

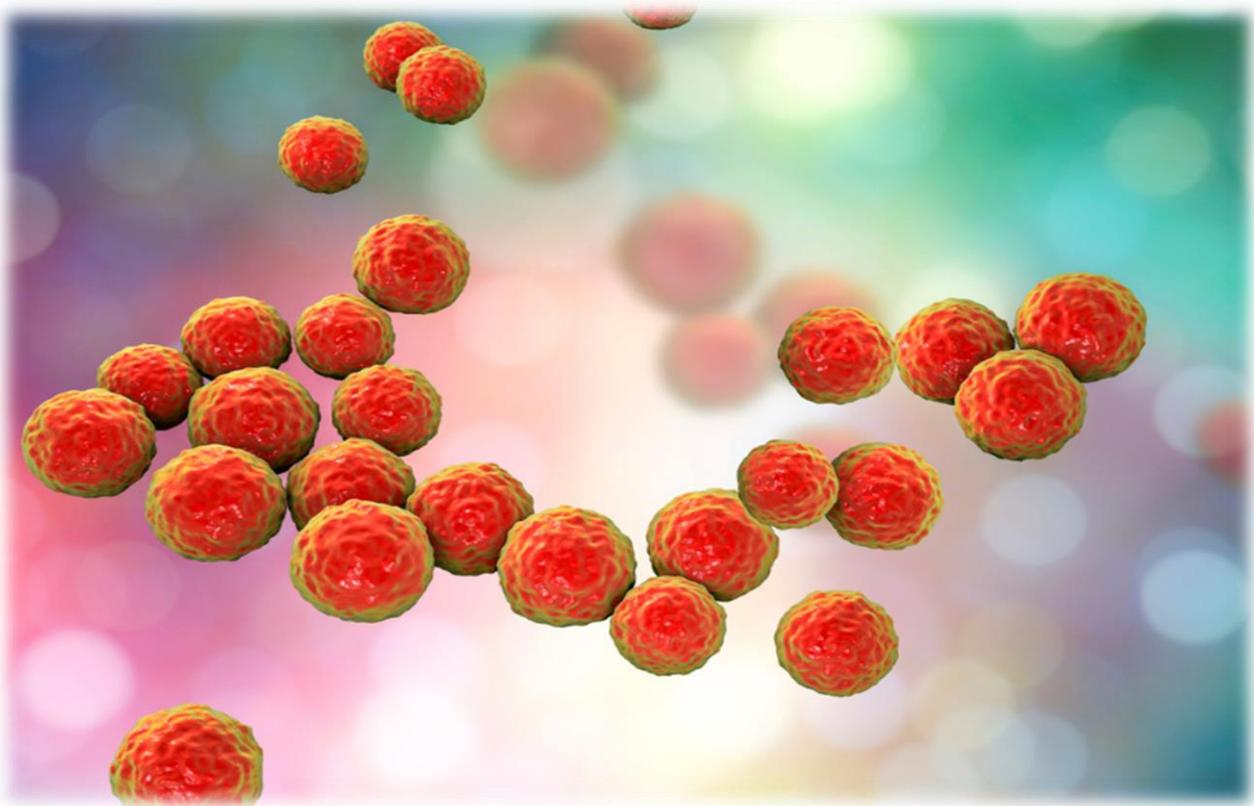


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

«ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ»



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΑΝΘΙΜΙΑ ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ: ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΟΣΚΙΝΑ & ΚΩΝ/ΝΑ ΜΠΟΥΓΙΑ

Α.Μ.: 16153 & 16144

ΑΘΗΝΑ, 2022

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, 2021

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Α. Μπατρίνου, Επίκουρη Καθηγήτρια

2. Επιβλέπων Καθηγητής

Σ. Κοντελής, Επίκουρος Καθηγητής

3. Επιβλέπων καθηγητής

Φ. Μάντης, Επίκουρος Καθηγητής

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνουμε υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαστε οι αποκλειστικές συγγραφείς 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. Δηλώνουμε, επίσης, ότι λαμβανουμε τις συνέπειες όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Μπούγια Κωνσταντίνα



Κοσκινά Δήμητρα



Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Μοντέλο του κυτταρικού τοιχώματος του εντερόκοκκου (DebRoy et al., 2014).....	14
Εικόνα 2: Βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης (DebRoy et al., 2014).....	16
Εικόνα 3: Εντερόκοκκος με χρώση κατά gram (National Library of Medicine, 2013).	22
Εικόνα 4: Enterococcus faecalis με χρώση κατά gram σε καλλιέργεια αίματος (National Library of Medicine, 2013).....	26

Περιεχόμενα

Κατάλογος εικόνων	3
Abstract	7
Εισαγωγή.....	8
Κεφάλαιο 1: Χαρακτηριστικά του γένους <i>Enterococcus</i>	10
1.1 Ορισμός.....	10
1.2 Ιστορική αναδρομή.....	11
1.3 Επιδημιολογία και Κατανομή στη Φύση των Εντερόκοκκων	12
1.4 Δομή Εντερόκοκκων	13
1.5 Χαρακτηριστικά στοιχεία εντερόκοκκων.....	21
1.6 Ταξινόμηση	23
1.7 Οι εντερόκοκκοι ως παθογόνα.....	25
1.7.1 Κλινική επιδημιολογία	25
1.7.2 Παράγοντες που καθορίζουν την αυξανόμενη ιογένεια των εντερόκοκκων.....	26
Κεφάλαιο 2: Εντερόκοκκοι και τρόφιμα	28
2.1 Ψάρια	28
2.2 Λαχανικά και Φρούτα	31
2.3 Γάλα και Γαλακτομικά προϊόντα	34
2.4 Κρέας.....	37
2.5 Νερό.....	40
2.6 Μέθοδοι ανίχνευσης των εντερόκοκκων στα τρόφιμα.....	42
Κεφάλαιο 3: Αντοχή των Εντερόκοκκων στα Αντιμικροβιακά	48
3.1 Αντοχή στις Αμινογλυκοσίδες.....	48
3.2 Αντοχή στις β-λακτάμες.....	52
3.3 Αντοχή στην βανκομυκίνη και μηχανισμοί αντοχής	55
3.4 Τύποι αντοχής στην βανκομυκίνη	60
Κεφάλαιο 4: Κανόνες Ε.Ε., Υγιεινή και Τρόποι Αντιμετώπισης	65
4.1 Κανόνες Ευρωπαϊκής Ένωσης.....	65
4.2 Υγιεινή για την αποφυγή Εντερόκοκκων	72
4.3 Ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις.....	77
4.4 Τρόποι αντιμετώπισης.....	84
Συμπεράσματα	89
Βιβλιογραφία.....	91

Περίληψη

Οι εντερόκοκκοι ή αλλιώς εντερικοί κόκκοι είναι μικροοργανισμοί και ειδικότερα βακτήρια γαλακτικοί οξέος. Επιπλέον, είναι προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που διατάσσονται μεμονωμένα ιδανικά όμως αναπτύσσονται στους 35°C και δεν σχηματίζουν σπόρους. Αποτελούν σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα λόγω της εγγενούς ανθεκτικότητάς τους σε πολλά αντιμικροβιακά καθώς και της ικανότητάς τους να αποκτούν νέους μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Μεταξύ των εντεροκοκκικών ειδών, ο *Enterococcus faecalis* και ο *Enterococcus faecium* είναι τα πιο συχνά απαντώμενα.

Οι εντερόκοκκοι απαντούν συνήθως σε μεγάλους αριθμούς σε λαχανικά και τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως τα ζυμωμένα λουκάνικα και τα τυριά. Στα επεξεργασμένα κρέατα, οι εντερόκοκκοι δεν είναι επιθυμητοί λόγω της αλλοίωσης που προκαλούν, ενώ αντίθετα έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών κατά την ωρίμανση πολλών τυριών.

Η νόσος από εντερόκοκκο προκαλεί λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα, βακτηριαιμία, εκκολπωματίτιδα και μηνιγγίτιδα. Ωστόσο, αυτές οι λοιμώξεις μπορούν να αντιμετωπιστούν από πλευρά ιατρικής με διάφορα αντιβιοτικά, με σπάνιες περιπτώσεις αυτά τα βακτήρια να είναι ανθεκτικοί σε αυτά. Τις τελευταίες δεκαετίες οι εντερόκοκκοι έχουν αναδειχθεί σε σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και σε μονάδες εντατικής θεραπείας.

Λέξεις-κλειδιά: Εντερόκοκκοι, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, αντιμικροβιακή αντοχή, τρόφιμα.

Abstract

Enterococci, or intestinal granules, are microorganisms and in particular lactic acid bacteria. In addition, they are optionally anaerobic bacteria that are arranged individually but ideally grow at 35°C and do not form spores. They are important nosocomial pathogens due to their intrinsic resistance to many antimicrobials as well as their ability to acquire new resistance mechanisms. Among the enterococcal species, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are the most frequently encountered.

Enterococci are commonly found in large numbers in cabbage and foods of animal origin, such as fermented sausages and cheeses. In processed meats, enterococci are undesirable because of the spoilage they cause, but they play an important role in the development of organoleptic characteristics during the ripening of many cheeses.

Enterococcal disease causes urinary tract infection, bacterial endocarditis, bacteremia, diverticulitis and meningitis. However, these infections can be treated medically with various antibiotics, with rare cases of these bacteria being resistant to them. In recent decades, enterococci have emerged as important nosocomial pathogens in immunosuppressed patients and intensive care units.

Keywords: Enterococci, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Antimicrobial resistance, food.

Εισαγωγή

Οι εντερόκοκκοι είναι μια ευπροσάρμοστη ομάδα βακτηρίων που απαντάται σε διάφορα ενδιαιτήματα, τα οποία κυμαίνονται από την παρουσία τους στο γαστρεντερικό σωλήνα των θηλαστικών και άλλων οργανισμών μέχρι το περιβάλλον, όπου έχουν εντοπιστεί στο έδαφος, το νερό και τα τρόφιμα. Είναι επίσης αξιοσημείωτα ανθεκτικά και μπορούν να αντέξουν δραστικές αλλαγές στο περιβάλλον τους, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων θερμοκρασίας, αλατότητας, pH και διαθέσιμων θρεπτικών ουσιών (Klage, Werner, & Witte, 2001). Η ικανότητα των εντερόκοκκων να ανταποκρίνονται γρήγορα στις συνθήκες ανάπτυξης και περιβάλλοντος επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό με τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης.

Οι εντερόκοκκοι βρίσκονται φυσιολογικά στον πεπτικό σωλήνα και προκαλούν λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, βακτηριαιμία και ενδοκαρδίτιδα. Απομονώνονται επίσης συχνά από λοιμώξεις της κοιλιάς, της πύελου, της χοληφόρου οδού και των τραυμάτων, περιβάλλοντα στα οποία η πολυμικροβιακή χλωρίδα είναι κοινή. Οι εντερόκοκκοι προκαλούν σπανιότερα λοιμώξεις άλλων περιοχών, για παράδειγμα, των οστών, των αρθρώσεων και των μηνίγγων. Ο *E. faecalis* προκαλεί την πλειονότητα των εντεροκοκκικών λοιμώξεων συνολικά, ενώ ο *E. faecium* προκαλεί σημαντικό ποσοστό εντεροκοκκικών λοιμώξεων, ιδίως λοιμώξεων που αποκτώνται στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Δεδομένα που συλλέχθηκαν από το Εθνικό Σύστημα Επιτήρησης Νοσοκομειακών Λοιμώξεων σχετικά με λοιμώξεις σε ασθενείς σε μονάδες εντατικής θεραπείας από το 1989 έως το 1998 έδειξαν ότι οι εντερόκοκκοι ήταν το τρίτο πιο συχνό απομονωμένο άτομο από την κυκλοφορία του αίματος, το τρίτο πιο συχνό απομονωμένο άτομο από τα ούρα, το πιο συχνό απομονωμένο άτομο από λοιμώξεις χειρουργικών περιοχών και το τέταρτο πιο συχνό απομονωμένο άτομο από όλες τις περιοχές (Gagetti et al., 2019).

Οι εντερόκοκκοι είναι κυρίως ευκαιριακά παθογόνα. Η αυξανόμενη σοβαρότητα της νόσου σε νοσηλεύομενους ασθενείς έχει συμβάλει στην άνοδο των εντερόκοκκων ως νοσοκομειακών παθογόνων. Η πρόοδος της

ιατρικής τεχνολογίας και της θεραπείας, όπως η χρήση διαφόρων συσκευών ενδοαγγειακής πρόσβασης, εμφυτευμένων προσθετικών συσκευών, κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας και ανοσοκαταστολής, έχει μεγεθύνει την επίδραση οργανισμών σχετικά χαμηλής ιογένεσης, όπως οι εντερόκοκκοι. Κρίσιμη σημασία έχει η εντατική χρήση αντιβιοτικών σχετικά ευρέος φάσματος στο νοσοκομείο, η οποία παρέχει επιλεκτική πίεση που ευνοεί την ανάπτυξη εγγενώς ανθεκτικών στα φάρμακα κοινών οργανισμών, όπως οι εντερόκοκκοι (Eliopoulos & Gold, 2001).

Οι εντερόκοκκοι είναι σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα λόγω της εγγενούς ανθεκτικότητάς τους σε πολλά αντιμικροβιακά καθώς και της ικανότητάς τους να αποκτούν νέους μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Μεταξύ των εντεροκοκκικών ειδών, ο *Enterococcus faecalis* και ο *Enterococcus faecium* είναι τα πιο συχνά απαντώμενα (Gagetti et al., 2019).

Όλοι οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη και την αμπικιλίνη, καθώς και υψηλού επιπέδου αντοχή στις περισσότερες κεφαλοσπορίνες και σε όλες τις ημισυνθετικές πενικιλίνες, ως αποτέλεσμα της έκφρασης πρωτεϊνών που δεσμεύουν πενικιλίνη χαμηλής συγγένειας.

Για πολλά στελέχη, το επίπεδο αντοχής τους στην αμπικιλίνη δεν αποκλείει την κλινική χρήση του παράγοντα αυτού. Στην πραγματικότητα, η αμπικιλίνη παραμένει η θεραπεία εκλογής για τις εντεροκοκκικές λοιμώξεις.

Οι εντεροκοκκικές λοιμώξεις που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη και προκαλούνται από *E. faecium* αυξάνονται σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Η αύξηση αυτή άρχισε με την εμφάνιση υψηλής αντοχής στην αμπικιλίνη και στη συνέχεια με την προσθήκη αντοχής στη βανκομυκίνη. Οι αντοχές αυτές είναι πολύ σπάνιες στον *E. faecalis* (Gagetti et al., 2019).

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η παρουσίαση των εντερόκοκκων, η αναφορά στα είδη και την ταξινόμησή τους, καθώς και η ανάλυση της παρουσίας τους στα τρόφιμα. Επιπρόσθετα, γίνεται αναφορά στους μηχανισμούς αντοχής τους στα αντιβιοτικά, ενώ αναφέρονται και οι ισχύοντες Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με την ύπαρξη εντερόκοκκων στα τρόφιμα.

Κεφάλαιο 1: Χαρακτηριστικά του γένους *Enterococcus*

1.1 Ορισμός

Οι εντερόκοκκοι ή αλλιώς εντερικοί κόκκοι είναι μικροοργανισμοί και ειδικότερα βακτήρια γαλακτικοί οξέος. Επιπλέον, είναι προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που διατάσσονται μεμονωμένα ιδανικά όμως αναπτύσσονται στους 35°C και δεν σχηματίζουν σπόρους. Είναι Gram θετικά, στην δοκιμή καταλάσης και οξειδάσης εντοπίζονται αρνητικά, έχουν σχήμα κόκκου, το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0,6-2 μm, δημιουργούν κοντές ή και πιο μακριές αλυσίδες και κάποιες φορές παρουσιάζονται ως διπλόκοκκοι. Περιλαμβάνουν διάφορα στελέχη, από τα οποία δύο κυρίως προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο, ο *Enterococcus faecium* και ο *Enterococcus faecalis*.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι διαδεδομένα βακτήρια που συναντώνται ως κοινή μικροχλωρίδα στο έντερο του ανθρώπου, των θηλαστικών και άλλων ζώων στον γαστρεντερικό τους σωλήνα. Αλλά συνάμα, υπάρχουν στο νερό, το έδαφος, τα φυτικά προϊόντα, τα κρέατα ζυμωμένα και μαγειρεμένα και στα γαλακτομικά προϊόντα. Αυτή η εύκολη διάδοση υφίσταται λόγω της υψηλής ανθεκτικότητας τους σε σκληρές συνθήκες όπως υψηλές θερμοκρασίες, χαμηλό pH, και υψηλή αλατότητα. Διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών μέσα στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν ξεκινώντας από τους 10°C και φτάνοντας μέχρι τους 45°C με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 35°C, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Αξίζει να τονίσουμε ότι ορισμένα είδη έχουν την ικανότητα επιβίωσης στους 60°C για μισή ώρα, ενώ έχουν αντοχή σε απολυμαντικές ουσίες, όπως η αλκοόλη, η γλουταραλδεΐδη και η χλωρίνη, έτσι ευνοείται η επιβίωση και η εξάπλωσή τους στον χώρο των νοσοκομείων. Επιπλέον, μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλοντα με pH από 4,5-10, υψηλές συγκεντρώσεις NaCl 6,5% μέχρι και σε ατμόσφαιρες με ή και χωρίς οξυγόνο διότι χαρακτηρίζονται ως προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Τουλάχιστον 37 είδη τα

οποία ανήκουν στο γένος του εντερόκοκκου έχουν καταγραφεί έως σήμερα με τα δύο πιο κοινώς γνωστά τον *E. faecium* (8-16%) και τον *E. faecalis* (80-90%).

Οι εντερόκοκκοι φέρεται ότι έχουν περιορισμένη ικανότητα πρόκλησης νόσου, όμως σε περίπτωση που ένας άνθρωπος βρεθεί αντιμέτωπος με την νόσο αυτή μπορεί να του επιφέρει τον θάνατο, ιδιαίτερα στους νοσηλευόμενους ασθενείς. Η νόσος από εντερόκοκκο προκαλεί λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα, βακτηριαιμία, εκκολπωματίτιδα και μηνιγγίτιδα. Ωστόσο, αυτές οι λοιμώξεις μπορούν να αντιμετωπιστούν από πλευρά ιατρικής με διάφορα αντιβιοτικά, με σπάνιες περιπτώσεις αυτά τα βακτήρια να είναι ανθεκτικοί σε αυτά.

1.2 Ιστορική αναδρομή

Με τον όρο «εντερόκοκκοι», ονομάστηκαν πρώτα από όλα οι εντερικής προέλευσης θετικοί Gram κόκκοι, οι οποίοι διαχωρίστηκαν από κόπρανα ανθρώπων και έπειτα ενσωματώθηκαν στο γένος *Streptococcus* (Thiercelin, 1899). Με την θέσπιση του συστήματος ταξινόμησης και ομαδοποίησης κατά Lancefield, στην ομάδα D των στρεπτόκοκκων ταξινομήθηκαν οι «εντερόκοκκοι» σύμφωνα με την παρουσία στο κυτταρικό τους τοίχωμα του ειδικού αντιγόνου της ομάδας D, και με βάση τα βιομηχανικά και καλλιεργητικά χαρακτηριστικά τους, αλλά ταυτόχρονα και διαφοροποιούμενοι από τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας D (Lancefield, 1933, Sherman, 1937, 1938).

