάσες δρουν συνεργιστικά, για την επίτευξη ανθεκτικότητας σε ένα πλήθος λακταμικών αντιβιοτικών. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η *Yersinia* παραμένει ευπαθής στη τετρακυκλίνη και στις κινολόνες.

Τα στελέχη της ομάδας 1B (serogroup O:8), είναι ανθεκτικά σε διαφορετικά αντιβιοτικά από τα στελέχη της ομάδας 1A. Εμφανίζονται όμως ευπαθή στην αμικιλίνη, ενώ τα στελέχη της ομάδας 1A είναι ανθεκτικά στην αμοξυκιλλίνη και το κλαβουλανικό οξύ. Η ομάδα 3, δηλαδή οι ορότυποι (O:1,2,3 and O:5,27), δείχνουν ανθεκτικά στην αμοξυκιλλίνη και κλαβουλανικό οξύ.

2.4.6 Εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών:

Μια έρευνα που έγινε στην Ισπανία συνέκρινε την αντιβιοτική αντοχή της *Y. enterocolitica* του ορότυπου O:3 (biotype 4) μεταξύ του έτους 1985 με 1987 και 1995 με 1998. Τα 75 στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν από το 1985 ως το 1987 βρέθηκαν ανθεκτικά στην αμικιλίνη και το 72% αυτών, στη στρεπτομυκίνη, το 45% αυτών στις σουλφοναμίδες, το

28% στη σουλφαμεθοξαζόλη, και το 20% ήταν ανθεκτικά στη χλωραμφενικόλη. Από το 1995 ως το 1998, μερικά στελέχη της *Y. enterocolitica* παρουσίασαν αυξημένα ποσοστά αντοχής στη στρεπτομυκίνη (90%), στην σουλφαμεθοξαζόλη (70%), στη χλωραμφενικόλη (60%) και στο ναλιδιζικό οξύ (5%). Η συνεχής αύξουσα αντιβιοτική αντοχή αυτού του παθογόνου, είναι ένα κρίσιμο πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων και πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο ο τρόπος με τον οποίο μεταφέρεται από το περιβάλλον στον άνθρωπο (White et al. 2002).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Listeria monocytogenes



www.shutterstock.com · 400088728

Σχήμα 14: Απεικόνιση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*, το gram-θετικό βακτήριο, που προκαλεί τη λιστερίωση.

3.1 Χαρακτηριστικά της *Listeria*:

Η *Listeria* είναι ένα Gram θετικό, μικροαερόφιλο, μη σπορογόνο, ραβδόμορφο βακτήριο.

Το γένος *Listeria* αποτελείται από 17 είδη, εκ των οποίων έξι είναι τα πιάο γνωστά: η *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* και η *Listeria grayi*. Από αυτά μόνο η *Listeria monocytogenes* και η *Listeria ivanovii* είναι παθογόνα, το πρώτο είναι παθογόνο του ανθρώπου και το δεύτερο κυρίως των ζώων.

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα τροφιμογενές βακτήριο που μπορεί να βρεθεί στο νερό, στο χώμα, στα τρόφιμα, σε ανθρώπους και σε ζώα. Η ασθένεια που προκαλεί η *L. monocytogenes* ονομάζεται λιστερίωση και συμβαίνει συνήθως από την κατανάλωση επιμολυσμένου φαγητού. Η πηγή της λοίμωξης είναι δύσκολο να ανιχνευθεί, λόγω των μεγάλων χρόνων επώασης του βακτηρίου μέσα στον οργανισμό, που φτάνει και τις 5

εβδομάδες. Ωστόσο, η συσχέτιση της *Listeria monocytogenes* με πολλά περιστατικά τροφιογενών κρουσμάτων, υποδηλώνει ότι κατά κύριο λόγο, τα μολυσμένα τρόφιμα είναι η πρωταρχική πηγή. Υπολογίζεται ότι πάνω από 1600 άνθρωποι μολύνονται το χρόνο, με 260 θανάτους στις ΗΠΑ. Τα περιστατικά εμφανίζουν εποχικό χαρακτήρα, με τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από τον Ιούλη ως τον Οκτώβρη (White et al. 2002).

3.1.1 Η υψηλή προσαρμοστικότητα της *L. monocytogenes*:

Το συγκεκριμένο βακτήριο έχει βρεθεί στο χώμα, στο νερό, σε προϊόντα τροφίμων, στο ωμό κρέας, ψάρια, λαχανικά, φαγητά έτοιμα προς κατανάλωση, επεξεργασμένα τρόφιμα, καθώς και σε κλινικές και νοσοκομειακές εγκαταστάσεις. Αυτό, οφείλεται στην ικανότητα που έχει το συγκεκριμένο παθογόνο να επιβιώνει και να αναπτύσσεται σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η *Listeria* μπορεί εύκολα να αναπτυχθεί σε πολλούς τύπους τροφίμων που διατηρούνται στο ψυγείο. Επίσης, μπορεί να προσαρμοστεί στις συνθήκες του εντέρου, δηλαδή την υψηλή οξύτητα, την έλλειψη οξυγόνου και τις αντιμικροβιακές δράσεις διαφόρων ουσιών της χοληφόρου. Έχει διαπιστωθεί πως η *Listeria* έχει μια μεγάλη ικανότητα να επιβιώνει στα διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα του γαστρεντερικού συστήματος. Η *Listeria*, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα τροφογενή παθογόνα, που εκκρίνουν τοξίνες και πολλαπλασιάζονται μέσα στο αίμα, έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Η μετάδοσή της από κύτταρο σε κύτταρο, την καθιστά ασφαλή από τις αντιμικροβιακές ουσίες και τα αντισώματα που κυκλοφορούν μέσα στο αίμα.

3.1.2 Ευαισθησία - Ανθεκτικότητα της *Listeria monocytogenes* σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες:

Η ανάπτυξη και επιβίωση της *L. monocytogenes* εξαρτάται κυρίως, από τις φυσικοχημικές συνθήκες του περιβάλλοντος.

3.1.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας:

Η *Listeria monocytogenes*, ως ψυχρότροφο βακτήριο, αναπτύσσεται καλά σε θερμοκρασίες 0-45°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής της είναι οι 37°C, αλλά μπορεί να επιβιώσει σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50°C θανατώνεται, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες πχ στους 4°C, αναπτύσσεται με πολύ αργό ρυθμό.

Η ιδανική ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρατηρείται μέσα στο εύρος των 30-37°C. Η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στην κατάψυξη, όμως αυτό εξαρτάται από το είδος του τροφίμου και το ρυθμό κατάψυξης. Στους οικιακούς καταψύκτες που ο ρυθμός κατάψυξης είναι αργός, και εάν το προς κατάψυξη τρόφιμο είναι ήδη επιμολυσμένο, η επικινδυνότητα είναι μεγάλη (Montville & Matthews, 2010).

3.1.2.2 Επίδραση του pH:

Το βακτήριο εμφανίζει καλή ανάπτυξη ακόμα και σε όξινα pH (τιμές μέχρι και 4,4), ενώ σε τιμές pH μικρότερες του 4,3, τα κύτταρα δεν αναπτύσσονται, αλλά επιβιώνουν. Η ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* παρεμποδίζεται από τη δράση οργανικών οξέων, ακόμα και σε ποσοστό 0,1%. Το είδος του οργανικού οξέος όμως, φαίνεται να επηρεάζει κατα πολύ την συμπεριφορά της. Συγκεκριμένα, το βακτήριο έχει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο κιτρικό και το γαλακτικό, σε σχέση με το οξικό, στο οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία. Το πιο αβλαβές οξύ για το βακτήριο είναι το υδροχλωρικό (HCl) (Montville & Matthews, 2010). Επομένως, η ικανότητα του βακτηρίου να αναπτύσσεται σε τιμές χαμηλού pH, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του οξινιστικού.

3.1.2.3 Επίδραση της ενεργότητας νερού (aw):

Όσον αφορά στην ενεργότητα νερού (aw), η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται καλύτερα σε $aw \geq 0,97$, ενώ για τιμές μικρότερες από 0,90 δεν εμφανίζει ανάπτυξη. Ωστόσο, σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας νερού μέχρι και 0,83, το βακτήριο δεν αναπτύσσεται, αλλά μπορεί και επιβιώνει (Montville & Matthews, 2010).

3.1.2.4 Επίδραση της συγκέντρωσης αλάτων:

Η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται άνετα σε μέτριες συγκεντρώσεις αλάτων δηλαδή 6,5% σε NaCl. Μπορεί να αναπτυχθεί ακόμα και σε 12% περιεκτικότητα σε NaCl. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα (Montville & Matthews, 2010).

3.1.2.5 Συνεργιστική δράση φυσικοχημικών παραγόντων:

Εντούτοις, η συμπεριφορά του μικροοργανισμού είναι πιο πολύπλοκη όταν οι παράγοντες αυτοί δρουν σε συνδυασμό. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της *L. monocytogenes* είναι ότι η θερμοανθεκτικότητα της αυξάνεται με την μείωση της aw. Αυτό δημιουργεί προβλήματα, σε τρόφιμα που απαιτούν χαμηλή ενεργότητα νερού και θερμικούς χειρισμούς για τη διατήρηση

της ασφάλειας. Επίσης εάν η υψηλή αλατοπεριεκτικότητα συνδυαστεί με χαμηλή θερμοκρασία, η επιβίωση της *L. monocytogenes* αυξάνεται. Γι αυτό και τα αλλαντικά όπως το ζαμπόν, τα χοτ ντογκ και τα λουκάνικα είναι τρόφιμα υψηλής επικινδυνότητας όσον αφορά στο συγκεκριμένο βακτήριο (Montville & Matthews, 2010).

3.2 Διατροφικές απαιτήσεις της *L. monocytogenes*:

Η *Listeria monocytogenes* είναι αερόβιο, μικροαερόφιλο, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, που για να αναπτυχθεί, μέσα σ ένα υπόστρωμα, πρέπει να ξεπεράσει ορισμένα εμπόδια, όπως οι μεταβολές του pH, της ενεργότητας του νερού και να ανταγωνιστεί άλλους μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε αυτό. Η *Listeria monocytogenes* παρουσιάζει αυξημένους ρυθμούς ανάπτυξης υπό την παρουσία σακχάρων και ιδιαίτερα της γλυκόζης. Τα μεταβολικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου όμως, μπορεί να διαφέρουν κατά τη διάρκεια αερόβιων, χαμηλών σε O₂ ή αναερόβιων συνθηκών (Montville & Matthews, 2010). Έχουν διαμορφωθεί αρκετοί τύποι υποστρωμάτων που υποστηρίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, ωστόσο κανένας δεν είναι ικανός να υποστηρίξει την ανάπτυξη όλων των στελεχών του βακτηρίου. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι οι ανάγκες του μικροοργανισμού σε θρεπτικά μέσα (όπως αμινοξέα και βιταμίνες) διαφέρουν ανάλογα με το στέλεχος και τη γενετική ποικιλομορφία του (Κατσιμιλή 2021). Στα τρόφιμα, η ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, δεν εξαρτάται μόνο από τη σύσταση των θρεπτικών τους συστατικών, αλλά έχει να κάνει και με τις δομικές του ιδιότητες και κυρίως τη κατανομή του νερού μέσα στη μάζα του (Πρίντζη, 2013).

3.2.1 Μεταβολισμός υδατανθράκων:

Η *L. monocytogenes* χρησιμοποιεί κυρίως τη γλυκόζη ως πηγή υδατανθράκων για παροχή ενέργειας. Είναι ζυμωτικό βακτήριο και χρησιμοποιεί σάκχαρα για την παραγωγή ενέργειας. Μελέτες έδειξαν, ότι η *L. monocytogenes* αναπτύχθηκε στη γλυκόζη και παρήγαγε γαλακτικό ή/και οξικό οξύ υπό αερόβιες συνθήκες με μεγάλους ρυθμούς ανάπτυξης, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες παρήγαγε μόνο γαλακτικό οξύ και είχε πολύ μικρότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Την σύνθεση ATP, φαίνεται να εμποδίζουν οι βακτηριοσίνες, όπως η νισίνη και η πεδιοκίνη, δυσχεραίνοντας επομένως και την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Κατσιμιλή 2021).

3.2.2 Μεταβολισμός αμινοξέων και πεπτιδίων:

Τα αμινοξέα και οι απαιτήσεις αζώτου για την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* ποικίλουν

ανάλογα με το στέλεχος. Ενώ το ίδιο το βακτήριο δεν είναι σε θέση να υδρολύει πρωτεΐνες, φαίνεται να μπορεί να αναπτυχθεί μέσω εξωτερικών πρωτεολυτικών συστημάτων, δηλαδή σε περιβάλλοντα όπου οι πρωτεΐνες υδρολύονται από άλλους μικροοργανισμούς. Άλλη μελέτη έδειξε ωστόσο, ότι η *L. monocytogenes*, μπορεί να χρησιμοποιήσει ενδοκυτταρικά πεπτίδια του ξενιστή ως πηγή αμινοξέων. (Κατσιμιλή 2021).

3.2.3 Μεταβολισμός σιδήρου (Fe):

Η *L. monocytogenes*, όπως και τα περισσότερα βακτήρια, χρειάζονται σίδηρο για ανάπτυξη και επιβίωση. Ενώ ο σίδηρος στα σωματικά υγρά του ανθρώπου και των ζώων είναι άφθονος, η ποσότητα που είναι άμεσα διαθέσιμη για τα βακτήρια είναι πολύ μικρή. Έτσι, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει συστήματα πρόσληψης του σιδήρου από τους οργανισμούς. Συμπερασματικά, η ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, φαίνεται να σχετίζεται με τη διαθεσιμότητα του σιδήρου αυτό το γεγονός μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και πρόοδο της λιστερίωσης (Κατσιμιλή 2021).

3.3 Πηγές της *Listeria monocytogenes*:

3.3.1 Περιβάλλον:

Η *Listeria monocytogenes* βρίσκεται παντού στο περιβάλλον. Έχει απομονωθεί από το έδαφος, το νερό και από βλάστηση που αποσυντίθεται, με πιο συχνά εμφανιζόμενους τους ορότυπους 1/2b και 4b.(White et al. 2002). Έχει εντοπιστεί επίσης σε δείγματα λυμάτων, υδάτων ποταμού και λάσπης. Η χρήση περιττωμάτων ως γεωργικά λιπάσματα μπορεί να συμβάλλει στην μετάδοση της *Listeria monocytogenes*, από τα φρούτα και λαχανικά της πρωτογενούς παραγωγής στον καταναλωτή.

3.3.2 Ζώα:

Στα θηλαστικά, το βακτήριο προκαλεί μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και αμβλώσεις. Τα υγιή ζώα μπορούν να είναι γαστρεντερικοί φορείς της *Listeria monocytogenes*. Ο μικροοργανισμός έχει βρεθεί σε βοοειδή, χοίρους, πρόβατα, κοτόπουλα, γαλοπούλες, πάπιες και διάφορα άλλα είδη.(White et al. 2002) Η λιστερίωση θεωρούνταν κτηνιατρική ασθένεια και ως βακτήριο που προκαλούσε λοιμώξεις σε κουνέλια και σε αγέλες βοοειδών και προβάτων, πολύ πριν αναγνωριστεί η ασθένεια στους ανθρώπους. Επικρατούσε για πολλά χρόνια η ιδέα πως η ανθρώπινη λοίμωξη από το βακτήριο οφειλόταν σε επαφή με μολυσμένα ζώα. Ωστόσο, μετά

από απομονώσεις του μικροοργανισμού από πηγές ανεξάρτητες των ζώων (έδαφος, τρόφιμα) και μετά από επιδημιολογικά στοιχεία, επιβεβαιώθηκε ότι η λιστερίωση αποτελεί τροφική ασθένεια (Κατσιμιλή 2021).

3.3.3 Άνθρωποι:

Οι άνθρωποι μπορούν να είναι τόσο δέκτες, όσο και φορείς του βακτηρίου. Έχουν αναφερθεί απομονώσεις της *Listeria monocytogenes* από καλλιέργειες κοπράνων υγιών εργαζομένων σε σφαγεία, ασθενών που νοσηλεύονταν σε νοσοκομείο, ασθενών με διάρροια και ασθενών με λιστερίωση σε οικιακό περιβάλλον. Φαίνεται πως η *L.monocytogenes*, εξαπλώνεται από το περιβάλλον, στα ζώα και τους ανθρώπους και επιστρέφει πάλι στο περιβάλλον (Montville & Matthews, 2010).

3.3.4 Εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων:

Το βακτήριο της *L.monocytogenes*, είναι ικανό να παραμείνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων και να επαναμολώνει το ωμό γάλα. Το βακτήριο έχει βρεθεί και σε ωμά πουλερικά, αλλά και στο περιβάλλον επεξεργασίας μαγειρεμένων πουλερικών, όπου η *Listeria monocytogenes* επιβίωσε για 6 μήνες. Η παρουσία του μικροοργανισμού έχει αναφερθεί σε ποικιλία εργοστασίων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χειρίζονται κρέας, ψάρια, γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση. Η *Listeria monocytogenes* μπορεί να εισέλθει στα εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων και μέσω ανθρώπινων φορέων. Συγκεκριμένα, έχει δυνατότητα να προσκολληθεί στην ενδυμασία, τα παπούτσια και τα χέρια των εργατών που χειρίζονται τον εξοπλισμό, αλλά και μέσω των οχημάτων που μεταφέρουν προϊόντα εντός του εργοστασίου. Προσκολλάται σε επιφάνειες όπως το λάστιχο, το γυαλί και το ανοξείδωτο ατσάλι, παραμένοντας εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα (Montville & Matthews, 2010). Επίσης, η επιμόλυνση των τροφίμων μπορεί να γίνει και εντός του περιβάλλοντος επεξεργασίας. Ανθεκτικά στελέχη του μικροοργανισμού απομονώνονται συχνά από περιοχές αυξημένης υγρασίας, όπως τα δάπεδα, ο εξοπλισμός επεξεργασίας, οι σχάρες των αποχετεύσεων, τα απόβλητα, περιοχές με συμπυκνωμένο ή στάσιμο νερό, αλλά και οι επιφάνειες επαφής των τροφίμων, όπως οι μηχανές κοπής. Ορισμένα στελέχη, μπορούν να ανακαμπτουν ακόμα και μετά τον καθαρισμό και την απολύμανση, ιδιαίτερα στις δύσκολα προσβάσιμες περιοχές, καθώς ο μικροοργανισμός δημιουργεί βιοφίλμ.

Έτσι, ο μικροβιολογικός έλεγχος των εγκαταστάσεων γίνεται απαραίτητος για την επικύρωση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης. Εξίσου σημαντική είναι η διασταυρούμενη επιμόλυνση των τροφίμων. Ακόμα και τρόφιμα τα οποία έχουν καταστεί ασφαλή μέσω επεξεργασίας για εξάλειψη του βακτηρίου, μπορεί να επαναμολυνθούν μέσω επαφής τους με ωμά προϊόντα, με μολυσμένο εξοπλισμό, με μεταφορά του βακτηρίου από εργάτες και γενικά μέσω κακών πρακτικών υγιεινής του εργοστασίου (Montville & Matthews, 2010).

3.4 Η παρουσία της *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα:

3.4.1 Σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και *Listeria monocytogenes*:

Οι αλλαγές στον τρόπο που παρασκευάζουμε το φαγητό, εξαιτίας της σύγχρονης αστικής ζωής, κάνουν τις πρακτικές ορθής υγιεινής, πολύ απαιτητικές. Η αυξημένη χρήση του ψυγείου για τη διατήρηση των τροφίμων επιτρέπει την διασπορά της *L.monocytogenes* στα τρόφιμα έναντι άλλων παθογόνων που δεν επιβιώνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης, τις τελευταίες δεκαετίες, οι απαιτήσεις των καταναλωτών για φρέσκο και ελάχιστα επεξεργασμένο φαγητό έχουν αυξηθεί. Τα συγκεκριμένα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των φρούτων και των λαχανικών, απαιτούν ελάχιστο μαγείρεμα ή επεξεργασία για την κατανάλωσή τους και δεν περιέχουν πολλά συντηρητικά ή πρόσθετα. Έτσι η *L. monocytogenes* βρίσκει ένα ευνοϊκό περιβάλλον, για να αναπτυχθεί.

3.4.2 Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (RTE –Ready To Eat):

Τα Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση υφίστανται πολύ ήπιους τρόπους επεξεργασίας. Τρόφιμα όπως τα μαλακά τυριά, τα λουκάνικα Φρανκφούρτης, αλλαντικά και προϊόντα πουλερικών αποτελούν μεγάλο κίνδυνο λιστερίωσης για τις ευπαθείς ομάδες. Κι αυτό γιατί ένα μεγάλο ποσοστό των οικιακών ψυγείων δεν φτάνουν κάτω από τους 10 βαθμούς κελσίου, περιβάλλον το οποίο είναι αρκετά ευνοϊκό για την ανάπτυξη της ψυχρότροφης *L.monocytogenes* (Montville & Matthews, 2010).

3.4.3 Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα:

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά είναι μια πολύ σημαντική ενεργειακή πηγή για τον άνθρωπο και η επιμόλυνση αυτών των προϊόντων με *Listeria spp.*, κυρίως *L. monocytogenes*, μπορεί να οδηγήσει σε επικίνδυνες λοιμώξεις σε μεγάλο αριθμό του πληθυσμού. Η γρήγορη και ακριβής ανίχνευση της *L. monocytogenes* στο γάλα και τα γαλακτοκομικά, στα λαχανικά, το κρέας, τα πουλερικά και τα θαλασσινά είναι αναγκαία για την πρόληψη επιμολύνσεων μέσα

στην τροφική αλυσίδα. Περίπου το 3% της διατροφικής ενέργειας του πληθυσμού στην Ασία και την Αφρική προέρχεται από το γάλα. Αυτό αντιστοιχεί στο 6-7% της διαιτητικής πρωτεΐνης. Για τις Ευρωπαϊκές χώρες, το ποσοστό ανέρχεται στο 19%. Το γάλα και τα προϊόντα του είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, και ιχνοστοιχεία όπως Ασβέστιο, μαγνήσιο, σελήνιο, ριβοφλαβίνη, βιταμίνη B5 και B12, ουσίες πολύ σημαντικές για την ανάπτυξη του ανθρώπου, κυρίως για τις έγκυες και τα παιδιά, μα αποτελούν επίσης και το ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των βακτηρίων όπως η *Listeria spp.*. Η κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών είναι υψηλότερη στις ανεπτυγμένες χώρες απ ότι στις αναπτυσσόμενες, κυρίως με τη βελτίωση του οικονομικού στάτους, την συγκέντρωση του κόσμου στα αστικά κέντρα και στις αλλαγές στη διατροφή που συνεπάγονται. Αυτή η αλλαγή των διατροφικών συνηθειών, συνδέεται με μια αύξηση του κινδύνου επιμόλυνσης, κυρίως από παθογόνα όπως *Campylobacter jejuni*, *Shigatoxigenic Escherichia coli* (STEC), *Listeria monocytogenes* και *Salmonella spp.* τα οποία είναι επικρατέστερα στο γάλα και τα προϊόντα του (Shamloo et al. 2019).

3.4.3.1 Διάφορες έρευνες για την *Listeria monocytogenes*, στο γάλα και τα γαλακτοκομικά:

Το έτος 1985 ο Φλέμιγκ έκανε την πρώτη του αναφορά για την παρουσία της *L. monocytogenes* σε παστεριωμένο γάλα, στη Μασσαχουσέτη. Πριν από αυτό, υπήρχε γενικά η πεποίθηση ότι η *L. monocytogenes* είναι η αιτία πρόκλησης μαστίτιδας στις αγελάδες που χρησιμοποιούνταν στη γαλακτοβιομηχανία και ότι αυτό μπορούσε να επιμολύνει το παραγόμενο γάλα. Από εκείνη την εποχή άρχισαν να διεξάγονται διάφορες έρευνες για την *L. monocytogenes* στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ένας ερευνητής από τη Βραζιλία, το έτος 1989-1990 σύγκρινε την παρουσία της *Listeria spp.* σε νωπό και παστεριωμένο γάλα και βρήκε πως η *Listeria* βρισκόταν στο 12,7% των δειγμάτων του νωπού γάλακτος, ενώ στα δείγματα του παστεριωμένου γάλακτος έπεσε στο 0,9%. Μια άλλη έρευνα της χρονιάς, στη Βόρεια Ιρλανδία, έδειξε ότι η επιμόλυνση με *Listeria spp.* στο ωμό γάλα βρέθηκε σε ποσοστό 44.4%, ενώ στο παστεριωμένο, στο 5.6%, των δειγμάτων (Shamloo et al. 2019). Οι φάρμες γαλακτοπαραγωγής, είναι ο κυρίαρχος αγροτικός τομέας σε πολλές χώρες. Μια έρευνα που διεξήχθη στη Λετονία σε διάφορες φάρμες της χώρας, έδειξε πως η *Listeria spp.* ήταν παρούσα κυρίως στο γάλα που παράγεται με συμβατικό τρόπο. Συγκεκριμένα, η παρουσία της ήταν πιο συχνή στις βιολογικές φάρμες, αλλά ως μόλυνση εμφανίστηκε στις

συμβατικές φάρμες σε ποσοστά κατά τρεις φορές υψηλότερα, (σε αναλογία 211 προς 33).

Όσον αφορά στην αναλογία κατσικίσιου και γάλακτος από πρόβατα, η *Listeria spp.* βρέθηκε στο 5.6% των δειγμάτων κατσικίσιου γάλακτος και στο 3.9% των δειγμάτων από γάλα προβάτου, εκ των οποίων η *L. monocytogenes* κατείχε το 33.3 και το 25% αντιστοίχως.

Αν και η παστερίωση μπορεί να μειώσει κατα πολύ την πιθανότητα επιμόλυνσης, δεν μπορεί να εξαλείψει τελείως τον κίνδυνο. Πρώτον γιατί υπάρχει η πιθανότητα το γάλα να επιμολυνθεί κατά τα διάφορα στάδια της παστερίωσης, όπως έδειξε μια έρευνα στη Φινλανδία, όπου η παρουσία της *L. monocytogenes* στο συσκευασμένο γάλα ήταν υψηλότερη από ότι στο γάλα που βρισκόταν σε δεξαμενές. (Σε αναλογία 4.8% προς 1.7%). Δεύτερον, εξαρτάται κατά πολύ και από την μικροβιολογική κατάσταση στην οποία βρίσκεται το προς παστερίωση γάλα. (Shamloo et al. 2019) Η πιο πρόσφατη έρευνα διεξήχθη στο Ιραν, όπου βρήκαν την παρουσία της *Listeria spp.* σε δείγματα νωπού γάλακτος, παγωτού και κρέμας στο 5.49%, 19.04%, 11.11%, αντίστοιχα.

Όμως δεν ανίχνευσαν καθόλου *Listeria spp.* σε δείγματα γιαουρτιού και τυριού. Ίσως το γεγονός αυτό, να έχει να κάνει με την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα. Η *L. monocytogenes*, που μπορεί να βρεθεί στα γαλακτοκομικά δεν προλαβαίνει να αναπτυχθεί εξαιτίας της παρουσίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το κυρίαρχο είδος της *Listeria* ήταν η *L. innocua* με ποσοστό παρουσίας 5.44% και λιγότερο η *L. monocytogenes* σε ποσοστό 1.36% (Shamloo et al. 2019).