Μετέπειτα, έρευνες υβριδισμού DNA-DNA και DNA-rRNA απέδειξαν ότι τα είδη της ομάδας D, όπως *S. faecalis*, *Streptococcus faecium*, *S. durans*, *S. avium*, *S. gallinarium*, *S. casseliflavus* και *S. faecalis subsp. Malodoratus* ήταν αυτά που ξεχώρισαν από τα άλλα είδη στρεπτόκοκκων και έτσι ταξινομήθηκαν σε διαφορετικό γένος *Enterococcus* (Schleifer, 1984; Schleifer & Kilpper-Balz, 1984). Στις μέρες μας στο γένος *Enterococcus* βρίσκουμε 29 είδη με επικρατέστερη κλινική εμφάνιση να έχουν ο *E. faecium* και ο *E. faecalis*. Άξιο αναφοράς είναι, αν και με σπάνια συσχέτιση με

ανθρώπινη νόσο, οι *Enterococcus casseliflavus* και ο *Enterococcus gallinarium*.

1.3 Επιδημιολογία και Κατανομή στη Φύση των Εντερόκοκκων

Οι εντερόκοκκοι συναντώνται πολύ συχνά στη φύση. Συναντώνται στα περισσότερα θηλαστικά και πτηνά αφού είναι μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του. Ταυτόχρονα, υπάρχουν στα επιφανειακά νερά, στο έδαφος, στα λαχανικά, στα φυτά και στα τρόφιμα, ενώ είναι σπάνια η παρουσία τους στα έντομα και στα αμφίδια. Εφόσον συνυπάρχουν φυσιολογικά στην εντερική χλωρίδα ανθρώπων και ζώων χρησιμοποιούνται ως κριτήριο κοπρανώδους μόλυνσης και έτσι έχουν σπουδαίο ρόλο στην υγεία. Η παρουσία των εντερόκοκκων στα επιφανειακά νερά αποδεικνύει ότι υπάρχει μόλυνση, η οποία συνήθως δεν είναι πρόσφατη, με κοπρανώδεις ουσίες, για αυτό και η παράμετρος εξέτασης για το πόσιμο νερό, καθώς και για το νερό κολύμβησης κρίνεται αναγκαία και απαραίτητη [Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001 σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 98/83 Ε.Ε. (ΦΕΚ 892/11.7.2001), Οδηγία 2006/7/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 15^{ης} Φεβρουαρίου 2006 σχετικά με τη διαχείριση της ποιότητας των υδάτων].

Η παρουσία εντερόκοκκων αποτελεί δείκτη κακής υγιεινής, ωστόσο πολύ συχνά υπάρχουν στη χλωρίδα κάποιων τροφίμων βοηθώντας έτσι στη δημιουργία οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σε προϊόντα, όπως για παράδειγμα σε προϊόντα ζύμωσης. Σύμφωνα με μελέτες από επιστήμες της οικολογίας, καθώς και της επιδημιολογίας των εντερόκοκκων έχει αποδειχθεί ότι τρόφιμα όπως τυριά, κιμάς, ψάρια και λουκάνικα έχουν έντονη παρουσία στους εντερόκοκκους και συγκεκριμένα στον *E. faecium* και *E. faecalis*. Οι εντερόκοκκοι είναι ανθεκτικοί στις θερμικές επεξεργασίες όπως μια από αυτές είναι η παστερίωση και ταυτόχρονα επιβιώνουν στις ακραίες συνθήκες ανάπτυξης, όπως το αλκαλικό pH. Αυτό καθιστά ότι τρόφιμα ζωικής προέλευσης ή προϊόντα ζύμωσης έχουν απαρτίζονται από εντερόκοκκους.

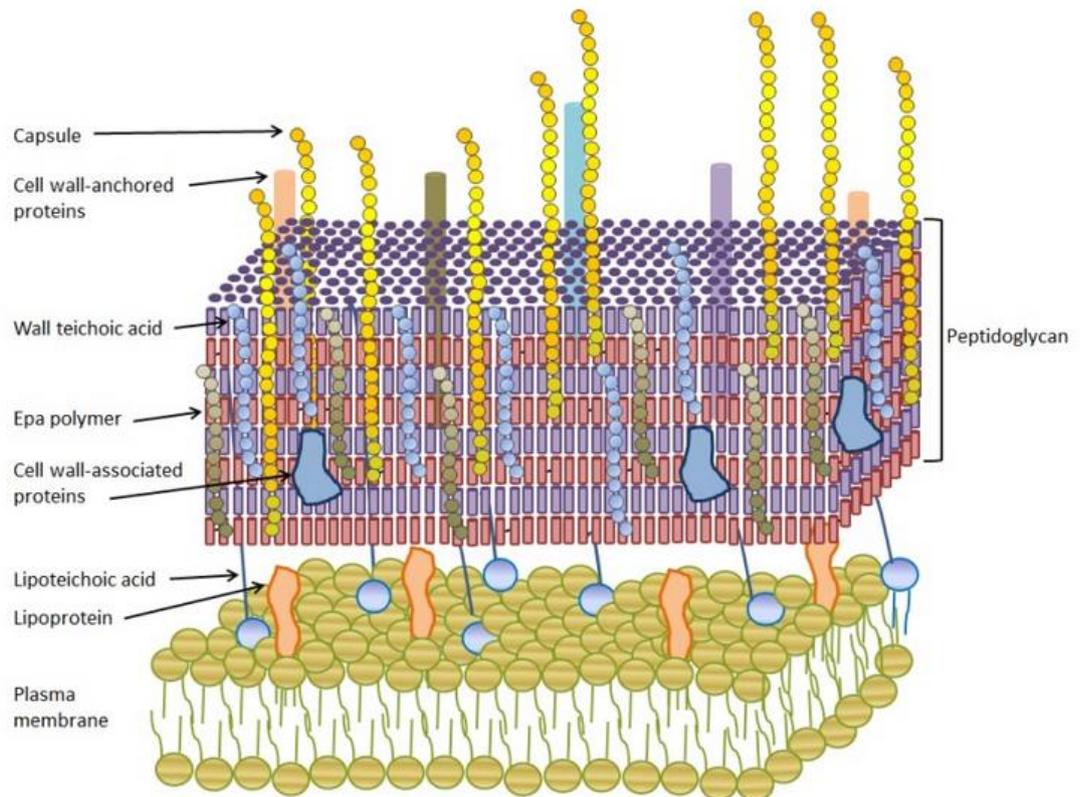
Πανερωπαϊκές μελέτες έδειξαν ότι οι καλλιεργήσιμες περιοχές που επιλέγουν κοπριά από χοίρους εμπεριέχουν 100% εντερόκοκκους, ενώ σε

καλλιέργειες που δεν χρησιμοποιούν κοπριά ζωικής προέλευσης το ποσοστό εμφάνισης των εντερόκοκκων μειώνεται στο 1/3. Ανάλογα με το είδος του δείγματος καθώς και με την χώρα η κατανομή των *Enterococcus spp.* διαφοροποιείται. Έτσι, στην Δανία ο *E. hirae* συχνότερα εντοπίζεται σε χοίρους και μόσχους, ενώ στα πτηνά επικρατεί ο *E. faecalis*. Από την άλλη μεριά, στη Σουηδία κυρίαρχο ρόλο στα αστικά λύματα, στα πτηνά, στα κλινικά δείγματα, στα επιφανειακά νερά και στα νοσοκομειακά λύματα έχει ο *E. faecalis*, ενώ στους μόσχους και στους χοίρους ο *E. hirae*. Όσον αφορά, το Ηνωμένο Βασίλειο και την Ισπανία επικρατεί στα νοσοκομειακά λύματα, στα επιφανειακά και αστικά νερά ο *E. faecium* και ταυτόχρονα στα κλινικά δείγματα ο *E. faecalis*. Οι ασθενείς που νοσηλεύονται είναι πιο εύκολο να βρεθούν αντιμέτωποι με μόλυνση από εντερόκοκκο διότι το νοσοκομείο αποτελεί πηγή μόλυνσης και έτσι δίνεται η δυνατότητα στους εντερόκοκκους να επιβιώσουν, καθώς και να μολύνουν για εύλογο χρονικό διάστημα κάποιον ασθενή.

1.4 Δομή Εντερόκοκκων

Για σχεδόν μισό αιώνα, οι βιοχημικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο κυτταρικό τοίχωμα του γένους *Enterococcus*. Η επισκόπηση του κυτταρικού περιβλήματος του εντερόκοκκου (που αποτελείται από την κυτταρική μεμβράνη, καθώς και από συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος) μας επιτρέπει όχι μόνο να εξετάσουμε τα μονοπάτια εκείνα που μοιράζονται μεταξύ πολλών θετικών κατά Gram βακτηρίων, αλλά και για να αναδείξει τις διαφορές που καθιστούν τους εντερόκοκκους μοναδικούς (Εικόνα 1).

Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-θετικών βακτηρίων αποτελείται κυρίως από τρία κύρια συστατικά: έναν κορμό πεπτιδογλυκάνης, ανιονικά πολυμερή (τειχοϊκά οξέα και πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος) και πρωτεΐνες που συνδέονται με το τοίχωμα και είναι προσδεδεμένες στο τοίχωμα. Ο σκελετός της πεπτιδογλυκάνης και τα ανιονικά πολυμερή αποτελούν σχεδόν το 90% του συνολικού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες περιλαμβάνει λιγότερο από το 10% του βάρους του κυτταρικού τοιχώματος (Bhavsar & Brown, 2006).



Εικόνα 1: Μοντέλο του κυτταρικού τοιχώματος του εντερόκοκκου (DebRoy et al., 2014).

Το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος του εντερόκοκκου είναι η πεπτιδογλυκάνη (PG). Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από τον επαναλαμβανόμενο δισακχαρίτη N-ακετυλομουραμικό οξύ-(β1-4)-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (MurNAc-GlcNAc). Οι αλυσίδες αυτών των επαναλαμβανόμενων σακχάρων, οι οποίες γενικά κυμαίνονται σε μέγεθος από 5-30 υπομονάδες, διασυνδέονται μεταξύ τους με την παρουσία στελεχιαίων πεπτιδίων που συνδέονται με τα κατάλοιπα MurNAc (NAM) στο πλαίσιο της διαδικασίας συναρμολόγησης (Εικόνα 2) (DebRoy et al., 2014).

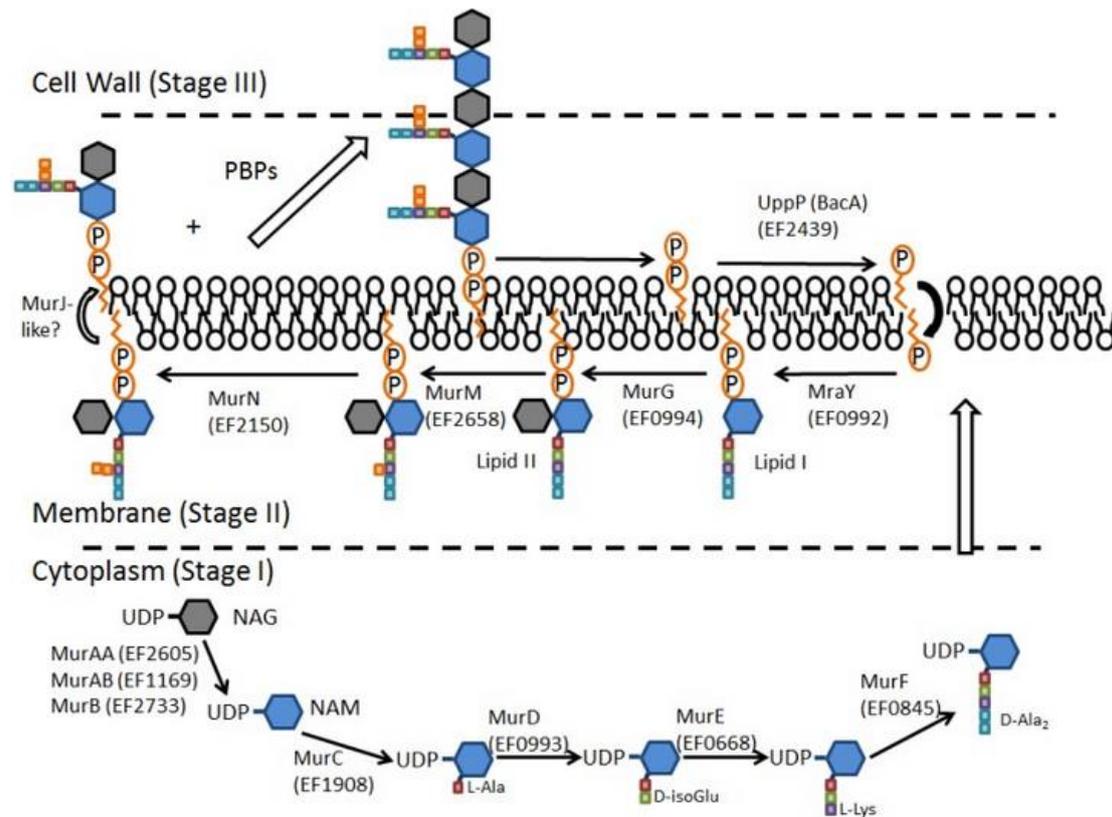
Επί δεκαετίες, οι ερευνητές προσπαθούσαν να προσδιορίσουν τη δομή διαλύματος της πεπτιδογλυκάνης, αλλά η πολυπλοκότητα και η απουσία καθαρών και διακριτών δομών καθιστούσαν αυτό το εγχείρημα άπιαστο. Η εργασία του Mobashery και των συνεργατών του (Meroueh et al., 2006) έριξε νέο φως στη συνολική δομή της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος, καθώς οι ερευνητές αυτοί συνέθεσαν ένα τμήμα καθαρής πεπτιδογλυκάνης που περιείχε ένα τετρασακχαριδικό τμήμα κυτταρικού τοιχώματος με το

τυπικό Gram- θετικό βλαστικό πεπτιδίο αγκυροβολημένο στα κατάλοιπα NAM. Κατά τον προσδιορισμό αυτής της δομής με NMR, οι συγγραφείς αυτοί ανακάλυψαν ότι η πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος λαμβάνει μια διατεταγμένη, δεξιόστροφη έλικα που αποτελείται από τρία ζεύγη NAG-NAM ανά στροφή της έλικας, η οποία προσανατολίζει τα stem πεπτιδία με τριπλή συμμετρία γύρω από τον άξονα. Αυτή η συμμετρία επιτρέπει σε ένα μόνο σκέλος πεπτιδογλυκάνης να διασυνδέεται με τρία γειτονικά σκέλη και, ανάλογα με την έκταση της διασύνδεσης, επιτρέπει επίσης την ύπαρξη διαφόρων μεγεθών πόρων στο πλέγμα της πεπτιδογλυκάνης. Ένα λεγόμενο κυψελοειδές μοτίβο θα δημιουργούσε πόρους $\sim 70 \text{ \AA}$ όταν είναι πλήρως δικτυωμένοι. Αυτό το προβλεπόμενο μοτίβο βρίσκεται σε εξαιρετική συμφωνία με τις μικροσκοπικές εικόνες ατομικής δύναμης του κυτταρικού τοιχώματος του *Staphylococcus aureus*, στις οποίες οι πόροι κυμαίνονταν σε μέγεθος από 50 έως 500 \AA (Touhami, Jericho, & Beveridge, 2004). Αυτό το μοντέλο θα οικοδομούσε επίσης πεπτιδογλυκάνη μακριά και ορθογώνια προς το κυτταρικό μεμβράνη, και όχι παράλληλα με τη μεμβράνη, όπως ήταν το αποδεκτό δόγμα στις περιγραφές των "εγχειριδίων" αυτών των διεργασιών (DebRoy et al., 2014).

Τα σύντομα stem πεπτιδία συνδέονται με τα κατάλοιπα NAM μέσω αμιδικών δεσμών μεταξύ της τελικής αμινομάδας του stem πεπτιδίου L-αλανίνης και της καρβοξυλομάδας της D-λακτυλομάδας κάθε MurNAc, με το stem πεπτιδίο να αποτελείται από εναλλασσόμενα L- και D- αμινοξέα. Όπως και πολλά συγγενή θετικά κατά Gram, το stem πεπτιδίο του εντερόκοκκου αποτελείται γενικά από L-Ala-D-Glu-L-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Αυτά τα stem πεπτιδία διασυνδέουν παρακείμενες αλυσίδες με μια διαπεπτιδική γέφυρα από την ε-αμινομάδα του υπολείμματος L-Lys στη θέση 3 στην καρβοξυλομάδα του D-Ala στη θέση 4 μιας παρακείμενης αλυσίδας. Αυτή η ομοιοπολική τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του τελικού υπολείμματος D-Ala στη θέση 5. Οι συνολικές διαφορές στη δομή της πεπτιδογλυκάνης των θετικών κατά Gram οργανισμών οφείλονται από τη διαφοροποίηση της αλληλουχίας αμινοξέων που σχηματίζει τη γέφυρα μεταξύ των πεπτιδίων, η οποία συνήθως αναφέρεται ως διασταυρούμενη γέφυρα. Για τα περισσότερα είδη του γένους *Enterococcus*, αυτή η διασταυρούμενη γέφυρα αποτελείται από ένα μόνο κατάλοιπο D-Asp. Ο *E. faecalis* φαίνεται να

αποτελεί εξαίρεση σε αυτό το θέμα, καθώς διαθέτει σταυρογέφυρα από 2-3 κατάλοιπα L-Ala (DebRoy et al., 2014).

Η σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων από τα Gram-θετικά διαιρείται γενικά σε διακριτά στάδια τα οποία βασίζονται κυρίως στην κυτταρική διαμερισματοποίηση- συγκεκριμένα, στάδιο 1 = κυτταρόπλασμα, στάδιο 2 = μεμβράνη και στάδιο 3 = κυτταρικό τοίχωμα (DebRoy et al., 2014).



Εικόνα 2: Βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης (DebRoy et al., 2014).

Στάδιο I

Τα αρχικά στάδια της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος περιλαμβάνουν τη μετατροπή της N-ακετυλογλυκοζαμίνης [UDP-NAG] που προέρχεται από UDP σε UDP-NAM, η οποία καταλύεται από τις MurA και MurB, μαζί με φωσφοενόλη πυρουβικού. Στην αντίδραση που καταλύεται από την MurA, η UDP-NAG λαμβάνει ενολπυρουβικό από την PEP και αυτό το ενδιάμεσο προϊόν ανάγεται στη συνέχεια από την MurB σε ένα λακτουϊλικό τμήμα στην UDP-NAM. Πολλά θετικά κατά Gram βακτήρια διαθέτουν δύο ανεξάρτητα ομόλογα MurA, συμπεριλαμβανομένων των *E. faecalis* και *E. fae-*

cium (Qin et al., 2012). Οι Vesić & Kristich (2012) έδειξαν ότι η MurAA (και όχι η MurAB) είναι υπεύθυνη για την εγγενή αντίσταση στις κεφαλοσπορίνες στον *E. faecalis*, αλλά ο λόγος για τον οποίο υπάρχουν δύο ομόλογα MurA παραμένει ακόμα άγνωστος. Μετά τη σύνθεση της UDP-NAM, η σταδιακή προσθήκη των τριών πρώτων αμινοξέων στο stem πεπτιδίο επιτυγχάνεται μέσω της συντονισμένης δράσης των συνθετασών MurC, MurD και MurE για την παραγωγή UDP-NAM-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys. Τα δύο τελευταία αμινοξέα (D-Ala-D-Ala) του πεπτιδικού στελέχους προστίθενται από την τρανσφεράση MurF για την παραγωγή UDP-MurNac-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-D-Ala. Αυτό το μόριο αναφέρεται συνήθως ως νουκλεοτίδιο του Park και αποτελεί το τελευταίο βήμα του σταδίου I της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος.