3.4.3.2 Τυριά:

Η *L. monocytogenes*, έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες και είναι ανθεκτική σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, γι αυτό μπορεί να επιβιώσει κατά την παραγωγή και την ωρίμανση των τυριών. Η συμπεριφορά της εξαρτάται από τον τύπο του τυριού που παρασκευάζεται. Για παράδειγμα κατά την ωρίμανση του τυριού Τσένταρ (σκληρό τυρί), η *L. monocytogenes* θανατώνεται σταδιακά, ενώ στο τυρί Καμαμπέρ (μαλακό τυρί), αναπτύσσεται. Η κατανάλωση μαλακών τυριών από ευπαθή άτομα αποτελεί, σύμφωνα με το CDC (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών), παράγοντα κινδύνου για λιστερίωση. (Montville & Matthews, 2010). Τα μαλακά τυριά έχουν υγρασία έως 56% και κάποια από αυτά δεν υφίσταται ζύμωση. Η έλλειψη ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας και η υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, τα καθιστά περισσότερο επικίνδυνα για την παρουσία της *L. monocytogenes*.

3.4.4 Προϊόντα κρέατος και πουλερικά:

Η *L.monocytogenes* αναπτύσσεται καλύτερα στα πουλερικά απ ότι σε οποιοδήποτε άλλο κρέας. Το ψητό βοδινό και τα ξηρά λουκάνικα είναι αυτά, στα οποία αναπτύσσεται λιγότερο. Η ανάπτυξη της στο κρέας επηρεάζεται από τις φυσικοχημικές συνθήκες που επικρατούν και από την παρουσία άλλων βακτηρίων (Montville & Matthews, 2010). Μόλυνση του μυϊκού ιστού των ζώων από *L.monocytogenes*, μπορεί να προκληθεί πριν τη σφαγή ή μετά. Σε περιπτώσεις όπου η μόλυνση συνέβη πριν τη σφαγή, η κατανάλωση του κρέατος των οργάνων είναι πιο επικίνδυνη από των ιστών, γιατί η *L.monocytogenes* συγκεντρώνεται στο νεφρό, στους λεμφαδένες, στο συκώτι και τη σπλήνα. Εάν η *L.monocytogenes* προσκολληθεί στην επιφάνεια ωμών κρεάτων, είναι δύσκολο να αφαιρεθεί και να θανατωθεί, παρά μόνο μετά από καλό μαγείρεμα. Παράδειγμα αποτελούν τα λουκάνικα Φρανκφούρτης που δεν έχουν θερμανθεί και το ανεπαρκώς ψημένο κοτόπουλο, που είναι παράγοντες κινδύνου για τη σποραδική λιστερίωση. Κρεατοσκευάσματα έτοιμα προς κατανάλωση, τα οποία έχουν υποστεί ήπια θερμική επεξεργασία και συντηρούνται σε άλμη ευνοούν την ανάπτυξη της *L.monocytogenes*, επειδή τα ανταγωνιστικά βακτήρια μειώνονται και η Λιστέρια έχει μεγάλη αντοχή στην αλατότητα. Κρεατοσκευάσματα σε τιμές pH κοντά στο 5,0 είναι ασφαλή από την *L.monocytogenes*, ενώ για pH γύρω στο 6,0 αναπτύσσεται ταχύτατα (Montville & Matthews, 2010).

3.4.5 Θαλασσινά:

Η *L.monocytogenes*, έχει απομονωθεί από φρέσκα, κατεψυγμένα και επεξεργασμένα θαλασσινά. Τα μαλάκια όπως μύδια,στρείδια, το ωμό ψάρι αποτελούν τρόφιμα υψηλού κινδύνου για λιστερίωση. Επίσης τα ελαφρά συντηρημένα προϊόντα ψαριών όπως τα καπνιστά, αλατισμένα,ζυμωμένα δίχως επαρκή θερμική επεξεργασία. (Montville & Matthews, 2010).

3.4.6 Αγορανομικοί Κανονισμοί για τη *Listeria monocytogenes*:

Στην Ευρώπη, ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 καθιερώνει μικροβιολογικά κριτήρια σε τρόφιμα. Για την *L.monocytogenes* στην κατηγορία των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξή της (εκτός εκείνων που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς), έχουν δύο διαφορετικά μικροβιολογικά κριτήρια i) τα επίπεδα της *L.monocytogenes* θα πρέπει να είναι κάτω των 100 CFU/ gr, καθόλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος, ii) απουσία στα 25 gr του προϊόντος πριν το τρόφιμο απομακρυνθεί από τον άμεσο έλεγχο του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων, ο οποίος το έχει παράγει. Επίσης σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *L.monocytogenes* διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ιατρικούς σκοπούς έχουν όριο 100 CFU/gr. Η εφαρμογή είτε του πρώτου είτε του δεύτερου κριτηρίου εξαρτάται από το αν ο κατασκευαστής είναι σε θέση να αποδείξει ότι το επίπεδο της *L.monocytogenes* στο προϊόν του δεν θα υπερβαίνει τα 100 CFU/gr καθόλη τη διάρκεια ζωής του στο ράφι. Η απόδειξη αυτή πρέπει να βασίζεται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του προϊόντος με τη διαβούλευση της επιστημονικής βιβλιογραφίας, όταν είναι απαραίτητο, ή μέσω ποσοτικών μοντέλων ή δοκιμών προσομοιώσεων.

CFU: (από colony forming unit), or CFU, είναι μια μονάδα που χρησιμοποιείται για να υπολογίσει τη συγκέντρωση ενός μικροοργανισμού σ ένα δείγμα.

3.5 Ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*:

Η ελάχιστη και μηδενική ανοχή που επιβάλλει η νομοθεσία για την παρουσία της *L.monocytogenes*, απαιτεί ακριβείς και λειτουργικές μεθόδους ανίχνευσης. Επίσης το μεγάλο οικονομικό κόστος μιας πιθανής ανάκλησης μεγάλης παρτίδας προϊόντων σε μια επιχείρηση τροφίμων, κάνει τις μεθόδους ανίχνευσης τυποποιημένες αναλύσεις ρουτίνας.

Η βέλτιστη μέθοδος πρέπει να είναι ευαίσθητη,εκλεκτική, γρήγορη, οικονομική, αξιόπιστη, αναπαραγώγιμη και να διακρίνει νεκρά από ζωντανά κύτταρα.

Γονότυπος (genotype): καλείται το σύνολο των γονιδίων ενός οργανισμού, που απαρτίζουν το DNA του.

Φαινότυπος: είναι όλα τα μορφολογικά, παραγωγικά κ.λ.π. χαρακτηριστικά που εκδηλώνει ένας οργανισμός σε μία δεδομένη στιγμή, δηλαδή το μέρος του γονοτύπου του οργανισμού το οποίο μπορούμε (άμεσα ή έμμεσα) να παρατηρήσουμε.

Αντιγόνα (Serotypes): Ονομάζονται τα στοιχεία των μικροοργανισμών που ομαδοποιούνται με βάση τη δομή τους (πχ το σώμα και το μαστίγιο του βακτηρίου)

Αντιγόνο (Antigen) : Χαρακτηρίζεται γενικά ένα σύνθετο μόριο (πρωτεΐνη, πολυσακχαρίτης, λιπίδιο και νουκλεϊνικό οξύ) που μπορεί να αντιδράσει με ένα αντίσωμα. Με τον όρο αντιγόνο νοείται κάθε ξένη ουσία που όταν εισέρχεται σε έναν οργανισμό αναγνωρίζεται από τα Β-λεμφοκύτταρα και/ή Τ-λεμφοκύτταρα και μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη της ανοσίας.

Αντίσωμα : είναι ένα μεγάλο, πρωτεϊνικό μόριο που παράγεται από τα Β - λεμφοκύτταρα και χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα για να αναγνωρίσει και να ακινητοποιήσει "εισβολείς", όπως είναι τα βακτήρια και οι ιοί. Το αντίσωμα αναγνωρίζει ένα μοναδικό τμήμα του εισβολέα που ονομάζεται αντιγόνο.

3.5.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι ανίχνευσης:

Οι φαινοτυπικές μέθοδοι ανιχνεύουν χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού που είναι εμφανή. Βασίζονται σε

- βιοχημικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού (Ζύμωση σακχάρων, παραγωγή καταλάσης, οξειδάσης, κλπ.)

- σε αντιγονικά χαρακτηριστικά(Μελέτη αντιγόνων τοιχώματος, μαστιγίου, ελύτρου, βλεφαρίδων), ή
- στην ευαισθησία του σε διάφορους παράγοντες. πχ σε αντιμικροβιακά ή βακτηριοφάγους

3.5.1.1 Ανοσολογικές μέθοδοι:

Ανοσολογικές μέθοδοι ορισμός:

Είναι μέθοδοι ανίχνευσης συγκεκριμένων παθογόνων ουσιών με τη χρήση αντισωμάτων. Επειδή τα αντισώματα είναι εξειδικευμένα ως προς το παθογόνο που παγιδεύουν, χρησιμοποιούνται σαν δείκτες παρουσίας. Στα ανοσολογικά τεστ χρησιμοποιούνται τεχνητά αντισώματα που ταιριάζουν στο προς ανίχνευση παθογόνο.

Διάκριση της *L.monocytogenes* με ανοσολογικές μεθόδους:

Υπάρχουν πολλά είδη ανοσολογικών τεστ και βασίζονται στο είδος του αντισώματος που θα προσδεθεί στο αντιγόνο που βρίσκεται στην επιφάνεια του βακτηρίου.(μονόκλωνο, δίκλωνο ή ανασυνδυασμένο Για να αυξηθεί το ποσοστό ανίχνευσης αρχικά χρησιμοποιούνται διάφορα μέσα, για να εξοντωθεί η υπόλοιπη μικροβιακή μικροχλωρίδα. Οι περισσότερες ανοσοχημικές μέθοδοι που δοκιμάζονται στην *Listeria monocytogenes*, χρησιμοποιούνται για να ανιχνευθούν κάποια δομικά στοιχεία της όπως:

- η πρωτεϊνη *p60*,
- η τοξίνη *LLO* και
- το μαστίγιο της.

Αυτές οι τεχνικές απαιτούν μεγάλα ποσά δείγματος. Επίσης είναι ακριβές στην διεξαγωγή τους γιατί απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό.(Κατσιμιλή (2021)

3.5.1.2 Βιοχημικές μέθοδοι:

Βιοχημικές μέθοδοι ορισμός:

Για να ταυτοποιηθεί ένας μικροοργανισμός, χρησιμοποιούνται διάφορα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης (τα οποία θα αναφέρονται ως μέθοδοι εμπλουτισμού), τα οποία εμβολιάζονται στον προς εξέταση μικροοργανισμό. Κατόπιν, παρατηρείται εάν οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και εάν παράγονται συγκεκριμένα μεταβολικά προϊόντα. Ένας τρόπος για να παρατηρηθούν τα προϊόντα αυτά είναι η προσθήκη δεικτών στα μέσα καλλιέργειας. Οι μέθοδοι αυτές, καλούνται βιοχημικές.

Διάκριση της *L.monocytogenes* από άλλα είδη με βιοχημικές μεθόδους:

Η *Listeria monocytogenes* υποβάλλεται σε βιοχημικά τεστ, προκειμένου να διαφοροποιηθεί από άλλα είδη του γένους *Listeria*, καθώς όλα τα είδη του γένους *Listeria* είναι παρόμοια φαινοτυπικά. Τα βιοχημικά τεστ που χρησιμοποιούνται, είναι κυρίως η παραγωγή οξέων από D-ξυλόζη, L-ραμνόζη, D-μαννιτόλη και α-μεθυλ-D-μαννόζη. Οι αποικίες της είναι αρνητικές στην D-ξυλόζη, (δεν παράγουν οξύ) και θετικές στην L-ραμνόζη (παραγωγή οξέος). Συγκεκριμένα για την δοκιμή L-ραμνόζης, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι αποικίες εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα, που δείχνει την παραγωγή οξέος, χωρίς την παραγωγή αερίου, χαρακτηριστικό γνώρισμα της *Listeria monocytogenes*. Αν οι αποικίες εμφανίσουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά, υπάρχει έντονη υποψία πως ο μικροοργανισμός που εξετάζεται είναι η *Listeria monocytogenes* (Κατσιμιλή, 2021).

3.5.1.2.1 Μέθοδοι κυτταρικής καλλιέργειας:

Η μέθοδος της κυτταρικής καλλιέργειας είναι η πρώτη που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση της *Listeria monocytogenes*. Οι πρώτες μελέτες έδειχναν, πως η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει σε χαμηλές θερμοκρασίες κι έτσι οι ερευνητές για να την απομονώσουν, την καλλιεργούσαν για αρκετό χρονικό διάστημα στους 4°C. Όμως αυτή η μέθοδος είχε το μειονέκτημα ότι δεν μπορούσε να διαφοροποιήσει τα τραυματισμένα στελέχη που δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν υπό συνθήκες στρες. Η *Listeria* αναπτύσσεται αργά και μπορεί να κατασταλεί από ανταγωνιστές, γι αυτό, σε όλες τις μεθόδους απομόνωσης στις καλλιέργειες, εμπλουτίζονται επίσης βακτηριοστατικοί παράγοντες όπως ναλιδιξικό οξύ και ακριφλαβίνη. Το ποσοστό ανάπτυξης εξαρτάται από το είδος του τροφίμου από το οποίο απομονώθηκε η *Listeria*, από την παραγωγή βακτηριοφάγων και από την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του συστήματος από το οποίο απομονώθηκε το δείγμα. Γι αυτό ανάλογα την πηγή από όπου έχει παρθεί η *Listeria*, χρησιμοποιούνται διαφορετικές μέθοδοι εμπλουτισμού. Οι τρεις δημοφιλέστερες μέθοδοι εμπλουτισμού είναι:

- η *Listeria electrical broth*
- η *Frazer Media*
- και η *University of Vermont broth media* (media=υπόστρωμα).