Στάδιο II

Η μετακίνηση του διαλυτού νουκλεοτιδίου του Park στη μεμβράνη απαιτεί τον λιπιδικό φορέα undecaprenol και τη μεταφορά του UDP-NAM συν το stem πεπτιδίο από την UDP στον C55-ισοπρενοειδή φορέα με την καταλυτική δράση του MraY. Αυτή η αντίδραση ανταλλαγής λαμβάνει χώρα στην εσωτερική ή κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και παράγει το λιπίδιο I (C55-PP-NAM-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala). Στη συνέχεια, η MurG καταλύει την προσθήκη διαλυτής UDP-NAG στο λιπίδιο I για να παραχθεί το λιπίδιο II [C55-PP-NAM(-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala)-β-1-4-NAG] (Ha et al., 2000).

Στο *E. faecalis*, η προσθήκη των πεπτιδίων διασταυρούμενης γέφυρας στο λιπίδιο II λαμβάνει χώρα επίσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και ξεκινά με τη μεταφορά της L-Ala από ένα φορτισμένο tRNA, στην έψιλον-αμινομάδα της λυσίνης στο stem πεπτιδίο από την MurM (Lloyd et al., 2008). Στη συνέχεια, η MurN καταλύει την προσθήκη της L-Ala στην πρόδρομη ουσία Lipid II-L-Ala με τρόπο ανάλογο με αυτόν που παρατηρείται στον *Streptococcus pneumoniae* (De Pascale et al., 2008). Καθώς η διασταυρούμενη γέφυρα σε άλλα εντεροκοκκικά είδη, συμπεριλαμβανομένου του *E. faecium*, διαθέτει D-isoAsp, τα είδη αυτά εξαρτώνται από μια κυτταροπλασματική ρακεμάση D-Asp, με την ενσωμάτωση της D-Asp στη λυσίνη στο stem πεπτιδίο από τη δραστηριότητα της D-ασπαρτυλοτρανσφεράσης (Bellais et al., 2006). Ένα σύμπλεγμα δύο γονιδίων

του *E. faecium* κωδικοποιεί την ασπαρτική ρακεμάση (Racfm) και τη λιγάση (Aslfm) για την ενσωμάτωση της D-Asp στην πλευρική αλυσίδα της πρόδρομης πεπτιδογλυκάνης. Η μετατροπή στη μορφή isoAsp πρέπει να συμβεί μετά την προσθήκη που καταλύεται από την Aslfm, καθώς η isoAsp δεν αποτελούσε υπόστρωμα για το ένζυμο Aslfm. Δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί αν η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα αυθόρμητα ή ενζυμικά.

Μετά την προσθήκη πεπτιδίου(-ων) διασταυρούμενης γέφυρας στο λιπίδιο II, τα παράγωγα αυτά πρέπει να μεταφερθούν με άγνωστο μηχανισμό στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, πιθανώς μέσω μιας αντίδρασης αναστροφής λιπιδίων που πραγματοποιείται από το MviN (MurJ) του *E. coli* στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπου πλέον τοποθετείται ως υπόστρωμα για τη συναρμολόγηση της PG (Ruiz, 2008). Ωστόσο, στο *B. subtilis* και πιθανώς σε άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των εντερόκοκκων, υπάρχουν τέσσερα ομόλογα της MurJ και όλα φαίνεται να είναι μη ουσιώδη, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την ουσιώδη φύση της MurJ στο *E. coli* (Fay & Dworkin, 2009). Ενδέχεται να υπάρχουν πρόσθετες (πλεονάζουσες) πρωτεΐνες που αναστρέφουν το λιπίδιο II στα θετικά κατά Gram, ή ότι η MurJ έχει έναν βοηθητικό ρόλο στην αναστροφή του λιπιδίου II που είναι απαραίτητη στην *E. coli*, αλλά όχι στα θετικά κατά Gram.

Στάδιο III

Το τελικό στάδιο της συναρμολόγησης λαμβάνει χώρα στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και καταλύεται από πρωτεΐνες δέσμησης πενικιλίνης (PBPs). Μετά την απομάκρυνση της πρόδρομης πεπτιδογλυκάνης από τον λιπιδικό φορέα μέσω μιας αντίδρασης διαγλυκοζυλίωσης από τις PBPs στην εκκολαπτόμενη πεπτιδογλυκανική αλυσίδα, το πυροφωσφορικό undecaprenyl (UPP) επιστρέφει στη μονοφωσφορική μορφή με τη δράση της UppP (φωσφατάσης) (El Ghachi et al., 2004). Το μονοφωσφορικό δεκαπενύλιο (UMP) διασχίζει τη μεμβράνη για να χρησιμεύσει και πάλι ως φορέας λιπιδίων για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Οι PBPs μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την ικανότητά τους να πολυμερίζουν τις εκκολαπτόμενες αλυσίδες γλυκάνης στον πρόδρομο δισακχαρίτη (διαγλυκοζυλίωση) ή την ικανότητα να διασυνδέουν πεπτίδια του τοιχώματος μεταξύ των γειτονικών αλυσίδων γλυκάνης (διαπεπτιδισμός). Ο

πολυμερισμός της PG σε όλα τα ευβακτήρια καταλύεται από PBPs που συνδέονται με τη μεμβράνη και τα ένζυμα αυτά αποτελούν ειδικούς στόχους για τα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Στους εντερόκοκκους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση, καθώς κάθε είδος διαθέτει ένα συγκεκριμένο πρότυπο τουλάχιστον πέντε PBPs.

Οι PBPs μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε δύο ομάδες: τις πολυμοριακές, υψηλής μοριακής μάζας-PBPs (> 60 kDa, HMM-PBPs) και τα μονολειτουργικά, χαμηλής μοριακής μάζας-PBPs (LMM-PBPs). Οι HMM-PBPs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω με βάση τη λειτουργική τους δραστηριότητα. Οι HMM-PBPs της κατηγορίας A προάγουν τόσο τον πολυμερισμό της γλυκανικής αλυσίδας όσο και τη διασύνδεση των πεπτιδίων του τοιχώματος, ενώ οι HMM-PBPs της κατηγορίας B διαθέτουν κυρίως δραστηριότητα τρανσπεπτιδάσης και περιλαμβάνουν τη χαμηλής συγγένειας PBP5 σε *E. faecium* και *E. faecalis*, η οποία ευθύνεται για την αυξημένη αντοχή στην αμπικιλίνη. Η αντίδραση της τρανσγλυκοζυλίωσης μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί από μονολειτουργικές γλυκοζυλοτρανσφεράσες. Τα ένζυμα αυτά δεν θεωρούνται PBPs, αλλά ενδέχεται να έχουν ομοιότητα αλληλουχίας με την περιοχή γλυκοσυλτρανσφεράσης των PBPs της κατηγορίας A, ή σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να φαίνεται ότι πρόκειται για μια νέα κατηγορία γλυκοζυλοτρανσφερασών (Rice et al., 2009).

Οι νέες γλυκανικές αλυσίδες διασυνδέονται με τις υπάρχουσες PG του τοιχώματος μέσω αντιδράσεων τρανσπεπτιδισμού. Η διασύνδεση εξαρτάται επίσης από τη διαθεσιμότητα στελεχιαίων πεπτιδίων με τερματισμό D-Ala-D-Ala. Καθώς δεν διασυνδέονται όλα τα stem πεπτιδία με γειτονικές αλυσίδες PG, είναι πιθανό ότι ο βαθμός διασύνδεσης ρυθμίζεται από τη δράση των LMM-PBPs που παρουσιάζουν δραστηριότητα καρβοξυπεπτιδάσης. Ο βαθμός στον οποίο η πεπτιδογλυκάνη είναι πλήρως διασταυρωμένη προβλέπεται ότι προσδίδει διαφορετικά μεγέθη πόρων στο πλέγμα-έργο της πεπτιδογλυκάνης.

Οι καρβοξυπεπτιδάσες είναι υπεύθυνες για την απομάκρυνση του τελικού υπολείμματος D-Ala από το πενταπεπτιδίο του στελέχους, το οποίο εμποδίζει το πεπτιδίο που προκύπτει να χρησιμεύσει ως υπόστρωμα σε περαιτέρω αντιδράσεις διαπεπτιδισμού και, επομένως, θα μπορούσε να διαδραματίσει ρόλο στη ρύθμιση του πορώδους του κυτταρικού τοιχώματος.

Οι εντερόκοκκοι διαθέτουν τέσσερα έως οκτώ HMM-PBPs και συνήθως ένα LMM-PBP. Ο *E. faecalis* διαθέτει τρεις PBPs τάξης A και τρεις PBPs τάξης B καθώς και μία LMM-PBP. Οι *E. faecium* και *E. hirae* διαθέτουν από τρεις PBPs τάξης A και τρεις PBPs τάξης B, καθώς και μία LMM-PBP.

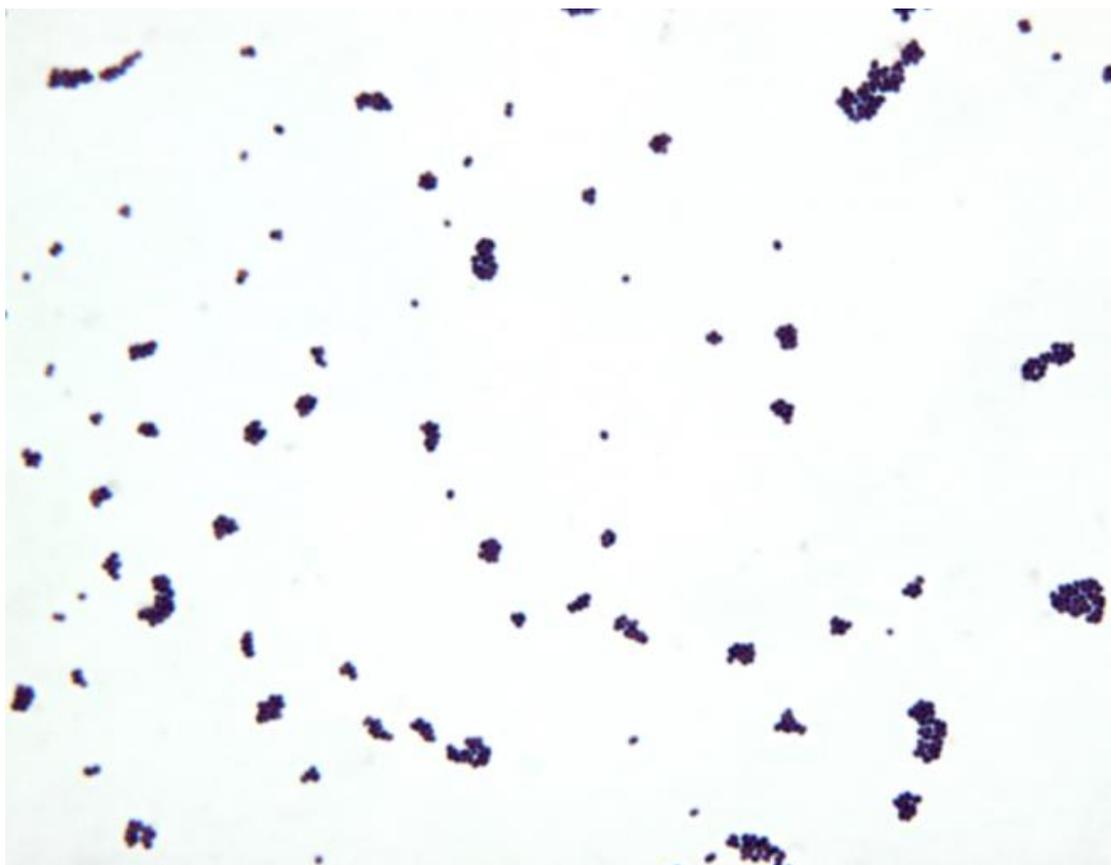
Φαίνεται ότι υπάρχει λειτουργικός πλεονασμός, δεδομένου ότι δεν φαίνεται να είναι όλες οι PBPs απαραίτητες για τη διατήρηση του κυτταρικού τοιχώματος σε κάθε δεδομένη στιγμή. Η έκθεση σε αντιβιοτικά μπορεί να επιλέξει παραλλαγές που διατηρούν το κυτταρικόλειτουργία του τοιχώματος, μειώνοντας παράλληλα τη συγγένεια για το φάρμακο. Για παράδειγμα, η PBP3 είναι η κύρια PBP που απαιτείται για τη σωστή κυτταρική διαίρεση, αλλά αναστέλλεται από την κεφοταξίμη. Ελλείψει της PBP3, η PBPP5, μια πρωτεΐνη PBP χαμηλής συγγένειας, προσδίδει αντοχή στα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Σύμφωνα με τους επικαλυπτόμενους ρόλους των πολλαπλών PBPs στις αντιδράσεις διαγλυκοζυλίωσης και διαπεπτιδισμού, τα PBPs χαμηλής συγγένειας δεν είναι απαραίτητα για τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε εργαστηριακές συνθήκες (Sapunaric, et al., 2003).

Εκτός από τον πολυμερισμό των κλώνων γλυκάνης και την εκτεταμένη διασύνδεση των κλώνων μέσω αντιδράσεων τρανσπεπτιδισμού, η σύνθεση και ο κύκλος εργασιών του κυτταρικού τοιχώματος ρυθμίζεται επίσης από αυτολυτικά ένζυμα, τα οποία συνήθως αναφέρονται ως μουραμιδάσες. Αυτά τα ένζυμα συμπεριφέρονται με τρόπο ανάλογο με τα λυσοζύμια που προέρχονται από τον ξενιστή, δεδομένου ότι μπορούν να στοχεύουν κατάλοιπα NAG-NAM για διάσπαση. Ο Shockman και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν τέτοια ένζυμα σε εντερόκοκκους σε μελέτες που χρονολογούνται από τη δεκαετία του 1960. Πιο πρόσφατα, τρεις μουραμιδάσες (AtIA, AtIB και AtIC) έχουν περιγραφεί για τον *E. faecalis*, ενώ δύο διαφορετικές μουραμιδάσες, η M1 και η M2, έχουν χαρακτηριστεί στον *E. hirae* ATCC9790. Στην *E. hirae*, η μουραμιδάση-1 παράγεται ως 130- kDa λανθάνουσα προπρωτεΐνη που ενεργοποιείται πρωτεολυτικά σε μια μορφή 87 kDa. Η M1 φαίνεται να ευνοεί τον κύκλο εργασιών των κυτταρικών τοιχωμάτων που προέρχονται από το *E. hirae*, σε αντίθεση με τη μουραμιδάση M2, η οποία σημειώνεται για αυξημένη δραστηριότητα στα κυτταρικά τοιχώματα του *Micrococcus luteus*.

Οι εντερόκοκκοι, όπως και άλλοι συγγενείς θετικοί κατά Gram οργανισμοί, διακοσμούν την PG και την κυτταρική τους μεμβράνη με μια ποικιλία πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών. Οι περισσότεροι από αυτούς προσδένονται άμεσα στο PG του κυτταρικού τοιχώματος μέσω ομοιοπολικών δεσμών (πολυσακχαρίτες, τειχοϊκά οξέα και πρωτεΐνες που είναι εδραιωμένες στην επιφάνεια), ενώ το λιποτειχοϊκό οξύ και οι λιποπρωτεΐνες αγκυρώνονται στα λιπίδια της μεμβράνης μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης (DebRoy et al., 2014).

1.5 Χαρακτηριστικά στοιχεία εντερόκοκκων

Τα βακτήρια του γένους *Enterococcus* ή εντερόκοκκοι είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορεί να βρεθούν σχεδόν παντού, κυρίως όμως συναντώνται στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων. Οι εντερόκοκκοι ανήκουν στην ομάδα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και είναι Gram θετικοί, μη σπορογόνοι, καταλάση-αρνητικοί, οξειδάση-αρνητικοί, αερόβιοι κόκκοι. Είναι ορατοί στο μικροσκόπιο είτε μόνοι, είτε σε δυάδες, είτε σε αλυσίδες (Εικόνα 1), ενώ εμφανίζουν μεγάλη ανοχή στη θερμότητα και μπορούν να επιβιώσουν υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Επομένως, οι εντερόκοκκοι μπορούν να αποικίσουν διάφορα τρόφιμα και στη συνέχεια να χρησιμεύσουν ως δείκτες της υγειονομικής ποιότητας των τροφίμων αυτών (Foulquié Moreno et al., 2006).



Εικόνα 3: Εντερόκοκκος με χρώση κατά gram (National Library of Medicine, 2013).

Οι εντερόκοκκοι απαντούν συνήθως σε μεγάλους αριθμούς σε λαχανικά και τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως τα ζυμωμένα λουκάνικα και τα τυριά. Στα επεξεργασμένα κρέατα, οι εντερόκοκκοι δεν είναι επιθυμητοί λόγω της αλλοίωσης που προκαλούν, ενώ αντίθετα έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών κατά την ωρίμανση πολλών τυριών (Giraffa, 2002).

Αν και οι εντερόκοκκοι θεωρούνταν ως χαμηλού βαθμού παθογόνα έχει σημειωθεί πρόσφατα μια έντονη ασάφεια όσον αφορά τις σχέσεις των εντερόκοκκων με τον άνθρωπο η οποία σχετίζεται με το εντερικό τους ενδιαίτημα, την είσοδό τους στην τροφική αλυσίδα, την αντοχή τους στα αντιβιοτικά και την πιθανή συμμετοχή τους σε ασθένειες λόγω της παρουσίας παραγόντων ιογένεσης, όπως η παραγωγή συγκολλητικών ουσιών και ουσιών συσσωμάτωσης (Giraffa, 2002).

Οι εντερόκοκκοι απομονώνονται συχνά από διάφορα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων και παραδοσιακών ζυμωμένων τροφίμων. Από την

στιγμή που αποβάλλονται στο περιβάλλον μέσω των ανθρωπίνων κοπράνων ή των κοπράνων των ζώων, οι εντερόκοκκοι είναι ικανοί να αποικίσουν διάφορα μέρη λόγω της εξαιρετικής τους ιδιότητας να επιζούν και να αναπτύσσονται σε εχθρικά περιβάλλοντα (Giraffa, 2002).

Τις τελευταίες δεκαετίες οι εντερόκοκκοι έχουν αναδειχθεί σε σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και σε μονάδες εντατικής θεραπείας. Η αύξηση των νοσοκομειακών εντεροκοκκικών λοιμώξεων οφείλεται εν μέρει στην αυξημένη χρήση αντιβιοτικών ευρέος φάσματος και στην αύξηση του αριθμού των βαρέως πασχόντων ασθενών. Οι εντερόκοκκοι δεν είναι μόνο εγγενώς ανθεκτικοί σε διάφορα αντιβιοτικά, αλλά χαρακτηρίζονται επίσης από μια ισχυρή και μοναδική ικανότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού. Ο αυξανόμενος επιπολασμός στελεχών ανθεκτικών στην αμπικιλίνη, τις αμινογλυκοσίδες και τα γλυκοπεπτιδία και η απόκτηση ανθεκτικότητας στα λίγα διαθέσιμα για θεραπεία αντιβιοτικά, όπως η βανκομυκίνη, δημιουργούν σοβαρά προβλήματα στην κλινική θεραπεία (Franz et al., 2003).

Επιπλέον, η επιλεκτική πίεση που ασκείται από τη χρήση αντιβιοτικών ως προωθητικών της ανάπτυξης στα ζώα διατροφής φαίνεται ότι έχει δημιουργήσει μεγάλες δεξαμενές μεταβιβάσιμης αντοχής στα αντιβιοτικά σε διάφορα οικοσυστήματα (Franz et al., 2003).