Η *Listeria electrical broth* είναι η καταλληλότερη για απομόνωση από τα θαλασσινά και το περιβάλλον και έχει τη μεγαλύτερη ακρίβεια. Αν και η μέθοδος της καλλιέργειας είναι παγιωμένη στην βιομηχανία τροφίμων, τα αποτελέσματα είναι συνήθως διαθέσιμα μετά από μια εβδομάδα. Δυο από τις πλέον σημαντικότερες μεθόδους ανίχνευσης της *Listeria*,

κατάλληλες για όλα τα δείγματα τροφίμων είναι οι:

- FDA βακτηριολογικές και αναλυτικές μέθοδοι (BAM) και
- οι *ISO 11290* μέθοδοι.

Κατά την BAM μέθοδο ο εμπλουτισμός γίνεται με μέσα τα οποία εμπεριέχουν επιλεκτικούς βακτηριοστατικούς παράγοντες, μαζί με κυκλοεξαμίδιο ως αντιμυκητιακό. Η θερμοκρασία επώασης γίνεται στους 30 βαθμούς για 48 ώρες. Η *ISO 11290* γίνεται σε δύο στάδια.

Η Fraser media μέθοδος, περιέχει τους ίδιους βακτηριοστατικούς παράγοντες όπως και η FDA-BAM μέθοδος. Επίσης περιέχει εσκουλίνη, για την ανίχνευση της β-D γαλακτοξειδάσης της *Listeria*, που αποτελεί δείκτη δραστηριότητας του μικροοργανισμού. Συνήθως τα βακτηριοστατικά, αποτελούν εμπόδιο για την ανάπτυξη της ίδιας της *Listeria*, γι αυτό στην FDA-BAM μέθοδο τοποθετούνται 4 ώρες μετά την επώαση, ενώ στην μέθοδο ISO χωρίζονται σε δύο δόσεις εκ των οποίων η μία προστίθεται στο πρώτο στάδιο του εμπλουτισμού. Υπάρχουν εξειδικευμένες μέθοδοι ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται για συγκεκριμένα είδη τροφίμων, όπως για παράδειγμα για δείγματα που προέρχονται από το κρέας, τα αυγά και τα πουλερικά ακολουθείται το πρωτόκολλο USDA. Για δείγματα από γαλακτοκομικά προϊόντα χρησιμοποιείται η μέθοδος *AOA /IDF 990.12*. (Shamloo et al. 2019).

Εκλεκτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τη *Listeria monocytogenes*:

Στις τρεις μεθόδους εμπλουτισμού χρησιμοποιείται ένα μείγμα πολυμυξίνης-ακρυφλαβίνης-λιθίου-χλωριδίου-μαννιτόλης (PALCAM) και Oxford agar ως εκλεκτικό υπόστρωμα, όμως έχει το μειονέκτημα ότι δεν μπορεί να διακρίνει τα παθογόνα στελέχη της *Listeria* από τα μη. Γι αυτό πρόσφατα άρχισαν να χρησιμοποιούνται χρωμογενετικά μέσα. Τα χρωμογενετικά μέσα, είναι δείκτες που διακρίνουν εξειδικευμένα τμήματα της *Listeria* που αποτελούν λοιμογόνους παράγοντες, με το να φθορίζουν. Είναι μια από τις δημοφιλέστερες μεθόδους ταυτοποίησης γιατί η προετοιμασία της είναι εύκολη και τα αποτελέσματα εμφανή. Το συγκεκριμένο ανιχνεύει τη *Listeria monocytogenes* μετά από 24 ώρες (Shamloo et al. 2019).

3.5.1.2.2 Ανίχνευση εστεράσης:

Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει τη δραστικότητα της εστεράσης μέσα στα κύτταρα της *L.monocytogenes* που τοποθετούνται σε μια αμυλούχα μεμβράνη και χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση. Δυστυχώς όμως η επαναληπτικότητα της μεθόδου είναι σχετικά χαμηλή.

3.5.1.3 Διάκριση με βάση τον ορότυπο- οροαποτύπωση:

Το είδος της *Listeria* χωρίστηκε σε 15 ορότυπους με βάση το σωματικό τους αντιγόνο (O) και 4 ορότυπους με βάση το βλεφαριδικό τους αντιγόνο (H). Το πρώτο είναι θερμοάντοχο και το δεύτερο θερμοευαίσθητο. Δεκατρείς ορότυποι της *Listeria* έχουν καθοριστεί με βάση το συνδυασμό αυτών των δυο αντιγόνων. Από αυτούς τους ορότυπους ο 1/2a, ο 1/2b και ο 4b συνδέονται περισσότερο με το 95% των μολυσματικών ασθενειών και συγκεκριμένα ο 4b σχετίζεται με περιστατικά επιδημιών (Shamloo et al. 2019). Η οροαποτύπωση δεν είναι πολύ χρήσιμη στις επιδημιολογικές έρευνες γιατί οι παθογόνοι ορότυποι είναι πολύ λίγοι σε σχέση με το σύνολο των οροτύπων και συνδυάζεται συνήθως με άλλες μοριακές μεθόδους. Ο καλύτερος συνδυασμός της οροαποτύπωσης είναι με την PCR (Κατσιμιλή 2021).

3.5.1.4 Διάκριση με βάση τον τύπο του βακτηριοφάγου:

Διάφορα στελέχη της *Listeria* μπορούν να διακριθούν με βάση την ευαισθησία τους σε συγκεκριμένους βακτηριοφάγους. Χρησιμοποιούνται ομάδες βακτηριοφάγων που έχουν ως στόχο συγκεκριμένα αντιγόνα των κυττάρων της *Listeria*. Αφότου επέλθει η λύση των κυττάρων τα δείγματα κατηγοριοποιούνται με βάση την ευαισθησία τους. Η συγκεκριμένη μέθοδος συνήθιζε να χρησιμοποιείται σε μελέτες κρουσμάτων λιστερίωσης και ως συμπληρωματική μέθοδος επιβεβαίωσης της *Listeria monocytogenes* μετά από κυτταρική καλλιέργεια.

3.5.2 Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης:

Οι μοριακές μέθοδοι βασίζονται στην ανάλυση του χρωμοσωμικού ή εξωχρωμοσωμικού γονιδιώματος του μικροοργανισμού (πχ το DNA των πλασμιδίων του).

Μοριακές μέθοδοι στην *L.monocytogenes*:

Ο φαινότυπος, οι ενζυματικές λειτουργίες και άλλες ιδιότητες των βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στα βιοχημικά τεστ για την ανίχνευση, μπορεί να μεταβληθούν από εξωτερικές συνθήκες όπως η φάση της ανάπτυξης και μεταλλάξεις συγκεκριμένων γονιδίων.

Γι αυτό, η πρόοδος στη γενετική και στις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης, μας παρέχει τη δυνατότητα να στοχοποιούμε συγκεκριμένα γονίδια, που είναι μοναδικά για κάθε είδος μικροοργανισμού. Η ταυτοποίηση της *L.monocytogenes* με τη χρήση μοριακών μεθόδων είναι πολύ δημοφιλής, γιατί είναι ευαίσθητη, ακριβής και εξειδικευμένη. Ο υβριδισμός του DNA και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) περιλαμβάνονται σ αυτές τις

μεθόδους. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, (PCR, εκ του polymerase chain reaction) είναι μία μέθοδος της μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA της. Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία.

3.5.2.1 Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) στην *L.monocytogenes*:

Γονίδια “στόχοι” της *L.monocytogenes* στις μοριακές αναλύσεις:

Το πιο εξειδικευμένο γονίδιο στόχος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*, είναι το *inlB*. Επιπροσθέτως, η ομάδα των *inlA, B, C* πολυμερίζονται με τη μέθοδο PCR. Τα πιο δημοφιλή γονίδια με λοιμογόνο ικανότητα που χρησιμοποιούνται στον πολυμερισμό με PCR είναι τα *hlyA, iap, inl, prfA* και το *16S rRNA* γονίδιο. Η ανίχνευση δυο ή περισσότερων λοιμογόνων παραγόντων της *Listeria*, δίνει μεγαλύτερη ακρίβεια στο αποτέλεσμα.

Μειονεκτήματα της μεθόδου PCR:

Η ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα μέσω PCR είναι δύσκολη, γιατί ο αριθμός των κυττάρων που επιμολνουν το δείγμα είναι πολύ μικρός και επίσης συνήθως η *Listeria monocytogenes* επικαλύπτεται από την *Listeria innocua*. Επίσης τα αποτελέσματα της PCR επηρεάζονται αν υπάρχουν ουσίες όπως φαινολικά μόρια, αλδεΐδες, πχ στα καπνιστά ψάρια, αιμογλοβίνη και ένζυμα όπως πρωτεάσες στα γαλακτοκομικά. Τέλος η PCR δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ ζώντων και νεκρών κυττάρων, γι αυτό μια καλή διαδικασία είναι να συνδυαστεί με καλλιεργητικές μεθόδους, όπου δεν προσμετρούν νεκρά, μη καλλιεργήσιμα κύτταρα, μεταβολικά τραυματισμένα και κύτταρα υπό κατάσταση στρες. (πχ half Frazer-broth).

3.5.2.2 Ηλεκτροφόρηση ενζύμου πολλαπλής εστίασης MLEE (Multi-locus enzyme electrophoresis):

Η μέθοδος αυτή διακρίνει διαφορετικά ένζυμα του βακτηρίου με βάση την κινητικότητά τους σε ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Τα ένζυμα κατηγοριοποιούνται με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων τους. Παρασκευάζονται μετά από λύση του βακτηρίου και διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αμύλου. Κάθε παραλλαγή κινητικότητας του ενζύμου ονομάζεται ηλεκτρομορφή. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να τυποποιήσει όλα τα στελέχη

της *Listeria* και γι αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε επιδημιολογικές έρευνες λιστερίωσης. Τα μειονεκτήματά της όμως είναι η δυσκολία στη διάκριση και η μειωμένη αναπαραγωγικότητα. (Shamloo et al. 2019).

3.5.2.3 Ηλεκτροφόρηση πήγματος παλλόμενου πεδίου PFGE (Pulse field gel electrophoresis):

Είναι η καλύτερη μέθοδος ταυτοποίησης των παθογόνων στελεχών της *Listeria* από επιμολυσμένα δείγματα. Γιατί είναι αποτελεσματική και αρκετά τυποποιημένη. Μπορεί να διακρίνει πολλούς τύπους της *Listeria*, που να προέρχονται από διαφορετικές πηγές .

Το συνολικό γονιδίωμα του βακτηρίου κόβεται σε κομμάτια με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων. Τα κομμάτια του DNA μέσα σε gel αгарόζης, δημιουργούν χαρακτηριστικούς δεσμούς οι οποίοι έχουν κατηγοριοποιηθεί και ταξινομηθεί με βάση τον τύπο παλμού που σχηματίζουν κατά την ηλεκτροφόρηση. Η *Listeria monocytogenes* μπορεί να ανιχνευθεί ταχύτατα με αυτή την τεχνική γιατί όλα τα μοτίβα PFGE των στελεχών της έχουν συλλεχθεί σε μια βάση δεδομένων.(Shamloo et al. 2019) Είναι επίσης βοηθητική στον έλεγχο του βαθμού επιμόλυνσης μέσα στο εργοστάσιο επεξεργασίας τροφίμων, γιατί μπορεί να βρει τον κοινό τύπο PFGE για διάφορα δείγματα, τόσο από τα ίδια τα προϊόντα, όσο και από το περιβάλλον επεξεργασίας τους. Μπορεί επίσης να διακρίνει επιτυχώς τον ορότυπο 4b της *Listeria monocytogenes*, όμως απαιτεί εξειδικευμένο και ακριβό εξοπλισμό και είναι χρονοβόρα.

3.6 Λιστερίωση:

βακτηριαμία: είναι η παρουσία βακτηριδίων στο αιμα εμπύρετου ασθενούς χωρίς εμφανή εστία.

ανοσολογική ανεπάρκεια: είναι η παθολογική κατάσταση κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι σε θέση να επιτελέσει σωστά και πλήρως τον ρόλο του.

Το άτομο που παρουσιάζει ανοσολογική ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται ως ανοσοκατεσταλμένο.

3.6.1 Χαρακτηριστικά της ασθένειας:

Η λιστερίωση είναι μία σοβαρή λοίμωξη της κυκλοφορίας του αίματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος, που προκαλείται από το βακτήριο *Listeria monocytogenes*.

3.6.2 Συμπτώματα της λιστερίωσης:

Τα συμπτώματα της μόλυνσης κυμαίνονται από ήπια έως πολύ σοβαρά, ανάλογα τον ασθενή. Αν και μπορεί να εμφανιστεί ανθρώπινη λιστερίωση και σε υγιή άτομα, ο κίνδυνος μόλυνσης είναι μεγαλύτερος σε άτομα όπως: ηλικιωμένους, έγκυες γυναίκες και ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Οι περισσότερες περιπτώσεις ανθρώπινης λιστερίωσης φαίνεται να είναι σποραδικές, και όχι τόσο επιδημιολογικές. Τα κλινικά σύνδρομα περιλαμβάνουν κυρίως λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος και βακτηραιμία, αλλά μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν ενδοκαρδίτιδα, μία λοίμωξη των βαλβίδων της καρδιάς. Η μηνιγγίτιδα εμφανίζεται συνήθως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Τα συμπτώματα που προδιαθέτουν μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό, είναι πονοκέφαλος, εμετός, πυρετός και αδιαθεσία. Τα άτομα με φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα μπορούν να ξεπεράσουν την επίθεση από *Listeria monocytogenes* μέσω απόρριψης του βακτηρίου στα κόπρανα, το οποίο θα αποβληθεί μετά από μερικές μέρες. Είναι δηλαδή πιθανό, το βακτήριο να μην προκαλέσει λοίμωξη, αλλά μια μόλυνση χαμηλού βαθμού, που μοιάζει με ελαφριά γρίπη. Έγκυες γυναίκες που έχουν μολυνθεί με το βακτήριο, μπορεί να εμφανίσουν μία ήπια φλεγμονώδη ασθένεια, με πυρετό, πονοκέφαλο, μυαλγίες και περιστασιακά γαστρεντερικά συμπτώματα. Η λιστερίωση μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές στην εγκυμοσύνη. Συγκεκριμένα, προκαλείται ενδομήτρια λοίμωξη, που μπορεί να επιφέρει πρόωρο τοκετό, άμβλωση, θάνατο του εμβρύου ή πρόιμη λοίμωξη του νεογνού. Τα νεογνά φαίνεται να έχουν τις υψηλότερες συχνότητες εμφάνισης λοίμωξης από τη *Listeria monocytogenes*. Η νεογνική λιστερίωση χωρίζεται σε σύνδρομα πρόιμης και καθυστερημένης νόσου. Η πρόιμη έναρξη της λιστερίωσης, προκύπτει από ενδομήτρια λοίμωξη, που μπορεί να προκαλέσει ασθένεια στο νεογνό κατά τη γέννηση ή λίγο αργότερα. Αυτός ο τύπος λιστερίωσης μπορεί να οδηγήσει σε άμβλωση, ή πρόωρη γέννηση ενός σοβαρά προσβεβλημένου βρέφους, που ίσως εμφανίσει ηπατίτιδα. Η λιστερίωση καθυστερημένης έναρξης είναι πιθανό να εμφανιστεί ως μηνιγγίτιδα, κάποιες ημέρες μετά τη γέννηση (Κατσιμιλή 2021).

3.6.3 Παθογένεια:

Η *L.monocytogenes*, εισέρχεται στον άνθρωπο μέσω της στοματικής οδού και συλλαμβάνονται από τους μακροφάγους (κύτταρα του ανοσοποιητικού). Μέσα στους μακροφάγους διπλασιάζονται. Έπειτα μεταφέρονται στους λεμφικούς αδένες και από εκεί,

στο συκώτι και στον σπλήνα. Εκεί, θανατώνεται το μεγαλύτερο μέρος των λιστεριών, αλλά όσες από αυτές επιβιώσουν, μεταφέρονται στον εγκέφαλο ή τον πλακούντα, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (Montville & Matthews, 2010).

3.6.4 Αντιβιοτική θεραπεία για τη λιστερίωση και η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών:

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη λιστερίωση είναι κυρίως τα αντιβιοτικά της β-λακτάμης όπως πενικιλίνη και αμπικιλίνη, μόνα τους ή σε συνδυασμό με μία αμινογλυκοσίδη, όπως η γενταμυκίνη. Για ασθενείς με αλλεργία στην πενικιλίνη, χορηγείται σουλφαμεθοξαζόλη και για ασθενείς που εμφανίζουν βακτηριαμία, η βανκομυκίνη. Για τις εγκύους, χρησιμοποιείται η ερυθρομυκίνη. Άλλα αντιβιοτικά που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη λιστερίωση είναι τετρακυκλίνες, η χλωραμφενικόλη και οι φλουοροκινολόνες. Γενικά, η πλειοψηφία της *Listeria spp.* που έχει συλλεχθεί από τρόφιμα στα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, είναι ευπαθής στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για τα gram θετικά βακτήρια όπως οι τετρακυκλίνες, η αμπικιλίνη, η πενικιλίνη G, οι σουλφοναμίδες, οι αμινογλυκοσίδες και τα γλυκοπεπίδια. Τα περισσότερα στελέχη της *L. monocytogenes* δείχνουν έμφυτη ανθεκτικότητα στην φωσφομυκίνη και τις λινκοζαμίδες (Olaimat et al. 2018). Η έγκαιρη διάγνωση της λιστερίωσης είναι κρίσιμη, ιδιαίτερα για τις ευπαθείς ομάδες ασθενών. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της *Listeria monocytogenes* είναι πως η περίοδος επώασης της είναι πολύ μεγάλη και μπορεί να φτάσει τις 40 μέρες. Αυτό κάνει πολύ δύσκολη την ανίχνευσή της καθώς οι ασθενείς δεν μπορούν να θυμηθούν τι φαγητό κατανάλωσαν μετά από μερικές μέρες. Αυτή είναι και η κύρια δυσκολία που αντιμετωπίζουν οι ερευνητές, όταν έχουν να κάνουν με επιδημίες λιστερίωσης (Κατσιμιλή 2021).

Από το 1990 μέχρι σήμερα, η ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* σε όλες τις κατηγορίες των αντιβιοτικών, έχει αυξητική πορεία (Gómez et al. 2014). Σε μια έρευνα που διεξήχθη στην Ισπανία το χρονικό διάστημα μεταξύ 1993 και 2006, συγκρίθηκε το προφίλ της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, σε στελέχη της *L.monocytogenes* που πάρθηκαν από πουλερικά. Τα στελέχη που εμφανίστηκαν ανθεκτικά σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό είχαν ποσοστό 37.2% το 1993 και 96.0% το 2006. Ομοίως, τα πολυανθεκτικά στελέχη εμφανίστηκαν σε ποσοστό 18.6% το 1993 ενώ το 2006, 84.0%. Ο μέσος όρος των αντιβιοτικών στα οποία τα στελέχη ήταν ανθεκτικά αυξήθηκε από το 1.6% στο 4.2% (Gómez et al. 2014).

Αν και η παρουσία των στελεχών της *L. monocytogenes* που είναι ανθεκτικά σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά είναι πλέον εμφανής, η συνολική εικόνα της ανθεκτικότητας στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά για τη λιστερίωση, δεν είναι ακόμα ανησυχητική. Όμως, τα βακτήρια μπορούν να αποκτήσουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας, μέσω ανταλλαγής γονιδίων από άλλα βακτηριακά είδη. Επίσης η παρουσία πολυανθεκτικών στελεχών στο είδος της *Listeria spp.* δείχνει πως είναι θέμα χρόνου, η *L.monocytogenes* να δανειστεί ανεπιθύμητα γονίδια.

3.7 *L.monocytogenes* και ανθεκτικότητα

3.7.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας της *Listeria monocytogenes*:

Το πρώτο στέλεχος ανθεκτικής *L. monocytogenes* απομονώθηκε το 1988 (Gómez et al. 2014). Από τότε, ανθεκτικά στελέχη σε ένα ή και περισσότερα αντιμικροβιακά, έχουν απομονωθεί από τρόφιμα, ανθρώπους και περιβάλλοντα που επεξεργάζονται τρόφιμα. Η διαρκής αύξηση των πολυανθεκτικών δειγμάτων που συλλέγονται ανα τον κόσμο, δείχνει πως αυτό το παθογόνο, δανείζεται γονίδια ανθεκτικότητας από άλλους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον με αυτόν.

Με ποιούς τρόπους όμως δανείζεται η *L.monocytogenes* γονίδια ανθεκτικότητας;

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά στην *L.monocytogenes*, οφείλεται στα κινητά γενετικά στοιχεία, δηλαδή, τα πλασμίδια, που μετακινούνται ελεύθερα από κύτταρο σε κύτταρο, και τα τρανσποζόνια που μεταφέρονται με χρωμοσωμική σύζευξη. Επίσης οι αντλίες efflux, παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκτηση ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού, κυρίως αποβάλλοντας αντιβιοτικά όπως οι φλουοροκινολόνες και οι μακρολίδες (Gómez et al. 2014).

3.7.1.1 Πλασμίδια:

Το πλασμίδιο *pIP501*, που διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας στην χλωραμφενικόλη, τις μακρολίδες και και τις λινκοζαμίδες, έχει βρεθεί ότι μεταφέρεται στην *L.monocytogenes* μέσω σύζευξης, καθώς και ότι μπορεί να μετακινηθεί σε όλα τα είδη της *Listeria spp.* (Gómez et al. 2014). Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα, το πολυανθεκτικό πλασμίδιο *pDB2011*, που απομονώθηκε από τροφιμογενές στέλεχος της *L. innocua*, περιείχε το γονίδιο *dfpD*, που προσφέρει ανθεκτικότητα στην τριμεθοπρίμη, το οποίο ήταν πανομοιότυπο με το *dfpD* που έχει βρεθεί σε πολλά στελέχη της *L. monocytogenes*.

3.7.1.2 Η *L.innocua* και τα είδη *Enterococcus* και *Streptococcus* ως δότες γονιδίων:

Είναι προφανές, πως τα στελέχη της *L. innocua*, λειτουργούν σαν δότες γονιδίων ανθεκτικότητας στην *L. monocytogenes* και αυτό γιατί τα δύο είδη, είναι παρόμοια γενετικά και βρίσκονται συνήθως μαζί, στο ίδιο περιβάλλον. Η μελέτη της *L.innocua*, που δεν αποτελεί παθογόνο για τον άνθρωπο, βοηθάει τους ερευνητές να καταλάβουν πώς λειτουργεί η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά στην *L.monocytogenes*. Οι εντερόκοκκοι και οι στρεπτόκοκκοι, είναι οι μικροοργανισμοί από τους οποίους συνήθως η *Listeria monocytogenes*, λαμβάνει γονίδια ανθεκτικότητας και αυτό μπορεί να συμβεί σε περιβάλλον που γειτνιάζουν αυτά τα βακτήρια όπως π χ στον εντερικό σωλήνα.

Ο τρόπος με τον οποίο μεταφέρεται το γενετικό υλικό είναι η σύζευξη, μέσω τρσποζονίων και πλασμιδίων. Ένα παράδειγμα, αποτελεί το τρσποζόνιο *Tn6188* το οποίο διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένα αντιμικροβιακά και έχει προέλθει από τον *Staphylococcus aureus*. Το τρσποζόνιο αυτό βρέθηκε σε δείγματα τροφίμων, επιμολυσμένα με *L.monocytogenes* (Olaimat et al. 2018).

3.7.1.3 Η ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και τα υπεύθυνα γονίδια:

Η ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, είναι ο πιο συχνός τύπος ανθεκτικότητας που εμφανίζεται στην *Listeria monocytogenes*. Η κύρια πηγή γονιδίων της, οφείλεται και πάλι, σε τρσποζόνια και πλασμίδια των ειδών *Enterococcus* και *Streptococcus*, ή σε άλλα είδη της *Listeria spp.* (Olaimat et al. 2018). Τα γονίδια *tetM*, *ermB* έχουν βρεθεί στην *Listeria monocytogenes*, σε πάρα πολλά δείγματα τροφίμων και σε έρευνες που έχουν γίνει κατά καιρούς. Συγκεκριμένα έχουν βρεθεί σε σφαγεία πουλερικών, σε λουκάνικα, σε χοιροστάσια και κρεαταγορές στην Κίνα το 2016, όπου το *tetM*, ήταν το πιο συχνά εμφανιζόμενο. Το γονίδιο *tet(M)*, προσφέρει ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες και μέχρι τώρα βρισκόταν σε στελέχη της ανθεκτικής *L. innocua* (Gómez et al. 2014). Το *ermB* έχει διαπιστωθεί ότι προσφέρει ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη. Σε μια έρευνα του 2016, δύο στελέχη της *L. monocytogenes* που βρέθηκαν σε φρέσκο ψάρι και σαλάτα, κουβαλούσαν τα γονίδια: *tetA*, *lmrB*, *mecC*, *msrA*, και *fosX*, που προσφέρουν ανθεκτικότητα σε ένα πλήθος αντιβιοτικών, όπως οι τετρακυκλίνες, οι β-λακτάμες, η ερυθρομυκίνη και η φωσφομυκίνη.

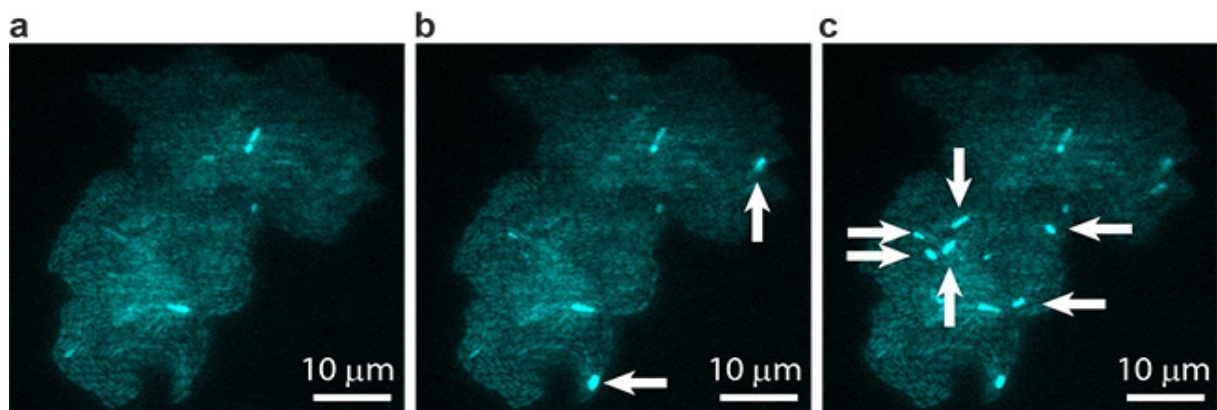
Η ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη είναι συχνή ανάμεσα στα στελέχη της *Listeria spp.* που βρίσκονται σε τρόφιμα και περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Η αποτελεσματικότητα

της τετρακυκλίνης έχει μειωθεί δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της ευρείας και παρατεταμένης χρήσης τους στην κτηνοτροφία, που επέφερε την ανάπτυξη και διασπορά πολλών γονιδίων ανθεκτικότητας.