1.6 Ταξινόμηση

Η ταυτοποίηση των εντερόκοκκων ήταν πάντα προβληματική, καθώς πολυάριθμοι απομονωμένοι εντερόκοκκοι, ιδίως από περιβαλλοντική πηγή, παραμένουν συχνά απροσδιόριστοι όταν η ταυτοποίησή τους βασίζεται μόνο σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Είναι δύσκολο να κατηγοριοποιηθούν με σαφήνεια τα απομονωμένα άτομα σε ένα από τα είδη του *Enterococcus* με φυσιολογικές δοκιμές, επειδή η ετερογένεια στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά είναι πολύ μεγάλη, ανεξάρτητα από την προέλευση του απομονωμένου ατόμου (Giraffa, 2002).

Το πρόβλημα με την ταξινόμια των εντερόκοκκων είναι γενικά ότι αποτελούν μια ετερογενή ομάδα θετικών κατά Gram κοκκίων που μοιράζονται πολλά χαρακτηριστικά με τα γένη *Streptococcus* και *Lactococcus*. Αυτό εξηγεί

γιατί οι εντερόκοκκοι που σχετίζονται με τα τρόφιμα έχουν συχνά θεωρηθεί ότι ανήκουν στη «γαλακτική» μικροχλωρίδα. Με βάση την καταγραφή του 16S rRNA, το γένος *Streptococcus* διαχωρίστηκε κατά τη δεκαετία του 1980 στα τρία γένη *Enterococcus*, *Lactococcus* και *Streptococcus*. Κατά συνέπεια, τα βακτήρια που προηγουμένως ονομάζονταν *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus avium* και *Streptococcus gallinarum* μεταφέρθηκαν το 1984 στο αναθεωρημένο γένος *Enterococcus* ως *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium* και *Enterococcus gallinarum*, αντίστοιχα (Foulquié Moreno et al., 2006).

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 28 είδη τα οποία ανήκουν στο γένος *Enterococcus*: *E. asini*, *E. avium*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, *E. villorum* (Foulquié Moreno et al., 2006).

Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη στους 37°C, αν και τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10 έως 45°C. Μπορούν, επίσης, και αναπτύσσονται παρουσία NaCl 6,5% και σε pH 9.6, ενώ επιζούν μετά από θέρμανση τους σε στους 60°C για 30 λεπτά (Foulquié Moreno et al., 2006).

Τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium*, παραμένουν τα δύο πιο κυρίαρχα είδη εντερόκοκκων και διαδραματίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο στα ζυμωμένα τρόφιμα, στα προβιοτικά, αλλά και σε λοιμώξεις που σχετίζονται με εντερόκοκκους. Ο *E. faecalis* είναι συχνά ο κυρίαρχος εντερόκοκκος στο ανθρώπινο έντερο, αν και σε κάποια άτομα ο *E. faecium* υπερεισχύει αριθμητικά του *E. faecalis*. Οι πληθυσμοί του *E. faecalis* στα ανθρώπινα κόπρανα κυμαίνονται από 10⁵ μέχρι 10⁷ cfu/gr σε σύγκριση με 10⁴ μέχρι 10⁵ cfu/gr για τον *E. faecium* (Franz et al., 2003).

1.7 Οι εντερόκοκκοι ως παθογόνα

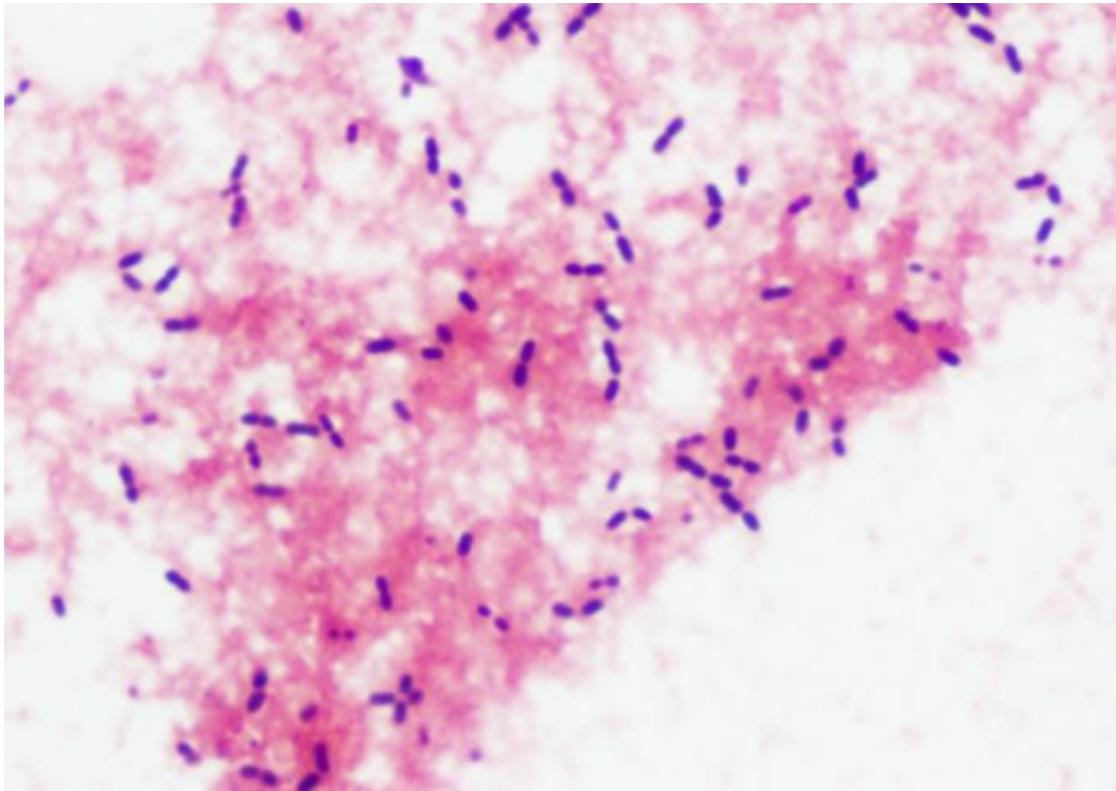
Οι εντερόκοκκοι έχουν αναδειχθεί σε σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και σε μονάδες εντατικής θεραπείας. Οι εντερόκοκκοι δεν διαθέτουν τους κοινούς παράγοντες ιογένεσης που απαντώνται σε πολλά άλλα βακτήρια, αλλά έχουν ορισμένα άλλα χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα την αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, που μπορεί να συμβάλλουν στην ιογένειά τους και να τους καθιστούν αποτελεσματικούς ευκαιριακούς παθογόνους παράγοντες (Giraffa, 2002).

Οι τροφιμογενείς εντερόκοκκοι δεν έχουν ακόμη εμπλακεί σαφώς ως άμεσες αιτίες κλινικών λοιμώξεων. Σε αυτό το πλαίσιο, οι αναφορές νοσοκομειακών λοιμώξεων που αποδίδονται σε εντερόκοκκους είναι δύσκολο να ερμηνευθούν, επειδή τα βακτήρια αυτά γενικά ταυτοποιούνται σε μικτές καλλιέργειες με άλλα πρωτογενή παθογόνα, όπως για παράδειγμα σταφυλόκοκκους. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι εντερόκοκκοι έχουν ενοχοποιηθεί για περιπτώσεις τροφικής δηλητηρίασης μέσω της παραγωγής βιογενών αμινών, με βάση την απομόνωσή τους σε υψηλούς αριθμούς από ύποπτα τρόφιμα, χωρίς όμως να είναι καθολικά αποδεκτή η αναφορά αυτή (Giraffa, 2002).

1.7.1 Κλινική επιδημιολογία

Οι εντερόκοκκοι συγκαταλέγονται πλέον μεταξύ των συνηθέστερων νοσοκομειακών παθογόνων, καθώς έχουν ενοχοποιηθεί ως σημαντική αιτία ενδοκαρδίτιδας, βακτηραιμίας, λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, του κεντρικού νευρικού συστήματος, ενδοκοιλιακών και πνευμονικών λοιμώξεων. Τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν επίσης ότι ο *E. faecalis* είναι το πιο κοινό είδος μεταξύ των εντερόκοκκων που απομονώνονται από ανθρώπινες ασθένειες (Εικόνα 2), ενώ ο *E. faecium*, ο οποίος σχετίζεται με την πλειονότητα των υπόλοιπων εντεροκοκκικών λοιμώξεων, μπορεί να εμφανίζει

μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Giraffa, 2002).



Εικόνα 4: *Enterococcus faecalis* με χρώση κατά gram σε καλλιέργεια αίματος (National Library of Medicine, 2013).

1.7.2 Παράγοντες που καθορίζουν την αυξανόμενη ιογένεια των εντερόκοκκων

Η αυξανόμενη ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων στα αντιβιοτικά και η παρουσία ενεργών μηχανισμών μεταφοράς γονιδίων επιδεινώνουν τα αυξανόμενα ευρήματα αυτών των βακτηρίων ως νοσοκομειακών ευκαιριακών οργανισμών. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά από μόνη της δεν μπορεί να εξηγήσει τη γονιμότητα αυτών των βακτηρίων ελλείψει παραγόντων παθογένειας (Eaton & Gasson, 2001).

Τα χαρακτηριστικά ιογένεσης στους εντερόκοκκους περιλαμβάνουν προσκόλληση στον ιστό του ξενιστή, εισβολή και σχηματισμό αποστήματος, αντίσταση και τροποποίηση των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή, έκκριση κυτταρολυσινών και άλλων τοξικών προϊόντων και παραγωγή φερομονών που κωδικοποιούνται από πλασμίδια. Μοριακοί έλεγχοι των παραγόντων ιογένεσης του *Enterococcus* έδειξαν ότι τα ιατρικά στελέχη *E. faecalis* είχαν περισσότερους παράγοντες ιογένεσης από τα στελέχη τροφίμων (Eaton & Gasson, 2001).

Πολλά από αυτά τα εντεροκοκκικά χαρακτηριστικά ιογένεσης, όπως η παραγωγή αιμολυσίνης-κυτταρολυσίνης, η ικανότητα προσκόλλησης και η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, έχει αποδειχθεί ότι μεταδίδονται με μηχανισμούς γονιδιακής μεταφοράς. Συχνά, το ίδιο πλασμίδιο μπορεί να κωδικοποιεί την απόκριση στη φερομόνη του φύλου και είτε γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είτε γονίδια παραγωγής αιμολυσίνης. Η ανταλλαγή γενετικού υλικού στο *E. faecalis* αποδείχθηκε ότι διευκολύνεται σε μεγάλο βαθμό από την απόκριση στη φερομόνη του φύλου. Οι φερομόνες φύλου θεωρείται, επίσης, ότι δρουν ως παράγοντες ιογένεσης προκαλώντας φλεγμονώδη αντίδραση του ξενιστή (Giraffa, 2002).

Η ιογένεια των εντερόκοκκων ενισχύεται έντονα από τη συχνή αντοχή τους στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, η οποία μπορεί να είναι τόσο ενδογενής όσο και επίκτητη, καθιστά τους εντερόκοκκους αποτελεσματικούς ευκαιριακούς παράγοντες σε νοσοκομειακές λοιμώξεις (Giraffa, 2002).

Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν εγγενή αντοχή στις κεφαλοσπορίνες, στις λινκοσαμίδες, σε πολλές β-λακτάμες και σε χαμηλά επίπεδα αμινογλυκοσιδών. Η εγγενής ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά υποδηλώνει ότι η θεραπεία της λοίμωξης θα μπορούσε να είναι δύσκολη. Εκτός από αυτές τις συστατικές αντοχές, οι εντερόκοκκοι έχουν αποκτήσει γενετικούς προσδιορισμούς που προσδίδουν αντοχή σε όλες τις κατηγορίες αντιμικροβιακών, συμπεριλαμβανομένης της χλωραμφενικόλης, των τετρακυκλινών και των γλυκοπεπτιδίων. Ο σημαντικότερος κίνδυνος που συνδέεται με τα τελευταία αυτά χαρακτηριστικά αντοχής είναι ότι είναι ως επί το πλείστον μεταβιβάσιμα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν όλα αυτά τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γνωρίσματα μπορούν να μεταφερθούν μέσω

φερομονικών, συζευκτικών πλασμιδίων ή τρανσποζονίων τόσο σε εντερόκοκκους όσο και σε πιο ιογενή παθογόνα, όπως ο *S. aureus* (Schwarz et al., 2001).

Στο πλαίσιο των επίκτητων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι αποτελούν ενδεχομένως την πιο σοβαρή ανησυχία που έχει ανακύψει πρόσφατα στις ανθρώπινες κλινικές λοιμώξεις. Έχουν περιγραφεί στους εντερόκοκκους δύο διακριτές μορφές μεταβιβάσιμων φαινοτύπων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη, ο φαινότυπος VanA, που συνδέεται με υψηλό επίπεδο επαγωγίμης αντοχής στη βανκομυκίνη και διασταυρούμενη αντοχή στην τεϊκοπλανίνη, και ο φαινότυπος VanB, που συνήθως εμφανίζει μεταβλητά επίπεδα επαγωγίμης αντοχής μόνο στη βανκομυκίνη (Schwarz et al., 2001).

Κεφάλαιο 2: Εντερόκοκκοι και τρόφιμα

2.1 Ψάρια

Η υδατοκαλλιέργεια είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος τομέας της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων, με ρυθμό ανάπτυξης άνω του 8,0%. Το 2017, η παγκόσμια παραγωγή ψαριών έφτασε τα 170,9 εκατομμύρια τόνους, περίπου 46,8% του συνόλου αυτής της παραγωγής προέρχεται από την υδατοκαλλιέργεια (FAO, 2018). Σύμφωνα με τα στοιχεία της PeixeBR, το 2018 η βραζιλιάνικη η παραγωγή ιχθυοτροφείων ισοδυναμούσε με 722.560 τόνους ψαριών και η έγινε η τέταρτη μεγαλύτερη παραγωγός τιλάπιας του Νείλου στον κόσμο (*Oreochromis niloticus*). Ένα σημαντικό μέρος των ψαριών παραγωγής στη Βραζιλία βρίσκεται στο Ρίο Γκράντε ντο Σουλ, με συνολική παραγωγή 23.000 τόνων/έτος, με υψηλή ποσοστό εξωτικών ψαριών (74,8%),

όπως ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*), πέστροφα (*Oncorhynchus* sp.) και ranga (*Pterogymnus lanianus*), ακολουθούμενη από την τιλάπια του Νείλου (*O. niloticus*) (17,8%). και αυτοφυή είδη (7,4%) (Araújo, Grassotti & Frazzon, 2021.).

Η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί μια από τις πιο πολύτιμες λύσεις για την υπερεκμετάλλευση των φυσικών πόρων (FAO, 2018). Ωστόσο, αν και οι ιχθυοκαλλιέργειες είναι μια από τις σημαντικότερες μορφές αλιείας που έχουν αναπτυχθεί στην Ελλάδα, λόγω της επέκτασης της παραγωγής ψαριών παγκοσμίως, τα απόβλητα ψαριών μπορούν να επηρεάσουν το τοπικό περιβάλλον μολύνοντας το νερό και το έδαφος. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη αποτελεσματικών υδατικών συστημάτων επαναχρησιμοποίησης που μειώνουν τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις και επιτρέπουν τη βιώσιμη ανάπτυξη θεωρούνται απαραίτητες για αυτή τη δραστηριότητα (Rocha et al., 2016).

Η υδατοκαλλιέργεια απαιτεί μεγάλες ποσότητες αντιμικροβιακών παραγόντων, οι οποίοι χορηγούνται ως προωθητές της ανάπτυξης. Τα λύματα από τις υδατοκαλλιέργειες που έχουν μολυνθεί με υπολείμματα αντιβιοτικών και άλλους χημικούς παράγοντες επιτρέπουν την επιλογή οργανισμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Rocha et al., 2016). Αυτά τα λύματα, όταν απορρίπτονται στα υδάτινα σώματα, χωρίς κατάλληλο σύστημα επεξεργασίας νερού, ευνοούν τη διαδικασία της φυσικής επιλογής ανθεκτικών βακτηρίων, χρησιμεύοντας ως όχημα για τη μετάδοση των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιμικροβιακά στο περιβάλλον (Rocha et al., 2016).

Η παρουσία βακτηριακών ειδών που φέρουν αντιμικροβιακό προφίλ ανθεκτικότητας έχει ήδη ανιχνευθεί σε συστήματα ιχθυοκαλλιέργειας, καθώς και σε υδάτινα απόβλητα. Μεταξύ των ανθεκτικών μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από διάφορα τύπους νερού, αναδεικνύονται οι εντερόκοκκοι (Novais et al., 2018).

Όπως προαναφέρθηκε, οι εντερόκοκκοι spp. θεωρούνται κοινόβιοι μικροοργανισμοί της στοματικής κοιλότητας, του ουρογεννητικού και του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου και των ζώων και είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον, απαντώντας στα φυτά, το έδαφος και το νερό. Τα εντεροκοκκικά είδη έχουν μεγάλη γονιδιωματική πλαστικότητα, μεγάλη ευελιξία ώστε να καταλαμβάνουν ευρείς οικολογικούς ρόλους, ικανά να

αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10 έως 45 °C, με βέλτιστη ανάπτυξη στους 35 °C και ανοχή στο αλάτι (6,5% NaCl). Επί του παρόντος, το γένος αποτελείται από περισσότερα από 50 είδη, με τον *Enterococcus faecalis* να κυριαρχεί στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών, ακολουθούμενος από τους *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* και *E. mundtii* (Novais et al. 2018).

Οι εντερόκοκκοι θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα, οι οποίοι αποτελούν τη δεύτερη συχνότερη αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων, που προσβάλλουν ιδιαίτερα το ουροποιητικό σύστημα, τραύματα και τους μαλακούς ιστούς. Η εμφάνιση των αντιβιοτικών ανθεκτικών εντερόκοκκων αποτελεί μείζον ζήτημα ανησυχίας για την ιατρική και τη δημόσια υγεία (Novais et al., 2018).

Ο *Enterococcus sp.* έχει αναδειχθεί σε ένα από τα σημαντικά παθογόνα των ψαριών, το οποίο επηρεάζει σοβαρά τις πρακτικές υδατοκαλλιέργειας παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισης ασθενειών των ψαριών που προκαλούνται από τον *Enterococcus sp.* αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία στην κίτρινη ουρά (*Seriola quinqueradiata*) και στη συνέχεια στο καλκάνι (*Scorpthalmus maximus*) και στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*). Το *E. faecalis* έχει αναφερθεί ως παθογόνο που προκαλεί στρεπτοκοκκική λοίμωξη σε τιλάπια σε λίμνες της Αιγύπτου και της Ταϊλάνδης. Στο Μπαγκλαντές, το οποίο κατατάσσεται στην πέμπτη θέση μεταξύ των χωρών παραγωγής υδατοκαλλιέργειας εσωτερικών υδάτων στον κόσμο, ο *Enterococcus sp.* απομονώνεται συχνά τόσο από υγιή όσο και από μολυσμένα ψάρια (Rahman et al., 2017).

Οι θετικοί κατά Gram εντερόκοκκοι θεωρούνται υπεύθυνοι για τις περισσότερες από τις ασθένειες που παρατηρούνται στις υδατοκαλλιέργειες σε όλο τον κόσμο. Οι εντεροκοκκικές λοιμώξεις συναντώνται σε όλο τον κόσμο, ενώ παρατηρούνται καθυστερημένη ανάπτυξη, ανορεξία, αδρανοποίηση, απώλεια της γυαλάδας και νέκρωση των μυών, σηψαιμία και θνησιμότητα σε ψάρια μολυσμένα με εντερόκοκκους. (Rahman et al., 2017).