3.7.1.4 Efflux pumps:

Μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών αντλιών efflux - Η μέθοδος Cartwheel:

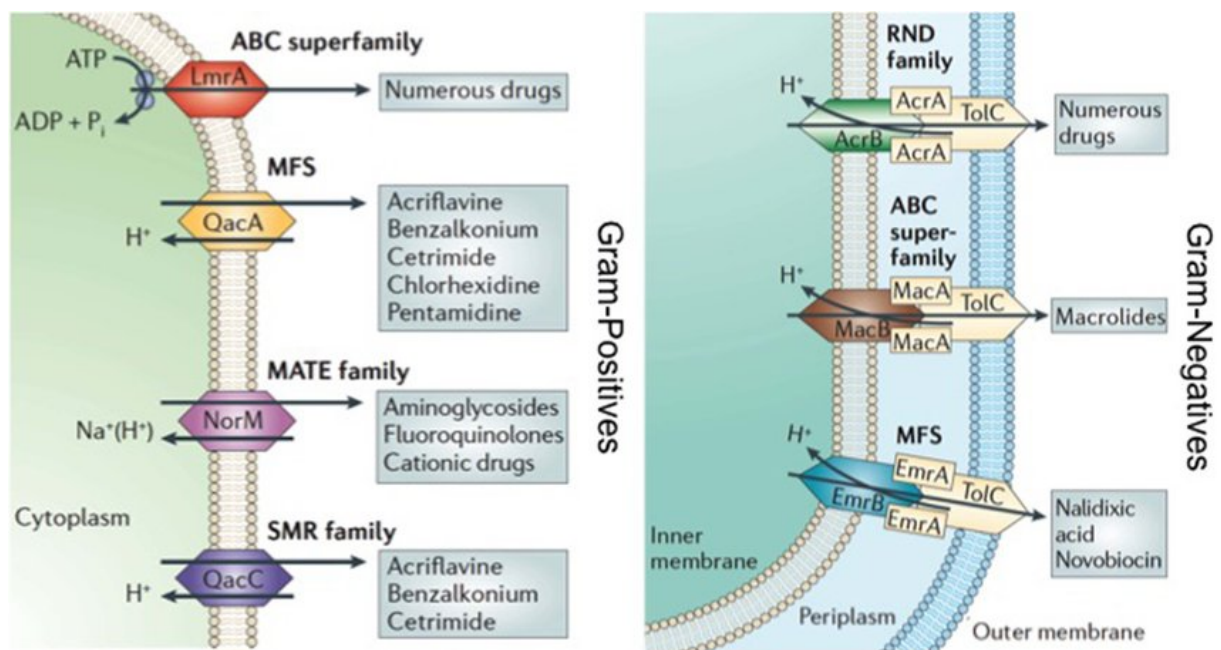
Ένας τρόπος ανίχνευσης συγκεκριμένων αντλιών efflux, μέσα σε βακτήρια, είναι το άγαρ βρωμιούχου αιθιδίου, (EtBr) της μεθόδου Cartwheel. (Olaimat et al. 2018). Είναι μια απλή μέθοδος που χρησιμοποιεί τη δυνατότητα ενός βακτηριακού στελέχους, να αποβάλλει τη χρώση EtBr. Τα βακτήρια που διαθέτουν μια τέτοια αντλία, αποβάλλουν τη συγκεκριμένη ουσία στο υπόστρωμα, ενώ τα βακτήρια από τα οποία απουσιάζει η αντλία, η ουσία, βρωμιούχο αιθίδιο, παραμένει μέσα στο κύτταρο. Η ουσία φωσφορίζει στο υπεριώδες και έτσι μπορεί να ανιχνευθεί. Μέσω της μεθόδου Cartwheel, έχουν ανιχνευθεί δύο μεγάλες πρωτεϊνικές αντλίες της *L.monocytogenes*, η *mdrL* και η *Ide*. Η *mdrL* σχετίζεται με την αποβολή των μακρολιδών, όπως η ερυθρομυκίνη και αποβάλλει την ουσία *EtBr*. Η αντλία *Ide*, αποβάλλει τις φλουοροκινολόνες, καθώς έχει βρεθεί πειραματικά, πως στελέχη της *L.monocytogenes* που ήταν ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη, είχαν υπερέκφραση της συγκεκριμένης αντλίας (Olaimat et al. 2018).



Σχήμα 15: Μέθοδος ανίχνευσης αντλιών efflux. Τα φθορίζοντα στοιχεία είναι κύτταρα που διαθέτουν την προς ανίχνευση αντλία efflux. Οι εικόνες λήφθηκαν σε χρόνο: (a) $t = 0$, (b) $t = 40$ min, και (c) $t = 60$ min.

Σε μία έρευνα, στελέχη της *L.monocytogenes*, που απομονώθηκαν από ψάρι και σαλάτα, βρέθηκαν οι δύο συγκεκριμένες αντλίες, *mdrL* και *lde*.

Έχουν προταθεί πέντε οικογένειες πρωτεϊνικών αντλιών efflux: Οι: ATP-binding cassette (ABC) superfamily, η major facilitator superfamily (MFS), η multidrug and toxic-compound extrusion (MATE) family, η small multidrug resistance (SMR) family, και η resistance nodulation division (RND) family. Η κάθε μία οικογένεια, χρησιμοποιεί διαφορετικές πηγές ενέργειας και αποβάλλει διαφορετικά είδη αντιβιοτικών. Έχουν αναφερθεί πολλές μεταλλάξεις γονιδίων μέσα στις αντλίες, με αποτέλεσμα να αποβάλλουν ουσίες πριν δεν μπορούσαν. Παραδείγματος χάριν, η πρωτεϊνική αντλία *ferR*, είναι γνωστό ότι αποβάλλει τις φλουοροκινολόνες. Έχει προταθεί ότι η μετάλλαξη του ρυθμιστή (*ferA*), της πρωτεϊνικής αντλίας *ferR* είναι υπεύθυνη μερικώς, για την ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στην σιπροφλοραξίμη. Επίσης, η γονιδιακή αλληλουχία της *MdrL*, βρέθηκε αρκετά ομόλογη με την αλληλουχία της efflux πρωτεΐνης *YfmO*, του *Bacillus subtilis*. Και η Lde πρωτεΐνη, της *L. monocytogenes*, έδειξε 44% ομόλογη με την πρωτεΐνη *PmrA* του *S. pneumoniae*. (Olaïmat et al. 2018).



Σχήμα 16: Αναπαράσταση των διαφόρων ειδών πρωτεϊνικών αντλιών στα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια. Φαίνονται οι πέντε μεγάλες οικογένειες των αντλιών efflux. Οι: ATP-binding cassette (ABC) superfamily, major facilitator superfamily (MFS), multidrug and toxic-compound extrusion (MATE) family, small multidrug resistance (SMR) family, και η resistance nodulation division (RND) family. Απεικονίζονται οι ουσίες που χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και τα αντιβιοτικά τα οποία αποβάλλουν

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ανθεκτική λιστέρια και τεχνολογία τροφίμων:

Η *L.monocytogenes* έχει εξεταστεί πάνω σε διάφορους τύπους τροφίμων και φαίνεται ότι έχει μεγάλη ικανότητα προσαρμογής σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών. Οι μικροοργανισμοί προκειμένου να επιβιώσουν των χειρισμών της επεξεργασίας τροφίμων πρέπει να αντέξουν πολλούς και διαφορετικούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως το χαμηλό pH, η θερμική επεξεργασία, τα πρόσθετα και τα αντιμικροβιακά. Το οξειδωτικό και το ωσμωτικό στρες είναι εμπόδια που υπάρχουν εκ φύσεως στα τρόφιμα, όπως τα φρούτα που έχουν χαμηλό pH, τα αφυδατωμένα τρόφιμα, αλλά και στις κάθε τύπου επεξεργασίες που γίνονται από τη βιομηχανία τροφίμων για να αντιμετωπιστεί ο κίνδυνος των τροφιμογενών παθογόνων. Πολλές έρευνες έχουν δείξει πως η *L.monocytogenes* αλληλεπιδρά με τον τύπο του τροφίμου στο οποίο βρίσκεται και έχει μεγάλη προσαρμοστικότητα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (Komora, 2017).

Τίθεται λοιπόν το ερώτημα:

Ποιά είναι η συμπεριφορά των ανθεκτικών στελεχών της *L.monocytogenes* σε αυτού του είδους τις καταπονήσεις σε σχέση με τα στελέχη, που είναι ευαίσθητα σε αντιβιοτικά;

Σε ένα πείραμα (Komora, 2017), συγκρίθηκαν μεταξύ τους τρεις κατηγορίες στελεχών της *L.monocytogenes*: Ανθεκτικά σε ένα αντιβιοτικό, AR (Antibiotic Resistant), ανθεκτικά σε περισσότερα από ένα αντιβιοτικά, MAR (Multi-drug Antibiotic Resistant) και ευαίσθητα στα αντιβιοτικά, AS (Antibiotic Susceptible). Οι τρεις κατηγορίες υπέστησαν εμπόδια στα οποία υποβάλλονται οι μικροοργανισμοί συνήθως, κατά τα στάδια της επεξεργασίας τροφίμων. Συγκεκριμένα, τα στελέχη εξετάστηκαν υπό συνθήκες : Θερμικού στρες (στους 58 °C), οξειδωτικού στρες, συγκεκριμένα με γαλακτικό οξύ συγκέντρωσης (1% v/v) και τελικό pH 3.5 και ωσμωτικού στρες, συγκέντρωσης (37% w/v NaCl). Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν κάποιες διαφορές στη συμπεριφορά των AS, AR and MAR *L.monocytogenes* στελεχών, στα διάφορα εμπόδια. Στο ωσμωτικό και οξινιστικό στρες, η ζωτικότητα των πολυανθεκτικών στελεχών επηρεάστηκε λιγότερο από των ευπαθών σε αντιβιοτικά στελεχών. Συγκεκριμένα, τα πολυανθεκτικά MAR στελέχη, εμφανίστηκαν ανθεκτικότερα στο ωσμωτικό στρες από τα AS αλλά και τα AR. Τα ευπαθή στελέχη AS όμως, δεν εμφάνισαν μεγάλες διαφορές από τα AR στελέχη. Όσον αφορά στη θερμική αντοχή τους, τα ευπαθή, ανθεκτικά και πολυανθεκτικά στελέχη δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές. Ο τρόπος που αντιδρούν τα

βακτήρια στο στρες είναι αρκετά πολύπλοκος. Τα βακτηριακά στελέχη, υπό συνθήκες στρες, αναγκάζονται να αλλάξουν τη λειτουργία του κυττάρου τους έτσι ώστε να διατηρηθούν οι φυσιολογικές λειτουργίες τους και να μπορέσουν να επιβιώσουν. Μία άλλη έρευνα (Olaimat et al. 2018), έδειξε πως η έκθεση βακτηριακών στελεχών της *L. monocytogenes* σε χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή συγκέντρωση άλατος, αύξησε την ανθεκτικότητα τους σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά της *L. monocytogenes* βελτιώθηκε, όταν η συγκέντρωση άλατος αυξήθηκε από το 6% στο 12%, και η θερμοκρασία έπεσε στους 10 °C. Μια ακόμη έρευνα ανέφερε πως η έκθεση κυττάρων της *L. monocytogenes* που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης, σε υπεροξειδίο του υδρογόνου συγκέντρωσης 600 ppm, (ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιμικροβιακό), και υπό θέρμανση στους 45 °C, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητάς τους στα αντιβιοτικά πενικιλίνη, αμπικιλίνη, τετρακυκλίνη, χλωραμφενικόλη, και σουλφαμεθοξαζόλη (Olaimat et al. 2018).

Τα πολυανθεκτικά στελέχη οφείλονται στην δράση των efflux pumps;

Αν και η επιρροή των efflux pumps στην αντοχή της *L. monocytogenes* ενάντια στις πρακτικές που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, έχει ελάχιστα διερευνηθεί, υπάρχουν ενδείξεις ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Λόγω της ικανότητας των efflux pumps να αποβάλλουν παραπάνω από ένα είδος αντιμικροβιακού παραγοντα, συνδέονται στενά με το φαινόμενο της πολυανθεκτικότητας. Το να διερευνηθεί η δυναμικότητα των efflux πρωτεϊνών της *L. monocytogenes* και συγκεκριμένα τα αντιμικροβιακά που αποβάλλουν, είναι ένας παράγοντας “κλειδί ” για να κατανοηθεί ο τρόπος με τον οποίο εξαπλώνεται η ανθεκτικότητα στα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. (Komora et al.2017). Είναι προφανές ότι η διασπορά της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά διαμέσου της αλυσίδας τροφίμων είναι ένα πολύπλοκο θέμα που πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο, για να μπορέσει να διασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων. Επίσης παραπάνω έρευνες πρέπει να εξαχθούν για το πως σχετίζεται η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και αντιμικροβιακά, με την ανθεκτικότητα σε στρεσογόνους παράγοντες (Θερμικό στρες, pH, aw) των τροφιμογενών παθογόνων. Διότι αυτά τα δύο είδη ανθεκτικότητας, συναντώνται πάντοτε, στα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων (Komora et al.2017).

Παράγοντες που επηρεάζουν την ανθεκτικότητα της *Listeria monocytogenes* στα αντιβιοτικά:

Η αντιβιοτική αντοχή, αναπτύσσεται στα βακτήρια με διάφορους τρόπους. Κάποια βακτήρια εμφανίζονται εκ φύσεως ανθεκτικά σε κάποια είδη αντιβιοτικών, ενώ κάποια άλλα αποκτούν την ανθεκτικότητα με διαφόρων ειδών τροποποιήσεις, στο γενετικό τους υλικό. Είναι σημαντικό να τονιστεί, πως όσο αυξάνεται η προσαρμοστικότητα των βακτηρίων στους διάφορους στρεσογόνους παράγοντες του περιβάλλοντος, τόσο είναι πιθανό να αυξηθεί και η ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά. Η *L.monocytogenes* είναι ένα βακτήριο με μεγάλη προσαρμοστικότητα και η παρουσία της είναι συχνή στην αλυσίδα τροφίμων. Επίσης, η δυνατότητα του μικροοργανισμού, να δημιουργεί βιοφίλμ, κάνει πολύ δύσκολη την καταπολέμησή του. Επομένως είναι αναπόφευκτο, το συγκεκριμένο βακτήριο να έρχεται σε επαφή συχνά και για μεγάλες χρονικές περιόδους, με αντιβιοτικά και αντιμικροβιακά που χρησιμοποιούνται στα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Αυτή η συνεχής και χρόνια έκθεση της *L.monocytogenes* σε μικρές ποσότητες αντιμικροβιακών, μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά της απέναντι στα αντιβιοτικά. Τα στελέχη της *L.monocytogenes* που βρίσκονται στα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, προκειμένου να επιβιώσουν των διαφόρων επεξεργασιών που υφίστανται τα τρόφιμα όπως θέρμανση, υψηλή πίεση, ακτινοβολία, χημικά συντηρητικά, αλλά ακόμα και από την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα, πρέπει να αλλάξουν τον τρόπο λειτουργίας των κυττάρων τους. Αυτή η ανάγκη για επιβίωση, είναι που προκαλεί την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των μικροοργανισμών, ακόμα κι αν υπάρχουν σε διαφορετικά είδη. (Olaimat et al. 2018).

Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως η χαμηλή ενεργότητα ύδατος, το χαμηλό pH, η ωσμωτική πίεση και οι χαμηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται στη συντήρηση των τροφίμων, προκαλούν τη μετακίνηση πλασμιδίων μεταξύ μικροοργανισμών και το γεγονός που προκαλεί ανησυχία είναι πως η ανταλλαγή μπορεί να συμβεί μεταξύ παθογόνων και μη παθογόνων στελεχών. Χάρη στην παρουσία των κινητών γενετικών στοιχείων, η *L.monocytogenes* μπορεί να δανειστεί γενετικό υλικό από gram-θετικά, αλλά και gram-αρνητικά βακτήρια. Η ανταλλαγή μπορεί να συμβεί σε δυσπρόσιτα μέρη των εργοστασίων επεξεργασίας τροφίμων, που γειτνιάζουν διαφορετικά είδη ανθεκτικών βακτηρίων. Έχει επίσης παρατηρηθεί πειραματικά, αλλά και σε δείγμα ξινογαλακτος, ότι μπορεί να μεταφερθεί γενετικό υλικό από τα γαλακτικά βακτήρια στην *L.monocytogenes*. Επομένως ακόμα και η επιθυμητή μικροβιακή χλωρίδα των τροφίμων, μπορεί να προσδώσει σε ένα

παθογόνο, μη επιθυμητές ιδιότητες. Ένα άλλο πιθανό περιβάλλον ανταλλαγής γονιδίων μεταξύ μικροοργανισμών είναι στον εντερικό σωλήνα των κρεατοπαραγωγικών ζώων. Στελέχη της *L.monocytogenes*, που μπορεί να βρεθούν στο έντερο, λόγω κατανάλωσης επιμολυσμένης τροφής, μπορούν να ανταλλάξουν γενετικό υλικό με τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου. Η συνεχής χορήγηση μικρών δόσεων αντιβιοτικών στα κρεατοπαραγωγικά ζώα, βοηθά εν τέλει στην ανάπτυξη και εκλεκτική επιβίωση στελεχών, που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά (Olaimat et al. 2018).

Ένας από τους πιο προφανείς παράγοντες που είναι υπεύθυνος για την επιβίωση πολλών βακτηρίων κάτω από τις συνθήκες στρες που προκαλούνται στα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, είναι η πρωτεΐνη *Sigma factor B*. Ο παράγοντας *Sigma B* (σ^B), είναι μια πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται στην έναρξη της μεταγραφής. Δημιουργεί εκλεκτικούς δεσμούς της RNA πολυμεράσης με εκκινητές γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα gram θετικά βακτήρια. Ο *Sigma factor B* φαίνεται να είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση 18 γονιδίων που συμβάλλουν στην ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και προσδίδουν ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη στην *L.monocytogenes* (Olaimat et al. 2018).

Η *L. monocytogenes* διαθέτει επίσης το σύστημα μεταγωγής σήματος δύο συστατικών (2CSTS) (two-component signal transduction systems), το οποία παίζει ρόλο στην ανταπόκριση του μικροοργανισμού στους διάφορους στρεσογόνους παράγοντες. Το 2CSTS σύστημα, αποτελείται από μια μεμβράνη στην οποία έχει προσδεθεί ένας αισθητήρας που ανιχνεύει το στρες και έναν ρυθμιστή της μεταγραφής που είναι υπεύθυνος για την ανταπόκριση στο στρες (Olaimat et al. 2018). Το σύστημα 2CTTS συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στις β-λακτάμες και σε ορισμένους τύπους κεφαλοσπορινών. (Olaimat et al. 2018). Μια έρευνα των Bergholz, Tang, Wiedmann, and Boor το (2013) έδειξε ότι, η έκθεση της *L. monocytogenes* σε περιβάλλον με (6% NaCl) και θερμοκρασία (4 °C) οδήγησε σε αυξημένη ανθεκτικότητα του οργανισμού στο αντιμικροβιακό νισίνη και αυτό προκλήθηκε από ενεργοποίηση των 2CSTS (Olaimat et al. 2018).

(Μεταγωγή σήματος, είναι μια διαδικασία με την οποία, το κύτταρο λαμβάνει σήματα από το περιβάλλον, τα μετατρέπει σε ενδοκυτταρικά σήματα τα οποία ενεργοποιούν κυτταρικούς μηχανισμούς, που ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Τελική συνέπεια είναι η αλλαγή της φυσιολογίας του κυττάρου.)

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά σε ΗΠΑ και Ευρωπαϊκή Ένωση:

WHO: Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organisation), είναι αυτόνομος διεθνής διακρατικός οργανισμός που αποτελεί εξειδικευμένη υπηρεσία του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών (ΟΗΕ), και ασχολείται με τη διεθνή δημόσια υγεία.

FDA: Το FDA ή η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων είναι κυβερνητική υπηρεσία που λειτουργεί υπό το υπουργείο Υγείας και Ανθρωπίνων Υπηρεσιών των Ηνωμένων Πολιτειών (HHS). Η FDA είναι πρωταρχικά υπεύθυνη για τη ρύθμιση των ιατρικών προϊόντων και του καπνού, των τροφίμων και της κτηνιατρικής, καθώς και των παγκόσμιων ρυθμιστικών λειτουργιών και πολιτικής.

CDC: Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention - CDC), είναι το κορυφαίο εθνικό ινστιτούτο δημόσιας υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών. Το CDC είναι μια ομοσπονδιακή υπηρεσία των Ηνωμένων Πολιτειών υπό το Υπουργείο Υγείας και Ανθρωπίνων Υπηρεσιών. Ο κύριος στόχος του είναι να προστατεύσει τη δημόσια υγεία και ασφάλεια μέσω του ελέγχου και της πρόληψης ασθενειών, στις ΗΠΑ και διεθνώς.

EFSA: Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων, (European Food Safety Authority), παρέχει ανεξάρτητες επιστημονικές γνωμοδοτήσεις για κινδύνους που σχετίζονται με τα τρόφιμα. Οι γνωμοδοτήσεις αυτές αποτελούν τη βάση για τη θέσπιση νόμων και κανόνων καθώς και για τη χάραξη πολιτικών της ΕΕ, και με τον τρόπο αυτό προστατεύονται οι καταναλωτές από κινδύνους στην τροφική αλυσίδα.

European Medicines Agency: Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων, (EMA),

Ο EMA εγγυάται την επιστημονική αξιολόγηση, την εποπτεία και την παρακολούθηση της ασφάλειας φαρμάκων για τους ανθρώπους και τα ζώα στην ΕΕ.

The U.S. Government Accountability Office (GAO): Είναι μια κυβερνητική υπηρεσία που διεξάγει έρευνες για το κογκρέσο των Ηνωμένων Πολιτειών.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), συστήνει την μείωση της χρήσης αντιβιοτικών στα ζώα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Εξαιτίας της εμφάνισης των ανθεκτικών βακτηρίων, ο (WHO) προτείνει να απαγορευτούν τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για πάχυνση των ζώων. Για τα ζώα, τα οποία χρειάζονται αντιβιοτική θεραπεία προτείνει, να τους χορηγούνται αντιβιοτικά που θέτουν την ανθρώπινη υγεία σε μικρότερο κίνδυνο.

Έχει κριθεί από διάφορους αρμόδιους φορείς, πως είναι σωστή η ανάγκη να περιοριστούν τα αντιβιοτικά στη ζωική παραγωγή, αλλά όχι η ολική απαγόρευση τους. Και αυτό γιατί, μια ολική απαγόρευση των αντιβιοτικών σε παγκόσμιο επίπεδο, μπορεί να μειώσει δραματικά την επάρκεια σε πρωτεΐνη σε πολλά μέρη του κόσμου. Όταν τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται σε δόσεις μικρότερες από τη θεραπευτική, δηλαδή ως αυξητικοί παράγοντες και για καλύτερη αφομοίωση της τροφής, τότε το κόστος του κρέατος, των αυγών και άλλων ζωικών προϊόντων παραμένουν χαμηλά. Οπότε η ολική απαγόρευση των αντιβιοτικών μπορεί να επιβαρύνει οικονομικά τους παραγωγούς κρέατος και κατ'επέκταση τους καταναλωτές, γιατί το κόστος των ζωικών προϊόντων θα είναι τόσο υψηλό, που ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού δεν θα μπορεί να τραφεί επαρκώς. Επίσης, είναι σίγουρο ότι θα υπάρξουν αρνητικές επιπτώσεις στην παγκόσμια οικονομία. Σε μια έρευνα ανάλυσης του οικονομικού κόστους, υπολογίζεται ότι αν ο FDA απαγορεύσει ολικά τη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, θα κοστίζει στους καταναλωτές περίπου 1.2 με 2.5 δισεκατομμύρια δολάρια το χρόνο. Για να μπορέσουμε όμως να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την πραγματική επίπτωση στην οικονομία, πρέπει να συγκρίνουμε το κόστος που θα προκαλέσει η απουσία των αντιβιοτικών σε σχέση με τα οφέλη στην υγεία του πληθυσμού. Εφόσον είναι δύσκολο να μετρηθεί η αξία της υγείας με νούμερα, οι περισσότερες έρευνες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει καθαρή εικόνα για τις οικονομικές επιπτώσεις της απαγόρευσης καθώς αυτό εξαρτάται και από την οικονομική δύναμη της κάθε χώρας.

Ο WHO, ορίζει το θέμα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά ως την αιτία για τη μεγάλη παραμονή των ασθενών στα νοσοκομεία, και το υψηλό κόστος των θεραπευτικών αγωγών.

Διότι, όταν οι ασθένειες δεν μπορούν πλέον να θεραπευτούν με τα τυπικά αντιβιοτικά, πρέπει να χρησιμοποιηθούν πιο ακριβές θεραπείες και οι αρμόδιοι φορείς να δαπανήσουν χρήματα για περαιτέρω έρευνες και εναλλακτικές λύσεις. Επίσης, όταν ο χρόνος που απαιτείται για την ανάρρωση, μεγαλώνει εξαιτίας των ανθεκτικών βακτηρίων, αυξάνεται και το κόστος της ιατρικής περίθαλψης και αυτό δημιουργεί μεγάλο οικονομικό βάρος για τις οικογένειες των ασθενών και τις κοινωνίες σε μεγάλη κλίμακα. (Rasberry 2013).