Οι εντερόκοκκοι βρίσκονται κυρίως στο έντερο και μπορεί να φτάσουν τον αριθμό των 10^7 βακτηρίων/g. Εκτός από ζώντες οργανισμούς, οι εντερόκοκκοι απομονώθηκαν από επιφανειακά ύδατα, ποτάμια, λύματα,

έδαφος και διάφορα τρόφιμα. Η μεγάλη πλειονότητα των κλινικών λοιμώξεων προέρχεται από *E. faecalis* και *E. faecium*. Μεταξύ όλων των νοσοκομειακών λοιμώξεων, οι εντερόκοκκοι είναι τα δεύτερα πιο συχνά παθογόνα. Παρά την χαμηλή ιογένεια των εντεροκόκκων, η αύξηση των λοιμώξεών τους σε σοβαρό βαθμό και η ύπαρξη υψηλού ποσοστού θνησιμότητας αυξάνουν τη σημασία της μελέτης τους (Rahman et al., 2017).

Στη μελέτη των Savasan et al. (2016) συλλέχθηκαν 200 δείγματα ψαριών από διάφορες εμπορικές ιχθυοκαλλιέργειες στην περιοχή του Αιγαίου Πελάγους. Για την απομόνωση, τα δείγματα εμβολιάστηκαν σε επιλεκτικό μέσο *Enterococcus* Mbroth. Το μέσο επώαστηκε για 18-24 ώρες στους 37°C. Η αλλαγή του χρώματος του μέσου αξιολογήθηκε ως δείκτης ανάπτυξης των εντερόκοκκων στο μέσο. Οι θετικές καλλιέργειες ζυμού μεταφέρθηκαν στο BBLTM *Enterococcus* Agar (EA) για την απομόνωση των εντερόκοκκων. Οι πλάκες επώαστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37°C. Στο τέλος της περιόδου επώασης, οι μαύρες και σκούρες καστανές αποικίες θεωρήθηκαν ως εντερόκοκκοι. Για την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους, έγινε χρώση κατά Gram, δοκιμασίες καταλάσης σε αντικειμενοφόρο πλάκα, αναπαραγωγή με αέρια από μαννιτόλη και αναπαραγωγή στους 45°C για να διαπιστωθούν οι πιθανές θετικές αποικίες. Παρατηρήθηκαν στελέχη που έδωσαν θετικά αποτελέσματα στις δοκιμασίες και τα οποία ονομάστηκαν *Enterococcus* sp. (Savasan et al., 2016).

2.2 Λαχανικά και Φρούτα

Ως πηγές υψηλής ενέργειας και πλούσια σε μέταλλα, βιταμίνες, φυτικές ίνες και φαινόλες, τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν μια σημαντική ομάδα τροφίμων που έχει συνδεθεί με τη διατήρηση της ευημερίας των ανθρώπων και με τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης ορισμένων χρόνιων ασθενειών. Εκτός από τη διατροφική αξία των φρέσκων προϊόντων, τα ποικίλα μικροβιώματά τους μπορούν να περάσουν από το στομάχι στο έντερο, όπου δημιουργούν συγκεκριμένες ενώσεις με τον ξενιστή με αποτέλεσμα διάφορες επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (McGowan et al., 2006).

Από την άλλη πλευρά, έχει διαπιστωθεί ότι η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών τα τελευταία χρόνια συνοδεύεται από αύξηση του αριθμού των ανθρώπινων λοιμώξεων και κρουσμάτων, καθώς αυτά μπορούν να χρησιμεύσουν ως δεξαμενές για παθογόνα ή ευκαιρικά παθογόνα. Τα φρούτα και τα λαχανικά μπορούν να μολυνθούν με αλλοιωμένα ή παθογόνα βακτήρια σε οποιοδήποτε στάδιο από την παραγωγή έως την κατανάλωση (McGowan et al., 2006).

Αν και οι εντερόκοκκοι θεωρούνται ευκαιρικά παθογόνα, μπορούν να αποτελέσουν δεξαμενές αντιμικροβιακής αντοχής. Η μικροβιακή αντοχή αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη σημασία λόγω των τροφιμογενών ασθενειών από το κρέας και των λοιμώξεων από τα προϊόντα. Στη μελέτη των McGowan et al. (2006) λήφθηκαν τρόφιμα (λαχανικά, φρούτα και κρέατα) από αλυσίδες παντοπωλείων στη βόρεια Γεωργία από το 2000 έως το 2001, και καλλιεργήθηκαν για την παρουσία εντερόκοκκων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα 47,7% (189 από 396) των δειγμάτων αυτών ήταν θετικά για εντερόκοκκους.

Για τα φρούτα και τα λαχανικά, οι εντερόκοκκοι καλλιεργήθηκαν συχνότερα από ντομάτες (9 από 27 δείγματα, 33%) και ραπανάκια (10 από 11 δείγματα, 91%), αντίστοιχα. Το επικρατέστερο είδος που ταυτοποιήθηκε ήταν ο *Enterococcus casseliflavus* (n=66) από τα φρούτα και τα λαχανικά. Παρόλο που μεγάλος αριθμός απομονωθέντων ήταν ανθεκτικός στη λινκομυκίνη (176 από τα 185 απομονωθέντα, 95,1%) και στη βακιτρακίνη (150 από τα 185 απομονωθέντα, 81,1%), πολύ λίγα απομονωθέντα ήταν ανθεκτικά στη σαλινομυκίνη (2 απομονωθέντα, 1,1%), στην πενικιλίνη (3 απομονωθέντα, 1,6%) ή στη νιτροφουραντοΐνη (9 απομονωθέντα, 4,9%). Κανένα από τα απομονωθέντα στελέχη δεν ήταν ανθεκτικό στη λινεζολίδη ή στη βανκομυκίνη. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι τα τρόφιμα που αγοράζονται συνήθως από τα παντοπωλεία αποτελούν πηγή εντερόκοκκων (McGowan et al., 2006).

Στη μελέτη των Al-kharousi et al. (2016), τα δείγματα αγοράστηκαν από τις τοπικές αγορές του Muscat ή της Nizwa, στο Ομάν, κατά την περίοδο από τον Απρίλιο έως τον Σεπτέμβριο του 2014. Τα εισαγόμενα φρούτα και λαχανικά προέρχονταν από διάφορες χώρες και επιλέχθηκαν ανάλογα με τη διαθεσιμότητά τους στην αγορά κατά τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Για κάθε τύπο φρούτων ή λαχανικών που προέρχονταν από την ίδια χώρα

ελήφθησαν τρία δείγματα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν ασηπτικά και διατηρήθηκαν στο ψυγείο μέχρι να αναλυθούν εντός 24 ωρών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο εντερόκοκκος απομονώθηκε από όλους τους τύπους των εξεταζόμενων φρούτων και λαχανικών (τοπικών ή/και εισαγόμενων) εκτός από την μπανάνα, το ρόδι, το καρότο και την πιπεριά. Ο υψηλότερος αριθμός *Enterococcus* βρέθηκε στο τοπικό λάχανο και ακολούθησε η τοπική παπάγια. Η παρουσία του εντερόκοκκου υποδηλώνει κοπρανώδη μόλυνση που μπορεί να μην είναι πρόσφατη, καθώς μπορεί να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον. Ωστόσο, εκτός από τον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων και των ανθρώπων, αυτός ο οργανισμός μπορεί να βρεθεί στο έδαφος και στα φυτά, αλλά η ταυτοποίηση των ειδών θα μπορούσε να βοηθήσει στη διάκριση της πηγής του *Enterococcus* (Al-kharousi et al. ,2016).

Ο *E. faecalis* και ο *E. faecium* μπορεί να είναι καλύτερος δείκτης μόλυνσης με ανθρώπινα κόπρανα από τον *Enterococcus casseliflavus* και τον *Enterococcus mundtii* που είναι πιο διαδεδομένοι στο περιβάλλον. Στην παραπάνω μελέτη, ο *E. faecalis* απομονώθηκε από μαρούλι που εισήχθη από την Ιορδανία και το Ιράν και από ραπανάκι, μάνγκο και παπάγια που παράγονται στο Ομάν, ενώ ο *E. faecium* απομονώθηκε από λάχανο που παράγεται στο Ομάν και από μαρούλι που εισήχθη από την Ιορδανία. Σε άλλες μελέτες, ο *E. faecalis* απομονώθηκε από μαρούλι, ραπανάκι, ντομάτα, μήλο, αγγούρι, πατάτα, φύτρα και καρότο, ενώ ο *E. faecium* απομονώθηκε από χουρμάδες, μαρούλι, ντομάτα και προϊόν σόγιας (Al-kharousi et al. ,2016).

Ο *E. casseliflavus* ήταν το πιο κοινό είδος *Enterococcus* (13 απομονώσεις), ενώ βρέθηκαν τρεις απομονώσεις του *Enterococcus ludwigii* (πιπεριά, αγγούρι, ντομάτα (Ομάν)), 1 απομόνωση του *Enterococcus hiraе* (παπάγια, Ομάν) και 1 απομόνωση του *Enterococcus raffinosus* (χουρμάδες, Ομάν). Τρία είδη του γένους *Enterococcus* που δεν ταυτοποιήθηκαν με παρόμοιο τρόπο με το VITEK 2 και την PCR δεν περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων της τελευταίας έκδοσης του VITEK 2, συμπεριλαμβανομένων των *E. mundtii*, *E. sulfureus* και *E. gilvus*. Οι *E. hiraе* και *E. mundtii* είχαν απομονωθεί στο παρελθόν από διάφορα φρούτα και λαχανικά. Αποδείχθηκε ότι μπορεί να υπάρξει γενετική ανταλλαγή καθοριστικών παραγόντων virulens

μεταξύ απομονωμένων τροφίμων και κλινικών απομονωμένων ατόμων του *E. faecium*. Επομένως, τα μολυσμένα τρόφιμα ενδέχεται να αποτελούν κίνδυνο και πηγή νοσοκομειακών λοιμώξεων (Al-kharousi et al., 2016).

2.3 Γάλα και Γαλακτομικά προϊόντα

Οι εντερόκοκκοι έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη γαλακτοβιομηχανία. Εμφανίζονται ως βακτήρια γαλακτικού οξέος σε διάφορα τυριά, ιδίως σε χειροποίητα τυριά που παράγονται στη νότια Ευρώπη από νωπό ή παστεριωμένο γάλα, καθώς και σε φυσικές καλλιέργειες εκκίνησης γάλακτος ή ορού γάλακτος. Παίζουν αναγνωρισμένο ρόλο στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών κατά την ωρίμανση πολλών τυριών, ενώ η θετική επίδραση των εντερόκοκκων στο τυρί φαίνεται να οφείλεται σε συγκεκριμένα βιοχημικά χαρακτηριστικά, όπως η λιπολυτική δραστηριότητα, η αξιοποίηση των κιτρικών και η παραγωγή αρωματικών πτητικών ενώσεων (Giraffa, 2003).

Ορισμένοι εντερόκοκκοι γαλακτοκομικής προέλευσης έχουν επίσης αναφερθεί ότι παράγουν βακτηριοκίνες (εντεροκίνες) ανασταλτικές έναντι των βακτηρίων που αλλοιώνουν τα τρόφιμα ή των παθογόνων βακτηρίων, όπως *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium spp.* και *Bacillus spp.* Η τεχνολογική εφαρμογή των εντεροκινών, που αποδείχθηκε ότι παράγονται κατά την παρασκευή τυριών, οδήγησε στο να προταθούν οι εντερόκοκκοι ως συμπληρωματικές καλλιέργειες εκκίνησης ή προστασίας στα τυριά. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι εντερόκοκκοι, είτε προστιθέμενοι ως συμπληρωματικοί εκκινητές είτε παρόντες ως μη εκκινητές NSLAB, θα μπορούσαν να βρουν πιθανή εφαρμογή στην επεξεργασία ορισμένων ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων (Giraffa, 2003).

Οι εντερόκοκκοι μπορεί να υπάρχουν σε μεγάλους αριθμούς στα γαλακτοκομικά προϊόντα (έως και 10^8 CFU g⁻¹). Είναι από τα πιο κοινά γαλακτικά βακτήρια στο νωπό γάλα, στο οποίο έχουν πρόσβαση από το

γαλακτοκομικό περιβάλλον, τα ζώα και τον άνθρωπο. Παρά τη σχέση τους με το εντερικό μικροβίοκοσμο του ανθρώπου και των γαλακτοπαραγωγών ζώων, η μόλυνση με κόπρανά δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την είσοδο των εντερόκοκκων στην αλυσίδα παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων (Darkevicus et al., 2021).

Αντίθετα, ο εξοπλισμός αρμέγματος έχει θεωρηθεί ως η κύρια πηγή τους στο νωπό γάλα. Η μελέτη των Gelsomino et al. (2002) έδειξε ότι η αρμεκτική μηχανή και το δεξαμενή χύδην αποτελούν σημαντικές πηγές εντερόκοκκων για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το αρμεκτήριο βρέθηκε ότι είναι η πιθανή πηγή των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων (VRE) παρά τα ζώα. Η μαστίτιδα μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή πολυανθεκτικών εντερόκοκκων. Η εποχή του έτους μπορεί επίσης να παίζει ρόλο στη διαμόρφωση της ποικιλότητας των εντερόκοκκων σε νωπό γάλα (McAuley et al., 2015).

Το νωπό γάλα μπορεί, επομένως, να χρησιμεύσει ως πηγή εντερόκοκκων για τα γαλακτοκομικά προϊόντα, ακόμη και όταν εφαρμόζεται παστερίωση κατά την εκ των υστέρων επεξεργασία. Υπάρχουν πράγματι αναφορές για εντερόκοκκους που επιβιώνουν σε θερμοκρασίες παστερίωσης. Η θερμική τους αντοχή, ωστόσο, δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή, είναι εξαιρετικά μεταβλητή και εξαρτάται από το είδος, με τιμές z που κυμαίνονται από 5,0 (*E. faecalis*) έως 9,8 °C (*E. hirae*) (McAuley et al., 2012).

Η θερμική αντίσταση των εντερόκοκκων εξαρτάται επίσης από την φάση ανάπτυξης και το προηγούμενο θερμικό ιστορικό των κυττάρων. Ως εκ τούτου, η μικροβιακή χλωρίδα του εντερόκοκκου στο παστεριωμένο γάλα διαφέρει από αυτό του νωπού γάλακτος. Αν και ο *Enterococcus durans* τείνει να επικρατεί στο πρώτο, το επικρατέστερο εντεροκοκκικό είδος στο δεύτερο είναι το *E. faecalis*. Εκτός από τον θερμοδιαλυτικό τους χαρακτήρα, η επαναμόλυνση μετά την επεξεργασία εξηγεί την παρουσία εντερόκοκκων σε παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το τυρί, με τα βιοϋμένια στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με το γάλα να λειτουργούν ως πιθανή πηγή υψηλών αριθμών βακτηρίων (Jamet et al., 2012).

Οι *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, καθώς και (αν και σπάνια) *E. saccharominimum* και *E. italicus*, έχουν απομονωθεί από το νωπό γάλα αγελάδων, αιγών και προβάτων. Επιπλέον, οι *E. dispar*, *E.*

malodoratus, *E. pseudoavium* και *E. gallinarum* έχουν απομονωθεί τόσο σε αγελαδινό όσο και σε πρόβειο γάλα. *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. aquamarinus*, *E. asini*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, και *E. raffinosus* έχουν περιγράφονται μόνο στο αγελαδινό γάλα, ενώ ο *E. vikkersis* βρέθηκε μόνο στο γάλα προβατίνας (Dapkevicius et al., 2021).

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν μέρος του γαλακτικού μικροβιόκοσμου πολλών ποικιλιών χειροποίητων τυριών. Ανάλογα με την ποικιλία τυριού και τις συνθήκες τυροκόμησης, μπορεί να φτάσουν σε επίπεδα έως και 10^8 CFU g⁻¹ σε ώριμα τυριά. Στο τυρόπηγμα, οι εντερόκοκκοι μπορεί να φθάσουν σε επίπεδα πληθυσμού 10^7 CFU g⁻¹. Σε ορισμένα χειροποίητα τυριά, όπως τα Armada, Cebreiro, Comté, Feta, Fontina, Majorero, Manchego, Mozzarella, Monte Veronese, Serra και Teleme, οι εντερόκοκκοι είναι το κυρίαρχο είδος. Ο αριθμός τους έχει βρεθεί υψηλότερος στα φρέσκα από ό,τι στα ώριμα τυριά και οι εντεροκοκκικοί πληθυσμοί τείνουν συχνά να μειώνονται προς το τέλος της ωρίμανσης σε τυριά μακράς ωρίμανσης, όπως το Kashkaval, Valdeón, Calenzana, Fiore Sardo, Provolone del Monaco και Montasio (Dapkevicius et al., 2021).

Δεκαεννέα είδη εντερόκοκκων έχουν περιγραφεί μέχρι στιγμής σε χειροποίητα τυριά, τα οποία είναι τα εξής: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. devriesei*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. hirae*, *E. italicus*, *E. lactis*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. pseudoavium*, *E. ratti*, *E. saccharominimus*, *E. sulfureus* και *E. villorum*, ενώ αντιστοιχούν στο ένα τρίτο περίπου των ειδών που αναγνωρίζονται σήμερα σε αυτό το γένος. Σε πολλές ποικιλίες τυριών, τα πιο διαδεδομένα είδη εντερόκοκκου είναι το *E. faecalis* και *E. faecium* και, σε μικρότερο βαθμό, *E. durans* (Dapkevicius et al., 2021).

Είναι, ωστόσο, σημαντικό να σημειωθεί ότι φθηνότερες ανεξάρτητες από καλλιέργειες μεθοδολογίες δεν έγιναν ευρέως διαθέσιμες μέχρι πρόσφατα και αυτό μπορεί να έχει περιορίσει τον αριθμό των ειδών που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα. Στο μέλλον, μια αυξανόμενη προσβασιμότητα σε τέτοιες μεθοδολογίες μπορεί να οδηγήσει σε αναφορές σχετικά με την παρουσία άλλων ειδών, ακόμη και στην ανακάλυψη νέων εντερόκοκκων στο τυρί.

Αρκετά από τα εντεροκοκκικά είδη που περιγράφονται στο νωπό γάλα, όπως για παράδειγμα *E. faecalis*, *E. faecium* και *E. mundtii*, είναι γνωστό ότι

περιλαμβάνουν στελέχη που παράγουν βακτηριοκίνες. Ως εκ τούτου, οι εντερόκοκκοι ενδέχεται να διαδραματίζουν ρόλο στη διαμόρφωση της μικροβιακής χλωρίδας του γάλακτος, καθώς και των βακτηριακών κοινοτήτων εντός των γαλακτοκομικών προϊόντων, συμβάλλοντας έτσι τόσο στην ασφάλειά τους όσο και στις αισθητηριακές τους ιδιότητες. Αρκετά είδη εντερόκοκκων από νωπό γάλα έχουν επιδείξει σημαντικές τεχνολογικές ιδιότητες με αντίκτυπο στις οργανοληπτικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων όπως παραγωγή διακετυλίου, αυτολυτική δραστηριότητα, πρωτεολυτική δραστηριότητα και λιπολυτική δραστηριότητα, καθώς και προβιοτικό δυναμικό (Darkevicus et al., 2021).

Η βιβλιογραφία δείχνει ότι τα πολύπλοκα βιοχημικά και οικολογικά φαινόμενα που εξηγούν την τεχνολογική λειτουργικότητα των εντερόκοκκων στα γαλακτοκομικά προϊόντα, δεν έχουν ακόμη κατανοηθεί πλήρως. Σαφώς, η κλινική έρευνα για τους εντερόκοκκους υπογραμμίζει επίσης ότι η ασφάλεια των γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν εντερόκοκκους είναι ένα θέμα που η βιομηχανία πρέπει να εξετάζει προσεκτικά πριν την εφαρμογή τους (Giraffa, 2003).

2.4 Κρέας

Στην μελέτη των Manson et al. (2019), πραγματοποιήθηκε μια εμπειρισταωμένη ανάλυση των βακτηρίων *Enterococcus* που απομονώθηκαν από κρέας κοτόπουλου σούπερ μάρκετ που συλλέχθηκε από την Ένωση Καταναλωτών το 2013. Διαπιστώσαμε ότι τα περισσότερα από τα απομονωμένα βακτήρια που καλλιεργήθηκαν από κρέας κοτόπουλου ανήκαν στα είδη *E. faecalis* και *E. faecium*, τα δύο είδη που εμπλέκονται συχνότερα σε ανθρώπινες εντεροκοκκικές λοιμώξεις. Τα είδη εντερόκοκκου που σχετίζονται με πτηνά, συμπεριλαμβανομένων των *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium* και *E. cecorum*, ήταν σπανιότερα μεταξύ του κρέατος κοτόπουλου του σούπερ μάρκετ. Τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium* είναι, μακράν, τα δύο είδη εντερόκοκκου που συνδέονται συχνότερα με ανθρώπινες

λοιμώξεις, οπότε είναι αξιοσημείωτο ότι αυτά είναι επίσης ευρέως διαδεδομένα στα τρόφιμα.

Ο αντίκτυπος της πρακτικής εκτροφής ήταν ιδιαίτερα εντυπωσιακός σε μια σύγκριση ολόκληρων των γονιδιωμάτων δύο πολύ στενά συνδεδεμένων απομονωμένων ατόμων *E. faecium* που καλλιεργήθηκαν από κρέας με διαφορετικές χρήσεις αντιβιοτικών. Παρά τη διαφορά μόνο οκτώ SNPs στο κεντρικό γονιδίωμά τους, η απομόνωση από κρέας συμβατικής εκτροφής είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πλασμίδια και γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα γεωργικά αντιβιοτικά αποτελούν ισχυρή επιλεκτική πίεση που οδηγεί σε ταχεία προσαρμογή προς όλο και πιο ανθεκτικούς οργανισμούς.

Ενώ είναι γνωστό ότι οι εντερόκοκκοι είναι εγγενώς ανθεκτικοί σε μια ευρεία ποικιλία ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών, ένας μεγάλος αριθμός απομονωθέντων στελεχών ήταν επίσης ανθεκτικοί σε υψηλά επίπεδα αμινογλυκοσιδών, καθώς και σε αντιβιοτικά λινκοζαμιδίου, μακρολιδίου, σουλφοναμιδίου και τετρακυκλίνης. Όλες αυτές οι κατηγορίες αντιβιοτικών είναι επί του παρόντος εγκεκριμένες για χρήση σε ζώα παραγωγής τροφίμων. Στη μελέτη των Manson et al. (2019) παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη αντοχή σε αυτά τα φάρμακα μεταξύ των στελεχών *E. faecium* που απομονώθηκαν από συμβατικές φάρμες σε σχέση με εκείνες που ισχυρίζονται ότι δεν χρησιμοποιούν αντιβιοτικά, καθώς και μεγαλύτερη αντοχή γενικά μεταξύ των απομονωμένων στελεχών *E. faecium* σε σχέση με τα απομονωμένα στελέχη *E. faecalis*.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης συμφωνούν με εκείνα προηγούμενων μελετών, οι οποίες έδειξαν ότι η αντοχή έναντι των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για την προώθηση της ανάπτυξης ήταν πιο διαδεδομένη στο *E. faecium* από ότι στο *E. faecalis*. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μικρή αντοχή σε κλινικούς παράγοντες δεύτερης γραμμής που προορίζονται για τη θεραπεία της ανθεκτικής στα αντιβιοτικά εντεροκοκκικής λοίμωξης, εκτός από την αντοχή στη δαπτομυκίνη, η οποία ήταν 6 φορές υψηλότερη από εκείνη στα νοσοκομεία (2,5% των στελεχών), ή σε άλλα φάρμακα που δεν χρησιμοποιούνται στη γεωργία, γεγονός που μπορεί να αποτελεί κίνδυνο, καθώς τα κοινά γονίδια αντοχής μπορεί να συνδέονται σε κινητά γενετικά στοιχεία (Manson et al., 2019).

Στη μελέτη των Tyson et al. (2017). στο πλαίσιο του Εθνικού Συστήματος Παρακολούθησης της Μικροβιακής Αντοχής (NARMS), αξιολογήθηκαν διάφορα προϊόντα λιανικής πώλησης κρέατος για την παρουσία εντερόκοκκων από το 2002 έως το 2014 και διαπιστώθηκε ότι το 92,0% ήταν μολυσμένα. Η πλειονότητα των απομονωθέντων ήταν είτε *Enterococcus faecalis* (64,0%), είτε *Enterococcus faecium* (28,6%). Ο επιπολασμός της αντοχής για διάφορα φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων της ερυθρομυκίνης και της γενταμυκίνης, ήταν σημαντικά υψηλότερος μεταξύ των απομονωμένων πτηνών, σε σύγκριση με τις απομονώσεις λιανικής πώλησης βοείου ή χοιρινού κρέατος. Κανένα από τα απομονωθέντα στελέχη δεν ήταν ανθεκτικό στο κλινικά σημαντικό ανθρώπινο φάρμακο βανκομυκίνη, μόνο 1 απομονωθέν στελέχος ήταν ανθεκτικό στη λινεζολίδη και η αντοχή στην τιγκεκυκλίνη ήταν κάτω από 1%. Αντίθετα, η πλειονότητα των απομονώσεων τόσο του *E. faecalis* (67,5%) όσο και του *E. faecium* (53,7%) ήταν ανθεκτικές στην τετρακυκλίνη (Tyson et al., 2017).

Το Μπαγκλαντές είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες της κτηνοτροφικής βιομηχανίας της Νότιας Ασίας, ιδίως στη βιομηχανία πουλερικών. Οι βιομηχανίες πουλερικών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση της φτώχειας και στην οικονομική ανάπτυξη του Μπαγκλαντές. Στο Μπαγκλαντές, από το σύνολο των ζωικών πρωτεϊνών που προμηθεύεται το 37% περίπου προέρχεται από κρέας πουλερικών. Σύμφωνα με έρευνα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), οι άνθρωποι στο Μπαγκλαντές καταναλώνουν 15,23 κιλά κρέας ανά άτομο το χρόνο και τα πουλερικά παρέχουν το 35,25% της συνολικής προσφοράς κρέατος.

Στη μελέτη των Bobby et al. (2016), απομονώθηκαν *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium* από κλινικές λοιμώξεις (ούρα, πύον και επιχρίσματα τραυμάτων) στο νοσοκομείο Mymensingh medical college από το 2015 έως το 2016. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα πτηνά δεν νοσούν και η παραγωγή δεν επηρεάζεται. Ο βαθμός της ασθένειας εξαρτάται από παράγοντες τόσο του ξενιστή όσο και των βακτηρίων. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα επιπήρησης του *Enterococcus spp.* που σχετίζεται με πουλερικά στο Μπαγκλαντές.

Στη μελέτη των Banik et al. (2018) συλλέχθηκαν συνολικά 24 δείγματα κρέατος από διάφορες περιοχές της Gazipur. Τα δείγματα περιλάμβαναν 15

δείγματα κρέατος πουλερικών κοτόπουλου και 9 δείγματα κρέατος περιστερών, τα οποία αγοράστηκαν από τα διάφορα τοπικά καταστήματα κρέατος στην περιοχή Gazipur κατά τη διάρκεια του Αυγούστου 2017 έως τον Μάρτιο 2018. Σε αυτή τη μελέτη, τα περισσότερα δείγματα έδειξαν *θετικό* *Enterococcus spp.* στα χαμηλότερα επίπεδα μόλυνσης που βρέθηκαν στο κρέας.

2.5 Νερό

Η ποιότητα του νερού έχει σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία και η κακή ποιότητα του νερού συνδέεται με μεταδιδόμενες ασθένειες όπως η διάρροια, η χολέρα, η δυσεντερία και οι παρασιτικές και ιογενείς λοιμώξεις (Rosado-García et al., 2017). Περισσότεροι από 842.000 θάνατοι που σχετίζονται με τη διάρροια σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος (LMICs) σχετίζονται με ανεπαρκείς συνθήκες ύδρευσης, αποχέτευσης και υγιεινής (Prüss-Ustün et al., 2014). Στις ΗΠΑ, ο αριθμός των γαστρεντερικών περιστατικών από πόσιμο νερό κυμαίνεται από 12 έως 19 εκατομμύρια ετησίως (Ashbolt, 2015). Η δημοτική επιφανειακή παροχή νερού εμπλέκεται σε 26 εκατομμύρια λοιμώξεις και 13 εκατομμύρια ασθένειες ετησίως (Reynolds et al., 2008).

Ο Horton (1965) εισήγαγε την έννοια του δείκτη για την αξιολόγηση της κατάστασης της ποιότητας του νερού (WQI) σε ποταμούς επιλέγοντας τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεταβλητές ποιότητας του νερού, όπως το διαλυμένο οξυγόνο (DO), το pH, τα κολοβακτηριοειδή, η ειδική αγωγιμότητα, το εκχύλισμα χλωροφωρμίου άνθρακα (CCE), η αλκαλικότητα και η περιεκτικότητα σε χλωρίδια. Ένας Δείκτης Ποιότητας Νερού επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της ποιότητας του νερού με τη μείωση ενός μεγάλου αριθμού φυσικών, χημικών και βιολογικών μεταβλητών σε έναν ενιαίο, χωρίς διαστάσεις δείκτη σε αναπαραγώγιμη μορφή. Στη συνέχεια, έχουν αναπτυχθεί αρκετοί δείκτες WQI, άλλοι για τη γενική αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων και άλλοι με ειδικές εφαρμογές, όπως τα ύδατα αναψυχής, οι υδατοκαλλιέργειες ή η ρύπανση των υδάτων (Almeida et al. 2008).

Οι εντερόκοκκοι βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα ανθρώπινα κόπρανα, συνήθως μεταξύ 10^4 και 10^6 βακτηρίων ανά γραμμάριο υγρού βάρους. Παρόλο που οι εντερόκοκκοι αντιπροσωπεύουν συνήθως λιγότερο από το 1% της χλωρίδας, είναι συνήθως παρόντες στα κόπρανα, αλλά υπερτερούν σε αριθμό από άλλα βακτήρια. Λόγω της πανταχού παρουσίας τους στα ανθρώπινα κόπρανα και της παραμονής τους στο περιβάλλον, οι εντερόκοκκοι έχουν υιοθετηθεί ως δείκτες ανθρώπινης κοπρανώδους ρύπανσης στο νερό. Πιο πρόσφατα, οι πυκνότητές τους στα ανθρώπινα χέρια χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες υγιεινής των χεριών. Ωστόσο, η χρήση των εντερόκοκκων ως δεικτών ανθρώπινης κοπρανώδους ρύπανσης ή μόλυνσης μπορεί να είναι προβληματική, επειδή οι εντερόκοκκοι βρίσκονται επίσης στα κόπρανα των ζώων, στο έδαφος και στα φυτά. Αν και υπάρχει συζήτηση σχετικά με το βαθμό στον οποίο αυτό συμβαίνει στη φύση, υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι εντερόκοκκοι είναι ικανοί να αναπαράγονται σε εξωεντερικά περιβάλλοντα, όπως στην άμμο της παραλίας και σε νερό που περιέχει φύκια και πλαγκτόν (Mote, Turner, & Lipp, 2012).

Τόσο τα πόσιμα ύδατα όσο και τα ύδατα αναψυχής παρακολουθούνται ως προς τη μικροβιακή ποιότητα. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), οι εντερόκοκκοι χρησιμοποιούνται ως δείκτες μόλυνσης του πόσιμου νερού, ενώ οι εντερόκοκκοι δεν επιτρέπονται σε ένα δείγμα 100 mL ελεγμένου πόσιμου νερού που ρέει από μια βρύση και δεν επιτρέπονται σε ένα δείγμα 250 mL εμφιαλωμένου νερού (Boehm & Sassoubre, 2014).

Ο *Enterococcus faecalis* είναι ένα σημαντικό ευκαιριακό παθογόνο που ανιχνεύεται συχνά σε μεταλλικό νερό και νερό πηγής για ανθρώπινη κατανάλωση και προκαλεί λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, ενδοκαρδίτιδα και νεογνική σήψη. Στη μελέτη των Wei et al. (2017) προσδιορίστηκε ο επιπολασμός των γονιδίων μολυσματικότητας, της αντιμικροβιακής αντοχής και της γενετικής ποικιλομορφίας του *E. faecalis* από μεταλλικό νερό και νερό πηγής στην Κίνα. Από 314 δείγματα νερού που συλλέχθηκαν από τον Ιανουάριο 2013 έως τον Ιανουάριο 2014, 48 δείγματα (15,3%) ήταν μολυσμένα με *E. faecalis*. Το υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης εμφανίστηκε σε νερό πηγής φιλτραρισμένο με ενεργό άνθρακα (34,5%), ακολουθούμενο από νερό πηγής (32,3%) και νερό πηγής μεταλλικού νερού (6,4%) (Wei et al., 2017).

Η δοκιμή γονιδίων ιογένεσης 58 απομονωμένων στελεχών *E. faecalis* έδειξε ότι τα ποσοστά ανίχνευσης των *asa1*, *ace*, *cylA*, *gelE* και *hyl* ήταν 79,3, 39,7, 0, 100, 0%, αντίστοιχα. Και τα 58 απομονωμένα στελέχη *E. faecalis* δεν ήταν ανθεκτικά σε 12 είδη αντιβιοτικών (πενικιλίνη, αμπικιλίνη, λινεζολίδη, κινουπριστίνη/νταλφοπριστίνη, βανκομυκίνη, γενταμυκίνη, στρεπτομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, νορφλοξασίνη, νιτροφουραντοΐνη και τετρακυκλίνη). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υπέδειξαν ότι το νερό πηγής θα μπορούσε να είναι δυνητικός φορέας μετάδοσης του *E. faecalis* (Wei et al., 2017).

Επομένως, τα εργοστάσια παραγωγής μεταλλικού νερού και νερού πηγής πρέπει να δώσουν μεγάλη προσοχή στη μόλυνση των φίλτρων ενεργού άνθρακα, ενώ τα δεδομένα αυτά μπορούν να παράσχουν χρήσιμες πληροφορίες για την ανάπτυξη πολιτικών δημόσιας υγείας και αποτελεσματικών στρατηγικών για τη διασφάλιση της ασφάλειας των προϊόντων πόσιμου νερού.

2.6 Μέθοδοι ανίχνευσης των εντερόκοκκων στα τρόφιμα

Λόγω της σημασίας τους ως δείκτες κοπρανώδους ρύπανσης, έχει καταβληθεί μεγάλη προσπάθεια για την ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης των εντερόκοκκων στο περιβάλλον. Διατίθενται εκλεκτικά στερεά και υγρά μέσα για την ανίχνευση και απομόνωση των οργανισμών σε ένα βήμα. Έχουν επίσης αναπτυχθεί δοκιμασίες ποσοτικής PCR (QPCR) που στοχεύουν στο οπερόνιο 23s rRNA. Έχουν εγκριθεί τυποποιημένες μέθοδοι για την ανίχνευση εντερόκοκκων στο νερό, συμπεριλαμβανομένης της μεθόδου 1600 της Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (USEPA) (United States Environmental Protection Agency, 2006), της μεθόδου A της USEPA (United States Environmental Protection Agency, 2010) και των μεθόδων 7899-2 (International Organization for Standardization (ISO) (International Organization for Standardization, 2000) και ISO 7899-1 (International Organization for Standardization, 1998). Οι δοκιμασίες Enterolert και Enterolert-E της IDEXX (Westbrook, ME) με καθορισμένο υπόστρωμα

είναι επίσης εγκεκριμένες για την ανίχνευση εντερόκοκκων στο νερό στις ΗΠΑ και στην ΕΕ, αντίστοιχα (Boehm & Sassoubre, 2014).

Μια σημαντική πρόκληση για το εργαστήριο είναι η ταχεία ανίχνευση του *Enterococcus* spp. και ο ταυτόχρονος προσδιορισμός της ευαισθησίας τους στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Συνήθως, οι εντερόκοκκοι απομονώνονται και ταυτοποιούνται μέσω επιλεκτικών μέσων καλλιέργειας, όπως αυτά που βασίζονται στη μείωση του 2,3,5-χλωριούχου τριφαινυλοτετραζολίου (TTC), ένα άλας το οποίο οι εντερόκοκκοι ανάγουν σε κόκκινο φορμαζάνιο. Οι χρωστικές ουσίες φορμαζάνης είναι τεχνητά χρωμογόνα προϊόντα που λαμβάνονται από την αναγωγή του άλατος τετραζολίου από βακτηριακές αφυδρογονάσεις και αναγωγάσεις. Χρησιμοποιείται ως δείκτης οξειδοαναγωγής σε μέσα καλλιέργειας για τη διαφοροποίηση βακτηρίων (Cengi-Goga et al., 2022).

Στη μελέτη τους οι Slanetz και Bartley (1957) χρησιμοποίησαν το άγαρ TTC m-Enterococcus για την απαρίθμηση των εντερόκοκκων, όπου οι αποικίες εμφανίζονται με ροζ έως σκούρο καστανό χρώμα. Μετά την απομόνωση και την ταυτοποίηση που συνήθως απαιτούν 48 ώρες, τα στελέχη ελέγχονται για αντιμικροβιακή ευαισθησία μέσω της μεθόδου διάχυσης δίσκου ή τον προσδιορισμό της MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση), η οποία απαιτεί 24 έως 48 ώρες. Οι καλλιεργητικές μέθοδοι είναι χρονοβόρες τεχνικές, καθώς απαιτούνται 2-3 ημέρες για τα αρχικά αποτελέσματα και μέχρι 7- 10 ημέρες για επιβεβαίωση. Υπάρχει, όμως, η ανάγκη για χαμηλού κόστους και ταχείς διαγνωστικούς ελέγχους (Cengi-Goga et al., 2022).



Εικόνα 5: Μέθοδοι ανίχνευσης εντερόκοκκων.

Οι μέθοδοι που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα λειτουργούν με την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA ή RNA στο παθογόνο-στόχο. Αυτό γίνεται με υβριδισμό της αλληλουχίας νουκλεϊνικού οξέος-στόχου με ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο (ανιχνευτές ή εκκινητές) που είναι συμπληρωματικό προς την αλληλουχία-στόχο (Zhao et al., 2014). Οι μέθοδοι που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα ανιχνεύουν τα συγκεκριμένα γονίδια στα παθογόνα-στόχους, αποτρέποντας έτσι διφορούμενα ή λανθασμένα ερμηνευμένα αποτελέσματα.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους μοριακής βάσης για την ανίχνευση τροφιμογενών βακτηριακών παθογόνων είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η PCR εφευρέθηκε πριν από περίπου 30 χρόνια και επιτρέπει την ανίχνευση ενός μόνο βακτηριακού παθογόνου που υπάρχει στα τρόφιμα με την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA-στόχου (Velusamy et al., 2010). Η PCR λειτουργεί με την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA-στόχου σε μια κυκλική διαδικασία τριών βημάτων (Mandal et al., 2011). Πρώτον, το δίκλωνο DNA-στόχος μετουσιώνεται σε μονόκλωνο DNA σε υψηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια, δύο μονόκλωνα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια ή ειδικοί εκκινητές που είναι ο εμπρόσθιος και ο ανάστροφος εκκινητής συνδέονται με τις αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί η διαδικασία πολυμερισμού κατά την οποία οι συμπληρωματικοί προς το μονόκλωνο DNA εκκινητές επεκτείνονται με την παρουσία δεοξυριβονουκλεοτιδίων και μιας θερμοσταθούς DNA πολυμεράσης. Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR απεικονίζονται σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης ως ζώνες με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Zhao et al., 2014).