Διεθνείς κανονισμοί:

Λόγω των δυσμενών επιπτώσεων που έχει προκαλέσει το φαινόμενο των πολυανθεκτικών βακτηρίων στην παγκόσμια υγεία, ο τρόπος χρήσης των αντιβιοτικών έχει βελτιωθεί σε πολλές χώρες του κόσμου αν και μερικές παραμένουν απρόθυμες, κυρίως για οικονομικούς λόγους. Οι δύο κυριότερες επιτεύξεις που συμβάλλουν σε αυτή τη βελτίωση, είναι το ότι οι

παραγωγοί της βιομηχανίας κρέατος, μπορούν να έχουν πρόσβαση στα αντιβιοτικά, μόνο αφού συνταγογραφηθούν από κτηνίατρο. Και δεύτερον το ότι έχουν διερευνηθεί οι ακριβείς χρόνοι που απαιτούνται για το μεταβολισμό του κάθε αντιβιοτικού από τα ζώα. Τηρουμένων αυτών των περιόδων πριν προχωρήσουν στη σφαγή και το άρμεγμα, οι κτηνοτρόφοι μπορούν να εγγυηθούν ότι το κρέας, το γάλα, ή τα αυγά που παράγουν είναι ασφαλή και ελεύθερα από επιβλαβείς ουσίες. Βέβαια, υπό τους φρενήρεις ρυθμούς της μαζικής παραγωγής και υπό το ανταγωνιστικό περιβάλλον των επιχειρήσεων, κατα πόσο μπορούν να τηρηθούν αυτά τα μέτρα;

Ευρωπαϊκή Ένωση:

Στην Ευρώπη, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνταν ως αυξητικοί παράγοντες στις ζωοτροφές από το 1950 περίπου. Όμως, η χρήση τους για αυτό το σκοπό, απαγορεύτηκε από την Ε.Ε, τον Ιανουάριο του 2006 με τη βοήθεια ενός προγράμματος διαχείρισης που είχε ξεκινήσει από το 1999. Η Ευρωπαϊκή Ένωση απαγόρευσε τη χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικούς παράγοντες, την 1η Ιανουαρίου 2006, με τον *Κανονισμό (EC) No 1831/2003*. Στη Γερμανία, 1.734 τόνοι αντιμικροβιακών ουσιών χρησιμοποιούνταν στη ζωική παραγωγή το 2011, ενώ 800 τόνοι χορηγούνταν για ανθρώπινη κατανάλωση. Η Σουηδία απαγόρευσε τη χρήση τους το 1986 και η Δανία άρχισε να τα περιορίζει από το 1994, και σήμερα χρησιμοποιεί 60% λιγότερα απ ότι πριν. Στις Κάτω Χώρες, η χρήση των αντιβιοτικών για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών αυξήθηκε, μετά την απαγορευση τους το 2006. (Rasberry 2013).

Ελλάδα:

Δεν υπάρχουν δεδομένα για τη χρήση των αντιβιοτικών στις κρεατοπαραγωγικές φάρμες, στην Ελλάδα. Η Ελλάδα είναι ένα από τα δύο κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, που δεν παρουσιάζει καθόλου δεδομένα στον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA), για τα επίπεδα πώλησης αντιβιοτικών για κτηνιατρικό σκοπό. (Το άλλο είναι η Μάλτα). Δεδομένα πωλήσεων από όλα τα άλλα κράτη-μέλη, δημοσιεύονται κάθε χρόνο από τον EMA, ως μέρος του προγράμματος που έχει ορίσει ο ESVAC, (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption). Υπάρχουν δύο κύριοι λόγοι, για να θεωρείται υψηλή η χρήση αντιβιοτικών στην Ελλάδα στις κρεατοπαραγωγικές φάρμες. Πρώτον, από τις 29 χώρες που δίνουν αναφορά στον ESVAC, αυτές με τα υψηλότερα επίπεδα αντιβιοτικής χρήσης είναι η Ισπανία, που ακολουθείται από τη Κύπρο κι έπειτα την Ιταλία και την Πορτογαλία. Δηλαδή χώρες της νότιας Ευρώπης. Δεύτερον, η Ελλάδα δίνει αναφορά για τα ποσοστά αντιβιοτικής

αντοχής στις κρεατοπαραγωγικές φάρμες σε Ευρωπαϊκά ιδρύματα, και αυτά δημοσιεύονται κάθε χρόνο από τον EFSA και το ECDC. Η πιο πρόσφατη αναφορά περιελάμβανε δεδομένα για την παρουσία ανθεκτικής *E. coli* και *Campylobacter* στα κοτόπουλα. Και στις δύο περιπτώσεις τα δείγματα από την Ελλάδα βρίσκονταν στις πρώτες θέσεις των ποσοστών ανθεκτικότητας. Ως συμπέρασμα, λαμβάνεται το γεγονός ότι η αντιβιοτική χρήση τουλάχιστον στα κοτόπουλα, είναι αρκετά υψηλή.

Στην Ελλάδα, έχουν εγκριθεί κανόνες για τον περιορισμό της χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, με στόχο να ελαττωθεί η παρουσία των ανθεκτικών βακτηρίων. Η προληπτική χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών θα περιοριστεί και θα γίνεται σε μεμονωμένες περιπτώσεις ζώων και μόνο όταν δικαιολογείται από κτηνίατρο και υπάρχει υψηλός κίνδυνος μόλυνσης. Η συλλογική θεραπεία επιτρέπεται μόνο όταν υπάρχει κατάλληλη αιτιολόγηση από κτηνίατρο και δεν υπάρχει εναλλακτική επιλογή. Τα κτηνιατρικά φάρμακα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για να αντικαθιστούν τις κακές συνθήκες της κτηνοτροφίας, ούτε για την ταχύτερη ανάπτυξη των ζώων. Ο στόχος είναι να τεθούν πρότυπα για εισαγωγές στην Ε.Ε., δηλαδή, κατά την εξαγωγή προϊόντων διατροφής στην Ε.Ε., οι εμπορικοί εταίροι, να τηρούν τα πρότυπα της Ε.Ε. όσον αφορά στην χρήση αντιβιοτικών. Όσον αφορά στις φαρμακούχες ζωοτροφές, έχει απαγορευτεί η προληπτική και συλλογική τους χρήση. Οι συνταγές για φαρμακευτικές τροφές με αντιβιοτικά θα πρέπει να εκδίδονται πλέον από κτηνιάτρους μετά από κατάλληλη εξέταση.

Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής:

Το 1970 ο FDA, συνέστησε για πρώτη φορά πως η χρήση αντιβιοτικών στις ζωοτροφές πρέπει να μειωθεί, αλλά δεν έθεσε κανένα περιορισμό για να το υποστηρίξει. Το 2001, υπολογίστηκε ότι το 70% των αντιβιοτικών που καταναλώνονται στις Ηνωμένες πολιτείες, δίνονται στη ζωική παραγωγή, (συγκεκριμένα στα κοτόπουλα, το χοιρινά και τα βοοειδή), για τον περιορισμό των λοιμώξεων. Έτσι το 2004, ο Government Accountability Office (GAO), κατηγόρησε το FDA που δεν έχει συλλέξει επαρκείς πληροφορίες για το τί ακριβώς συμβαίνει με την χρήση των αντιβιοτικών στις κρεατοπαραγωγικές φάρμες. Ως απάντηση, ο FDA είπε ότι χρειαζόταν να εξαχθεί περαιτέρω έρευνα και εθελοντικές προσπάθειες, εκ των έσω της βιομηχανίας, για να λυθεί το πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Μέχρι το 2011, 13.6 εκατομμύρια κιλά αντιμικροβιακών ουσιών, πωλήθηκαν για χρήση στα κρεατοπαραγωγικά ζώα στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 80% δηλαδή του συνόλου των

αντιβιοτικών που πουλήθηκαν συνολικά. Το 2012 ο FDA δημιούργησε ένα εθελοντικό πρόγραμμα, για να αντιμετωπιστεί η ανεξέλεγκτη χρήση των αντιβιοτικών ως πρόσθετα ζωοτροφών και να χρησιμοποιούνται πλέον μόνο υπό την επίβλεψη κτηνιάτρου και με τις εγκεκριμένες μεθόδους. Τελικά το 2015, ενέκρινε έναν οδηγό χρήσης που δίνει συμβουλές στις φαρμακευτικές εταιρείες, στους κτηνιάτρους και στους παραγωγούς για το πως να χορηγήσουν τα κατάλληλα φάρμακα στα ζώα, μέσω της τροφής και του νερού τους. Την ίδια εποχή, δημοσίευσε μία μελέτη πάνω στις θεραπευτικές ουσίες που πωλούνται για την κτηνοτροφία, που έδειχνε ότι μεταξύ του 2009 και του 2013, το 60% αυτών ήταν αντιβιοτικά που έχουν θεραπευτική χρησιμότητα στον άνθρωπο και το υπόλοιπο ανήκε σε τάξεις φαρμάκων που δεν χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο, όπως διάφορα ιονοφόρα. Ως επακόλουθο, ο FDA ζήτησε από τις φαρμακευτικές εταιρείες, να αφαιρέσουν την ένδειξη “αυξητικός παράγοντας” από τις αντιβιοτικές ουσίες. Αυτές οι νέες τροποποιήσεις που έγιναν το 2017 καθιστούσαν παράνομη τη χρήση των μετονομασμένων φαρμάκων για μη θεραπευτικούς σκοπούς. Ως αποτέλεσμα αυτής της δράσης σημειώθηκε μια μείωση της τάξης του 33% από το 2016 ως το 2017 στις πωλήσεις πολλών σημαντικών αντιβιοτικών για χρήση στη κτηνοτροφία. Παρόλες τις βελτιώσεις, η κοινή γνώμη παραμένει προβληματισμένη, γιατί οι πωλήσεις των αντιβιοτικών στις βιομηχανίες παραγωγής βοδινού κρέατος και χοιρινού παρέμειναν πολύ υψηλές το 2017, σε σχέση με τις βιομηχανίες πουλερικών. Παρόλα αυτά, διάφορες κυβερνητικές οργανώσεις των Ηνωμένων Πολιτειών όπως, η National Pork Board, δηλώνουν ότι, η πλειοψηφία των παραγωγών, χρησιμοποιούν τα αντιβιοτικά με τον εγκεκριμένο τρόπο. Το U.S. Government Accountability Office, υποστηρίζει ότι η κυβέρνηση δεν έχει συλλέξει επαρκή δεδομένα για να παρθεί μια απόφαση για τις ορθές πρακτικές. Επίσης δεν υπάρχει κάποια ρυθμιστική αρχή στις Ηνωμένες Πολιτείες που να συλλέγει συστηματικά λεπτομερή δεδομένα για την χρήση των αντιβιοτικών σε ανθρώπους και ζώα, που σημαίνει πως δεν είναι ξεκάθαρο ποιά αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για ποιό σκοπό και για πόσο χρονικό διάστημα. Ο U.S. poultry meat sector, (τομέας παραγωγής κρέατος πουλερικών των Ηνωμένων Πολιτειών), πήρε την πρωτοβουλία να συλλέξει δεδομένα εθελοντικά και έχει εκδόσει συγκριτικές έρευνες που δείχνουν πολύ σημαντικές μειώσεις στη χρήση αντιβιοτικών. Συγκεκριμένα, η έρευνα έδειξε πως υπήρξε μείωση της τάξης του 95% στη χρήση τετρακυκλινών στις τροφές των νεαρών κοτόπουλων από το 2013 ως το 2017, μια 67% μείωση των τετρακυκλινών στις γαλοπούλες, και μια πτώση του 42% της χρήσης της γενταμυκίνης στα εκκολαπτήρια των γαλοπούλων. (Rasberry L., 2013).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Eng, S., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N., Ser, H., Chan, K., Lee, H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance, *Frontiers in Life Science*, Vol. 8, No. 3, pp. 284–293, <http://dx.doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J., Rota, C., Ariño, A., Yangüela, J., (2014). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment, *Food microbiology*, 42, pp. 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.017>
- Komora, N., Bruschi, C., Magalhães, R., Ferreira, V., Teixeira, P. (2017). Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses, *International Journal of Food Microbiology*, 245, pp. 79-87. <https://www.sciencedirect.com/science/journal/01681605>
- Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2010). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. (Β. Σπηλιώτης, & Ι. Γιαβάσης, Επιμ.). Σελ. 124-129, 136-143, 192-199, Αθήνα: Ίων.
- Olaimat, A., Al-Holy, M., Shahbaz, H., Al-Nabulsi, A., Abu Ghoush, M., Osaili, T., Ayyash, M. and R. Holley (2018). Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from Food Products: A Comprehensive Review, *Institute of Food Technologists*, 17, doi: 10.1111/1541-4337.12387
- Quinn, T., Bolla, J., Fanning, J. and S. (2007). Antibiotic-resistant *Campylobacter*: could efflux pump inhibitors control infection?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, pp. 1230–1236, doi:10.1093/jac/dkl470

- Saenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., and Torres, C. (2004) Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, pp. 3996–4001, Doi: 10.1128/AAC.48.10.3996–4001.2004
- Shamloo, E., Hosseini, H., Moghadam, A., Halberg Larsen, Z., Haslberger, A. and Alebouyeh, M. (2019). Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance, *Iranian Journal of Veterinary Research*, Vol. 20, No. 4, Ser. No. 69, pp. 241-254.
- White, D., Zhao S., Simjee, S., Wagner, D., McDermott, P., (2002). Antimicrobial resistance of foodborne pathogens, *Microbes and Infection*, 4 ,pp. 405–412.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα (2005). *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*. Retrieved 25 Νοεμβρίου, 2020.
- Κατσιμιλή Μ. (2021). *Listeria monocytogenes* στα τυριά (Αδημοσίευτη Πτυχιακή εργασία). Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα.
- Πρίντζη Α. (2013). Μελέτη οριακών συνθηκών οξεοανθεκτικότητας του παθογόνου *L.monocytogenes* (Αδημοσίευτη μεταπτυχιακή εργασία). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Σακοράφα Χ. (2012). Διερεύνηση Αντιβιοαντοχής *S.Aureus* και *Streptococcus spp.* από βιολογικό και συμβατικό πρόβειο και αίγιο γάλα (Αδημοσίευτη Πτυχιακή εργασία). Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.
- Βαλαβανίδης, Θ., Ευσταθίου Κ. (2012). Η χημική ένωση του μήνα. Τμήμα Χημείας. Ανακτήθηκε 20 Μαΐου, 2020, από http://195.134.76.37/chemicals/chem_icilin.htm
- Rasberry L. (2013). Antibiotic use in livestock .Ανακτήθηκε 19 Απριλίου, 2021, από https://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotic_use_in_livestock#References