Πολλαπλή PCR (mPCR)

Η πολλαπλή PCR προσφέρει ταχύτερη ανίχνευση σε σύγκριση με την απλή PCR μέσω της ταυτόχρονης ενίσχυσης πολλαπλών γονιδιακών στόχων. Η βασική αρχή της mPCR είναι παρόμοια με τη συμβατική PCR. Ωστόσο, στη δοκιμασία mPCR χρησιμοποιούνται πολλά σύνολα ειδικών εκκινητών, ενώ στη συμβατική δοκιμασία PCR χρησιμοποιείται μόνο ένα σύνολο ειδικών εκκινητών. Ο σχεδιασμός των εκκινητών είναι πολύ σημαντικός για την

ανάπτυξη της mPCR, καθώς τα σύνολα εκκινητών πρέπει να έχουν παρόμοια θερμοκρασία ανόπτησης προκειμένου να παραχθεί μια επιτυχής δοκιμασία mPCR (Zhao et al., 2014). Εκτός αυτού, η συγκέντρωση των εκκινητών είναι επίσης σημαντική στην mPCR. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να εμφανιστεί αλληλεπίδραση μεταξύ των πολλαπλών σετ εκκινητών στην mPCR, η οποία οδηγεί σε διμερή εκκινητών, επομένως, η συγκέντρωση των εκκινητών μπορεί να χρειαστεί να προσαρμοστεί για να εξασφαλιστεί η παραγωγή αξιόπιστων προϊόντων PCR. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες για μια επιτυχημένη δοκιμασία mPCR περιλαμβάνουν τις συγκεντρώσεις των ρυθμιστικών διαλυμάτων PCR, την ισορροπία μεταξύ των συγκεντρώσεων χλωριούχου μαγνησίου και δεοξυνουκλεοτιδίων, τις ποσότητες του προτύπου DNA, τις θερμοκρασίες κύκλου και την Taq DNA πολυμεράση (Zhao et al., 2014).

Προηγουμένως, η mPCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση περίπου δύο έως τριών παθογόνων μόνο. Τώρα, η mPCR είναι πιο προηγμένη και μπορεί να ανιχνεύσει έως και πέντε ή περισσότερα παθογόνα ταυτόχρονα.

Η PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR διαφέρει από την απλή PCR, καθώς δεν απαιτεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για την ανίχνευση των προϊόντων PCR. Η μέθοδος αυτή είναι σε θέση να παρακολουθεί συνεχώς τον σχηματισμό των προϊόντων PCR σε ολόκληρη την αντίδραση μετρώντας το φθορίζον σήμα που παράγεται από ειδικούς διπλά επισημασμένους ανιχνευτές ή χρωστικές παρεμβολής. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας των αμπλικονίων PCR (Zhao et al., 2014).

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα φθορισμού για qPCR και τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστήματα φθορισμού περιλαμβάνουν το πράσινο SYBR, τους ανιχνευτές TaqMan και τους μοριακούς φάρους. Το πράσινο SYBR είναι μια φθορίζουσα χρωστική που δεσμεύει δίκλωνο DNA (dsDNA). Αυτή η μη αλληλουχοειδής χρωστική παρεμβολής εκπέμπει λίγο φθορισμό και το σήμα φθορισμού ενισχύεται όταν δεσμεύεται στη δευτερεύουσα αύλακα της διπλής έλικας του DNA (Singh et al., 2009).

Οι ανιχνευτές TaqMan και οι μοριακοί φάροι είναι οι συνήθεις εναλλακτικές λύσεις του πράσινου SYBR. Οι ανιχνευτές TaqMan, γνωστοί και ως ανιχνευτές διπλής χρωστικής, είναι ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν ένα

φθοριοφόρο ως χρωστική αναφοράς στο 5'-άκρο και τη χρωστική σβέσης στο 3'-άκρο. Η χρωστική αναφοράς και η χρωστική απόσβεσης βρίσκονται κοντά η μία στην άλλη και αυτό εμποδίζει τον εκπεμπόμενο φθορισμό της χρωστικής αναφοράς. Ο ανιχνευτής TaqMan είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία σε έναν από τους κλώνους του αμφικλίνου εσωτερικά και των δύο εκκινήτων και το σύστημα εξαρτάται από τη δραστικότητα της 5'-3' εξωνουκλεάσης της Taq DNA πολυμεράσης που διασπά τον ανιχνευτή και διαχωρίζει τις δύο χρωστικές προκειμένου να παραχθεί το φθοριοφόρο σήμα (Patel et al., 2006).

Οι μοριακοί φάροι είναι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές με διαμόρφωση φουρκέτας/στέλεχος και βρόχου, όπου η αλληλουχία που είναι συμπληρωματική σε μια αλληλουχία-στόχο υπάρχει στο τμήμα του βρόχου και το στέλεχος παράγεται με την ανόπτηση δύο συμπληρωματικών αλληλουχιών βραχιόνων. Στο ένα άκρο του ανιχνευτή συνδέεται μια χρωστική αναφοράς και στο άλλο άκρο συνδέεται μια χρωστική σβέσης. Και οι δύο χρωστικές βρίσκονται σε κοντινή απόσταση η οποία διατηρείται από το υβριδικό στέλεχος, συνεπώς δεν παράγεται φθορισμός. Ο μοριακός φάρος παράγει σήμα φθορισμού κατά τον υβριδισμό του ανιχνευτή με τη συμπληρωματική του νουκλεοτιδική αλληλουχία στο αμπλικόνιο. Κατά τη διάρκεια του υβριδισμού, ο ανιχνευτής υφίσταται αυθόρμητη αλλαγή διαμόρφωσης που διαχωρίζει τις δύο χρωστικές και αυτό επιτρέπει την εμφάνιση φθορισμού (Patel et al., 2006).

Η ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών με ανοσολογικές μεθόδους βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις αντισώματος-αντιγόνου, σύμφωνα με τις οποίες ένα συγκεκριμένο αντίσωμα συνδέεται με το συγκεκριμένο αντιγόνο. Η ισχύς πρόσδεσης ενός συγκεκριμένου αντισώματος στο αντιγόνο του καθορίζει την ευαισθησία και την ειδικότητα των μεθόδων που βασίζονται στην ανοσολογία. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανοσολογία περιλαμβάνουν τη χρήση πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων (Zhao et al., 2014). Η ανοσοδοκιμασία συνδεδεμένη με ένζυμο (ELISA) και η ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής είναι μεταξύ των μεθόδων που βασίζονται στην ανοσολογία και οι οποίες χρησιμοποιούνται πρόσφατα για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών.

Η δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης συνδεδεμένη με ένζυμο ELISA είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ανοσολογικές μεθόδους για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Η ELISA τύπου σάντουιτς είναι η πιο αποτελεσματική μορφή ELISA, με την οποία περιλαμβάνει δύο αντισώματα (Zhao et al., 2014). Το πρωτογενές αντίσωμα είναι συνήθως ακινητοποιημένο στα τοιχώματα των πηγαδιών της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Το αντιγόνο-στόχος, όπως τα βακτηριακά κύτταρα ή οι βακτηριακές τοξίνες από το δείγμα τροφίμων, δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο πρωτογενές αντίσωμα και τα υπόλοιπα μη δεσμευμένα αντιγόνα απομακρύνονται. Στη συνέχεια, προστίθεται δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο, το οποίο δεσμεύεται στο αντιγόνο και απομακρύνονται τα υπόλοιπα μη συνδεδεμένα αντισώματα. Σχηματίζεται το σύμπλοκο που αποτελείται από το αντιγόνο που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο αντισώματα και μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός άχρωμου υποστρώματος το οποίο θα μετατραπεί σε έγχρωμη μορφή παρουσία του ενζύμου (Zhang, 2013).

Κεφάλαιο 3: Αντοχή των Εντερόκοκκων στα Αντιμικροβιακά

3.1 Αντοχή στις Αμινογλυκοσίδες

Η βέλτιστη αντιμικροβιακή θεραπεία για τις σοβαρές εντεροκοκκικές λοιμώξεις απαιτεί τη χρήση συνεργιστικών συνδυασμών ενός παράγοντα που δρα στο κυτταρικό τοίχωμα, όπως μια πενικιλίνη ή ένα γλυκοπεπτίδιο, με μια αμινογλυκοσίδα, η οποία οδηγεί σε βακτηριοκτόνο δράση έναντι αυτού του οργανισμού. Οι εντερόκοκκοι έχουν αποκτήσει γονίδια ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες που μεσολαβούν στην παραγωγή ενζύμων τροποποίησης των αμινογλυκοσίδων, τα οποία εξαλείφουν αυτό το συνεργιστικό βακτηριοκτόνο αποτέλεσμα. Η ανίχνευση αυτών των ενζύμων οδήγησε στην παραδοσιακή προσέγγιση για την πρόβλεψη του βακτηριοκτόνου συνεργισμού στους εντερόκοκκους. Η ανακάλυψη αρκετών νέων γονιδίων ανθεκτικότητας σε αμινογλυκοσίδες στους εντερόκοκκους απαιτεί επαναξιολόγηση του τρόπου με τον οποίο πρέπει να γίνεται η πρόβλεψη του συνεργισμού στους εντερόκοκκους. Μια διαφορετική προσέγγιση για την πρόβλεψη του συνεργισμού των αμινογλυκοσίδων θα πρέπει να τεθεί σε εφαρμογή σε περίπτωση που αυτά τα νεοανακαλυφθέντα γονίδια γίνουν πιο διαδεδομένα μεταξύ των κλινικών απομονωμένων εντερόκοκκων (Chow, 2000).

Όλοι οι εντερόκοκκοι έχουν εγγενή χαμηλού επιπέδου αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, με ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) που κυμαίνονται από 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ έως και 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η MIC της γενταμικίνης, της πιο συχνά χρησιμοποιούμενης αμινογλυκοσίδης κατά των εντερόκοκκων, κυμαίνεται συνήθως από 6 έως 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ο προαιρετικός αναερόβιος μεταβολισμός των εντερόκοκκων θεωρείται ότι παράγει τη χαμηλού επιπέδου αντοχή τους σε όλες τις αμινογλυκοσίδες περιορίζοντας την πρόσληψη του φαρμάκου, η οποία σχετίζεται με τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων. Η προσθήκη ενός παράγοντα που παρεμβαίνει στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η αμπικιλίνη (ή η βανκομικίνη), αυξάνει σημαντικά την πρόσληψη της αμινογλυκοσίδης, ενισχύοντας σημαντικά τη θανάτωση του εντερόκοκκου (Chow, 2000).

Οι εντερόκοκκοι έχουν αποκτήσει γονίδια ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες που κωδικοποιούν διάφορα ένζυμα τροποποίησης των αμινογλυκοσίδων, τα οποία οδηγούν σε πολύ υψηλή ανθεκτικότητα στις αμινογλυκοσίδες (MICs συνήθως ≥ 2000 $\mu\text{g/mL}$), εξαλείφοντας έτσι το συνεργιστικό αποτέλεσμα θανάτωσης που περιγράφεται παραπάνω. Το πιο σημαντικό κλινικά γονίδιο ανθεκτικότητας που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα σε εντεροκόκκους που κωδικοποιούν ένζυμα που τροποποιούν αμινογλυκοσίδες είναι το διλειτουργικό γονίδιο *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, το οποίο κωδικοποιεί το διλειτουργικό ένζυμο *Aac(6')-Ie-Aph(2'')-Ia*. Οι εντεροκόκκοι που διαθέτουν το ένζυμο *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* είναι ανθεκτικοί σε όλες σχεδόν τις κλινικά διαθέσιμες αμινογλυκοσίδες, συμπεριλαμβανομένων της γενταμικίνης, της τομπραμικίνης, της αμικασίνης, της καναμικίνης και της νετιλμικίνης, αλλά όχι στη στρεπτομικίνη (Chow, 2000).

Όλα τα στελέχη *Enterococcus faecium* παράγουν μια χρωμοσωμικά κωδικοποιημένη ακετυλοτρανσφεράση αμινογλυκοσιδών, την *Aac(6')-Ii*, η οποία εξαλείφει τον συνεργισμό μεταξύ των αντιμικροβιακών ουσιών που δρουν στο κυτταρικό τοίχωμα και των αμινογλυκοσιδών τομπραμικίνη, καναμικίνη, νετιλμικίνη και σισομικίνη. Το γονίδιο *aph(3')-IIIa* κωδικοποιεί τη φωσφοτρανσφεράση των αμινογλυκοσιδών, *Aph(3')-IIIa*, η οποία προσδίδει υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στην καναμικίνη. Το γονίδιο *ant(4')-Ia*, το οποίο κωδικοποιεί την αμινογλυκοσιδική νουκλεοτιδυλοτρανσφεράση, *Ant(4')-Ia*, προσδίδει αντοχή στην τομπραμικίνη, την αμικασίνη και την καναμικίνη. Παρόλο που τόσο η *aph(3')-IIIa* όσο και η *ant(4')-Ia* μεσολαβούν σε MIC αμικασίνης μόνο 64-256 $\mu\text{g/mL}$ σε εντερόκοκκους, απομονωμένα στελέχη που περιέχουν οποιοδήποτε από τα δύο γονίδια είναι ανθεκτικά στη συνεργία αμπικιλλίνης- αμικασίνης (Chow, 2000).

Οι εντερόκοκκοι που διαθέτουν *aac(6')-Ii*, *aph(3')-IIIa* ή *ant(4')-Ia* παραμένουν ευαίσθητοι στον συνεργισμό με τη γενταμικίνη, υπό την προϋπόθεση ότι δεν περιέχουν επίσης *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (δεν είναι ασυνήθιστο για κλινικές απομονώσεις εντερόκοκκων να διαθέτουν ≥ 3 διαφορετικά γονίδια αντοχής σε αμινογλυκοσίδες). Η υψηλού επιπέδου αντίσταση στη στρεπτομικίνη στους εντερόκοκκους μπορεί να είναι ριβοσωμική, που προκύπτει από μετάλλαξη ενός βήματος μιας ριβοσωμικής

πρωτεΐνης, ή ενζυμική, που προκύπτει από την παραγωγή Ant(6')-Ia ή Ant(3'')-Ia (Chow, 2000).

Ο έλεγχος για αντοχή των εντερόκοκκων σε αμινογλυκοσίδες υψηλού επιπέδου απαιτούσε μέχρι σήμερα μόνο τη χρήση γενταμικίνης και στρεπτομικίνης. Τα απομονωμένα άτομα που ήταν ανθεκτικά σε υψηλά επίπεδα γενταμικίνης (MIC ≥ 500 $\mu\text{g/mL}$) θεωρούνταν ότι διέθεταν aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia. Επειδή η παρουσία aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia αποκλείει τη χρήση σχεδόν όλων των κλινικά διαθέσιμων αμινογλυκοσιδών, εκτός από τη στρεπτομικίνη, δεν υπήρξε ανάγκη να ελεγχθεί η παρουσία aph(3')-IIIa, aac(6')-II ή ant(4')-Ia. Ελλείψει aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, η γενταμικίνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμένη θεραπεία, ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία aph(3')-IIIa, aac(6')-II ή ant(4')-Ia. Παρουσία aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, η στρεπτομικίνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε θεραπεία συνδυασμού με έναν παράγοντα που δρα στο κυτταρικό τοίχωμα, υπό την προϋπόθεση ότι το απομονωμένο εντερόκοκκο δεν είναι ανθεκτικό σε υψηλά επίπεδα στρεπτομικίνης (MIC ≥ 1000 $\mu\text{g/ml}$).

Με την αναφορά των νέων γονιδίων ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες aph(2'')-Ic, aph(2'')-Id, και aph(2'')-Ib, το aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia δεν είναι πλέον το μόνο γονίδιο ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες στους εντερόκοκκους που είναι γνωστό ότι κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα στη γενταμικίνη και ίσως απαιτείται μια νέα προσέγγιση για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας στη συνεργία των αμινογλυκοσιδών. Το γονίδιο aph(2'')-Ic απομονώθηκε αρχικά από ένα απομονωμένο ζωικό *Enterococcus gallinarum*, αλλά στη συνέχεια βρέθηκε επίσης σε κλινικές απομονώσεις *E. faecium* και *Enterococcus faecalis*. Αν και η MIC γενταμικίνης είναι 256-384 $\mu\text{g/mL}$ για τους εντερόκοκκους που διαθέτουν aph(2'')-Ic, οι απομονώσεις αυτές είναι ωστόσο ανθεκτικές στη συνεργία αμπικιλίνης-γενταμικίνης (Chow, 2000).

Επομένως, εάν η γενταμικίνη στα 500 $\mu\text{g/ml}$ συνεχίσει να χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της αντοχής στη γενταμικίνη (και, συνεπώς, της αντοχής στη συνεργία με έναν παράγοντα που δρα στο κυτταρικό τοίχωμα), απομονώσεις που διαθέτουν aph(2'')-Ic μπορεί να μην ληφθούν υπόψη και να θεωρηθούν εσφαλμένα ευαίσθητες στη συνεργία αμπικιλίνης-γενταμικίνης. Από την άλλη πλευρά, επειδή υπάρχει μόνο 2-πλάσια διαφορά αραίωσης μεταξύ 256 και 500 $\mu\text{g/mL}$, τα στελέχη που φέρουν aph(2'')-Ic

μπορεί κατά καιρούς να παρουσιάσουν ελάχιστη ανάπτυξη σε μια δοκιμασία διαλογής που χρησιμοποιεί 500 µg/mL γενταμικίνης. Αυτά τα στελέχη θα θεωρούνταν λανθασμένα ότι διαθέτουν *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* και έτσι θα θεωρούνταν λανθασμένα ανθεκτικά σε πολλαπλές αμινογλυκοσίδες, ενώ στην πραγματικότητα είναι δυνητικά ευαίσθητα στο συνδυασμό αμπικιλλίνης και αμικασίνης, νετιλμικίνης ή διμπεκακίνη.

Ένα άλλο νέο γονίδιο ανθεκτικότητας στην γενταμικίνη που βρέθηκε πρόσφατα σε εντερόκοκκους είναι το *aph(2'')-IId*. Το γονίδιο αυτό απομονώθηκε αρχικά από ένα απομονωμένο από το αίμα *Enterococcus casseliflavus*. Όλη η μεταγενέστερη ανίχνευση του *aph(2'')-IId* μεταξύ κλινικών απομονώσεων έγινε σε *E. faecium* ανθεκτικό στη βανκομικίνη. Το γονίδιο *aph(2'')-IId* κωδικοποιεί μια φωσφοτρανσφεράση αμινογλυκοσιδών, *Aph(2'')-IId*, η οποία τροποποιεί την γενταμικίνη, την τομπραμικίνη, την καναμικίνη, τη νετιλμικίνη και τη διμπεκακίνη. Οι MICs αυτών των 5 αμινογλυκοσιδών σε εντερόκοκκους που διαθέτουν *aph(2'')-IId* ήταν όλες ≥ 2000 µg/ml. Οι εντερόκοκκοι που διαθέτουν μόνο *aph(2'')-IId* θα πρέπει να είναι ευαίσθητοι στον συνεργισμό αμπικιλλίνης- αμικασίνης. Σύμφωνα με το τρέχον πρωτόκολλο διαλογής, οι απομονώσεις αυτές θα θεωρούνταν λανθασμένα ότι περιέχουν *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* και έτσι θα μπορούσαν να θεωρηθούν λανθασμένα ανθεκτικές στον συνεργισμό της αμικασίνης (Chow, 2000).

Το πιο πρόσφατο γονίδιο που κωδικοποιεί υψηλού επιπέδου αντοχή στην γενταμικίνη και ανιχνεύθηκε σε εντερόκοκκους είναι το *aph(2'')-Ib*. Αυτό το γονίδιο μεσολαβεί επίσης για την υψηλού επιπέδου αντοχή των εντερόκοκκων στην τομπραμικίνη, την καναμικίνη, τη νετιλμικίνη και τη διμπεκακίνη. Οι εντερόκοκκοι που περιέχουν *aph(2'')-Ib* θα πρέπει θεωρητικά να είναι ευαίσθητοι στη συνεργία αμπικιλλίνης- αμικασίνης. Ωστόσο, και τα 6 απομονωθέντα μέχρι σήμερα *E. faecium* που περιέχουν *aph(2'')-Ib* ήταν ανθεκτικά και στην αμικασίνη (MIC ≥ 512 µg/mL). Η αντοχή αυτή οφείλεται πιθανώς στην παρουσία ενός ξεχωριστού γονιδίου αντοχής σε αμινογλυκοσίδες που κωδικοποιεί την αντοχή στην αμικασίνη.

Μόνο σχετικά μικρές έρευνες έχουν γίνει για να προσδιοριστεί ο επιπολασμός των νέων γονιδίων αντοχής στις αμινογλυκοσίδες *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ή *aph(2'')-IId*. Ο έλεγχος με τη χρήση εκκινητών PCR ειδικών για τα μεμονωμένα γονίδια μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματικός με την πιο

επίπονη τεχνική της χρήσης ανιχνευτών αυτών των γονιδίων για υβριδοποίηση σε κηλίδες Southern από ολικό κυτταρικό DNA. Από 121 εντερόκοκκους με υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στην γενταμικίνη, 96 απομονώσεις (79%) βρέθηκαν να περιέχουν *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, 6 απομονώσεις (5%) περιείχαν *aph(2'')-Ib*, 2 απομονώσεις (1,6%) περιείχαν *aph(2'')-Ic* και 17 απομονώσεις (14%) περιείχαν *aph(2'')-Id*. Κανένα από αυτά τα απομονωμένα άτομα δεν διέθετε περισσότερα από 1 από αυτά τα 4 γονίδια ανθεκτικότητας στη γενταμικίνη.

Μια πολυκεντρική μελέτη εντεροκοκκικής βακτηριαίμιας διαπίστωσε ότι, από 179 απομονώσεις εντερόκοκκων στο αίμα για τις οποίες η MIC γενταμικίνης ήταν ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$, 168 απομονώσεις (93,8%) περιείχαν *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, 6 απομονώσεις (3,4%) περιείχαν *aph(2'')-Ib*, 2 απομονώσεις (1,1%) περιείχαν *aph(2'')-Ic* και 3 απομονώσεις (1,7%) περιείχαν *aph(2'')-Id*. Σε 3 από τα 7 συμμετέχοντα νοσοκομεία, το *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ήταν το μόνο γονίδιο αντοχής στην γενταμικίνη που ανιχνεύθηκε στους εντερόκοκκους. Έτσι, ο επιπολασμός των ανθεκτικών στη γενταμικίνη εντερόκοκκων που δεν περιέχουν το γονίδιο *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, αλλά αντ' αυτού περιέχουν 1 από τα άλλα 3 γονίδια αντοχής, ήταν 21% σε 1 μικρή έρευνα, αλλά μόνο 6% στη μεγαλύτερη έρευνα. Η διαφορά αυτή μπορεί να είναι συνάρτηση της γεωγραφικής θέσης των νοσοκομείων που συμμετείχαν, και ενδεχομένως τα αποτελέσματα της πρώτης έρευνας να ήταν στρεβλά, επειδή περιελάμβανε ένα νοσοκομείο που, εκ των υστέρων, φαίνεται ότι είχε ένα ξέσπασμα του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη *E. faecium* που περιείχε το γονίδιο *aph(2'')-Id* (Chow, 2000).

3.2 Αντοχή στις β-λακτάμες

Τα αντιβιοτικά της οικογένειας των β-λακταμών αναστέλλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη χρησιμεύοντας ως υποστρώματα αυτοκτονίας για τις d,d-τρανσπεπτιδάσες (επίσης γνωστές ως πρωτεΐνες δέσμευσης πενικιλίνης ή PBPs) που καταλύουν τη διασταύρωση των πλευρικών αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης κατά τη σύνθεση της ώριμης πεπτιδογλυκάνης. Μόλις τροποποιηθούν από ένα αντιβιοτικό β-λακτάμης, οι PBPs αδρανοποιούνται,

εμποδίζοντας έτσι τη συνέχιση της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (Gagetti et al., 2019).

Οι εντερόκοκκοι εκφράζουν μια PBP5 χαμηλής συγγένειας (PBP5 στο *E. faecium* και στο *E. faecalis* μερικές φορές PBP4) που δεσμεύονται ασθενώς στα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Ακόμη και στελέχη που απομονώθηκαν από πρωτόγονους πληθυσμούς στα νησιά του Σολομώντα, οι οποίοι είχαν ελάχιστη ή καθόλου έκθεση σε βιομηχανοποιημένα αντιβιοτικά, καθώς και στελέχη που απομονώθηκαν στις αρχές της εποχής των αντιβιοτικών εμφανίζουν αυτή την ιδιότητα (Gagetti et al., 2019).

Γενικά, οι εντερόκοκκοι είναι περίπου 100 φορές λιγότερο ευαίσθητοι στις β-λακτάμες από τους στρεπτόκοκκους. Η ιδιότητα αυτή κωδικοποιείται από χρωμοσωμικούς καθοριστικούς παράγοντες στο βασικό γονιδίωμα αυτών των οργανισμών και αφορά την παραγωγή της χαμηλής συγγένειας πενικιλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης 5 (PBP5) τάξης B. Λόγω της σχετικά χαμηλής συγγένειάς της για τις β-λακτάμες, η PBP5 είναι ικανή να πραγματοποιεί σύνθεση πεπτιδογλυκάνης σε συγκεντρώσεις β-λακταμικών αντιβιοτικών που κορεστούν όλη την περιοχή της τρανσπεπτιδάσης άλλων εντεροκοκκικών PBPs (Gagetti et al., 2019).

Το επίπεδο εγγενούς αντοχής διαφέρει μεταξύ των αντιμικροβιακών β-λακτάμης. Γενικά, οι πενικιλίνες (π.χ. αμπικιλίνη) έχουν την υψηλότερη δραστηριότητα, οι καρβαπενέμες ελαφρώς χαμηλότερη και οι κεφαλοσπορίνες τη χαμηλότερη δραστηριότητα.

Αντοχή υψηλού επιπέδου στην αμπικιλίνη εμφανίστηκε σε νοσοκομεία των Ηνωμένων Πολιτειών κατά τις δεκαετίες του 1970 και 1980. Η αντίσταση στην αμπικιλίνη, είναι σπάνια στον *E. faecalis*, αλλά εμφανίζεται στο ~90% των σύγχρονων απομονωμένων στελεχών του *E. faecium* που σχετίζονται με νοσοκομεία. Στην Αργεντινή, σύμφωνα με τα δεδομένα της Λατινοαμερικανικής επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής (ReLAVRA) από το 2015, το ποσοστό αντοχής στην αμπικιλίνη είναι 1,8% στην *E. faecalis* και 85% στην *E. Faecium* (Gagetti et al., 2019).

Η υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη στην *E. faecium* (MIC \geq 128 mg/l) εξηγήθηκε αρχικά είτε από την ενισχυμένη παραγωγή της PBP5, ή/και από πολυμορφισμούς στη β υπομονάδα της εν λόγω πρωτεΐνης. Περαιτέρω ανάλυση στελεχών *E. faecium* με διαφορετικά επίπεδα

ευαισθησίας στην αμπικιλίνη αποκάλυψε ότι η μεταβλητότητα των αλληλουχιών της PBP5 οφείλεται κυρίως σε αλλαγές σε 21 συγκεκριμένες θέσεις της πρωτεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι μια διαδοχική απόκτηση μεταλλάξεων θα μπορούσε να έχει συμβάλει στην προοδευτική αντοχή στην αμπικιλίνη από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Pietta et al., 2014).

Ένας άλλος μηχανισμός αντοχής σε β-λακτάμες που δεν περιλαμβάνει PBPs ανιχνεύθηκε σε ένα ανθεκτικό στην αμπικιλίνη εργαστηριακό μεταλλαγμένο στέλεχος του *E. faecium* (MIC > 2000 mg/l). Εντοπίστηκε παράκαμψη της αντίδρασης της d,d-τρανσπεπτιδίωσης που λαμβάνει χώρα κατά τα τελευταία στάδια της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης με την αφαίρεση του γονιδίου PBP5. Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν άλλες ειδικές για το είδος πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, μπορεί επίσης να αυξήσουν ελαφρώς τις τιμές MIC ακόμη και απουσία της PBP5 (Pietta et al., 2014).

Οι πρώτες απομονώσεις *E. faecalis* που παράγουν β-λακταμάση ταυτοποιήθηκαν στο Τέξας το 1981. Αν και σπάνια, οι απομονώσεις αυτές έχουν εξαπλωθεί από επτά πολιτείες των ΗΠΑ, ενώ περιγράφηκαν επίσης στο Λίβανο, τον Καναδά και την Αργεντινή, όπου απομονώθηκαν 6 στελέχη στο νοσοκομείο Garrahan. Αυτός ο μηχανισμός αντοχής είναι πιο συχνός στο *E. faecalis* απ' ό,τι στο *E. faecium*. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί στελέχη *E. faecium* που παράγουν β-λακταμάση, μόνο ένα απομονωμένο στέλεχος στο Richmond το 1992 και 8 επιδημιολογικά άσχετα απομονωμένα στελέχη στη Modena το 2010 (Gagetti et al., 2019).

Τα πλασμιδιακά γονίδια bla (που κωδικοποιούν β-λακταμάσες) περιγράφηκαν για πρώτη φορά στο *E. faecalis* το 1983. Ορισμένα στελέχη του *Enterococcus* παράγουν β-λακταμάση πανομοιότυπη με το σταφυλοκοκκικό ένζυμο. Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη, στις αμινοπενικιλίνες (αμπικιλίνη) και στις ουρεΐδοπενικιλίνες (πιπερακιλλίνη), αλλά είναι ευαίσθητα στην ιμιπενέμη και στους συνδυασμούς β-λακταμών με αναστολείς της β-λακταμάσης (όπως η αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη), οπότε δεν αποτελούν θεραπευτική πρόκληση.

Οι εντερόκοκκοι παράγουν τόσο λίγη β-λακταμάση που δεν μπορεί να ανιχνευθεί με τις συνήθεις εργαστηριακές δοκιμές ευαισθησίας, όπως οι μέθοδοι διάχυσης ή αραίωσης. Αυτά τα απομονωμένα στελέχη μπορούν να

ανιχνευθούν με τη χρήση νιτροκεφίνης, αλλά είναι τόσο σπάνια που η χρήση της δεν συνιστάται της ρουτίνας. Μπορούν επίσης να ανιχνευθούν με τη διαφορά στο μέγεθος μεταξύ της ζώνης αναστολής της αμπικιλλίνης και της αμπικιλλίνης-σουλμπακτάμης, θεωρώντας θετικό αποτέλεσμα όταν η διαφορά είναι μεγαλύτερη από 4 mm (Gagetti et al., 2019).

3.3 Αντοχή στην βανκομυκίνη και μηχανισμοί αντοχής

Η αντοχή στα φάρμακα που δρουν στο κυτταρικό τοίχωμα (π.χ. πενικιλλίνη και βανκομυκίνη) είναι κοινή μεταξύ των κλινικών απομονώσεων εντερόκοκκων και θεωρήθηκε ότι είναι εγγενής, έως ότου ελήφθησαν μη ανεκτικά απομονωμένα στελέχη του *E. faecalis* από πληθυσμό που δεν λαμβάνει αντιμικροβιακά φάρμακα. Στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι τα στελέχη αυτά μπορούσαν να γίνουν ανεκτικά με την έκθεση σε παλμικές δόσεις πενικιλλίνης (Eliopoulos & Gold, 2001).

Μέσω της μετάλλαξης και της μεταφοράς γονιδίων αντοχής από άλλα είδη (και σε ορισμένες περιπτώσεις μεταξύ εντεροκοκκικών ειδών), οι εντερόκοκκοι έχουν αποκτήσει πρόσθετους καθοριστικούς παράγοντες αντοχής. Ο *E. faecium* εμφανίζει συχνά (>60%) επίκτητη αντοχή σε συγκεντρώσεις πενικιλλίνης που είναι σημαντικά υψηλότερες από αυτές στις οποίες ο μικροοργανισμός είναι εγγενώς ικανός να αντισταθεί, με τη μεσολάβηση αυξημένης έκφρασης της πρωτεΐνης 5 (PBP5) που δεσμεύει πενικιλλίνη χαμηλής συγγένειας ή μεταλλάξεων στην PBP5 που παράγουν προοδευτικά χαμηλότερη συγγένεια για την πενικιλλίνη στα πιο ανθεκτικά στελέχη.

Η παραγωγή μιας β-λακταμάσης ουσιαστικά πανομοιότυπης με αυτή που βρίσκεται στον *Staphylococcus aureus* προκαλεί αντοχή στην πενικιλλίνη σε σπάνιες απομονώσεις του *E. faecalis*. Υψηλού επιπέδου αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, η οποία συνήθως μεσολαβείται από ένζυμα τροποποίησης αμινογλυκοσίδων, έχει βρεθεί σε ~25%-50% των απομονωμένων εντεροκοκκικών στελεχών σε διάφορες μελέτες [10]. Η αντοχή στις φθοριοκινολόνες, πέραν της μέτριας εγγενούς αντοχής που συναντάται σε πολλούς εντερόκοκκους, διαμεσολαβείται από μεταβολές σε ένζυμα που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA.

Άλλοι συνήθεις επίκτητοι γενετικοί προσδιορισμοί προσδίδουν αντοχή στα μακρολίδια, την τετρακυκλίνη και τη χλωραμφενικόλη. Μπορεί να εμφανιστούν χρωμοσωμικές μεταλλάξεις που παράγουν αντοχή στη ριφαμπίνη και το φουσιδικό οξύ, μεταξύ άλλων. Εξαιτίας όλων των προβλημάτων με την αντοχή στα φάρμακα που περιγράφονται παραπάνω, η βανκομυκίνη ήταν ένα αξιόπιστο και κρίσιμα σημαντικό αντιμικροβιακό για τη θεραπεία των εντεροκοκκικών λοιμώξεων (Eliopoulos & Gold, 2001).

Η πρώτη αναφορά για εντερόκοκκους ανθεκτικούς σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοπεπτιδικών αντιβιοτικών (βανκομυκίνη και τείκοπλανίνη) δημοσιεύθηκε το 1988, όταν αναφέρθηκε η εμφάνιση μιας επιδημίας ανθεκτικού στη βανκομυκίνη *E. faecium* που μόλυνε ασθενείς σε νοσοκομειακή μονάδα νεφρού. Εκείνη την εποχή, η χρήση της βανκομυκίνης και της τείκοπλανίνης είχε αυξηθεί ραγδαία, εν μέρει λόγω της αυξανόμενης χρήσης ενδοαγγειακών συσκευών σε συνδυασμό με τον υψηλό επιπολασμό της αντοχής στη μεθικιλίνη μεταξύ των σταφυλόκοκκων. Επίσης, η από του στόματος χορηγούμενη βανκομυκίνη ήταν μια ευρέως χρησιμοποιούμενη θεραπεία για την κολίτιδα από *Clostridium difficile*. Η κατανάλωση τεράστιων ποσοτήτων γλυκοπεπτιδίων γινόταν επίσης σε έναν εντελώς διαφορετικό πληθυσμό, συγκεκριμένα, η αβοπαρκίνη (ένα άλλο φάρμακο γλυκοπεπτιδίου) χρησιμοποιούνταν ως προαγωγός της ανάπτυξης σε ζώα διατροφής. Αυτή η χρήση ενός γλυκοπεπτιδίου σε υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις στα ζώα μπορεί να έπαιξε ρόλο στην ανάπτυξη επίκτητης αντοχής στην βανκομυκίνη στους εντερόκοκκους (Eliopoulos & Gold, 2001).

Διάφοροι τύποι ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων (VRE) έχουν χαρακτηριστεί σε φαινοτυπική και γονοτυπική βάση. Οι εντερόκοκκοι VanA είναι ανθεκτικοί σε υψηλά επίπεδα βανκομυκίνης (MIC, ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) και τείκοπλανίνης (MIC, ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$). Η ανθεκτικότητα προκαλείται από την παρουσία οποιουδήποτε από τα δύο φάρμακα. Οι οργανισμοί VanB είναι ανθεκτικοί σε ένα εύρος συγκεντρώσεων βανκομυκίνης, από 4 έως >1024 $\mu\text{g/mL}$. Συνήθως διατηρούν την ευαισθησία τους στην τείκοπλανίνη, η οποία δεν έχει παρατηρηθεί να επάγει αντοχή. Οι συστάδες vanA και vanB έχουν βρεθεί κυρίως σε *E. faecalis* και *E. faecium*. οι vanA και vanB έχουν βρεθεί λιγότερο συχνά σε άλλα εντερόκοκκα είδη. Η απόδειξη της μεταφοράς αυτών των γονιδίων αντοχής πέραν του γένους *Enterococcus* περιλαμβάνει την

εύρεση διαφόρων θετικών κατά Gram ειδών που φέρουν *vanA* και ενός απομονωμένου από κόπρανα *Streptococcus bovis* που φέρει *vanB*.

Η ικανότητα των γονιδίων αυτών να εκφράζονται σε διάφορους ξενιστές καταδείχθηκε με την πειραματική εργαστηριακή μεταφορά του *vanA* στον *S. aureus* και σε άλλους θετικούς κατά Gram οργανισμούς. Ευτυχώς, δεν έχουμε ακόμη γνώση για οποιαδήποτε μεταφορά αυτών των γονιδίων στον *S. aureus* στη φύση. Λιγότερο συνηθισμένοι φαινότυποι επίκτητης αντοχής στα γλυκοπεπτίδια περιλαμβάνουν το *VanD*, το οποίο έχει περιγραφεί σε διάφορες απομονώσεις του *E. faecium* που ήταν ανθεκτικές σε μέτρια επίπεδα βανκομυκίνης (MIC, 64-128 µg/mL) και τεϊκοπλανίνης (MIC, 4 µg/mL), καθώς και σε ένα απομονωμένο *VanE E. faecalis* που ήταν ανθεκτικό σε χαμηλή συγκέντρωση βανκομυκίνης (MIC, 16 µg/mL) αλλά ευαίσθητο στην τεϊκοπλανίνη (Elioroulos & Gold, 2001).

Οι εξαρτώμενοι από τη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι είναι ένας άλλος ασυνήθιστος φαινότυπος του VRE. Πρόκειται για απογόνους των τυπικών *VanA* και *VanB* VRE που αναπτύσσουν μεταλλάξεις που τους εμποδίζουν να αναπτύσσονται απουσία γλυκοπεπτιδίων. Οι *E. gallinarum* και *E. casseliflavus*, οι *VanC* εντερόκοκκοι, είναι εγγενώς ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη σε συγκεντρώσεις συνήθως μικρότερες ή ίσες με 32 µg/mL, αν και τα είδη αυτά μπορεί να αποκτήσουν πρόσθετους προσδιοριστές *Van*, με αποτέλεσμα υψηλότερες MIC.

Ο μηχανισμός της επίκτητης αντοχής στα γλυκοπεπτίδια στους εντερόκοκκους *VanA* και *VanB* βρέθηκε ότι είναι ένα σύμπλεγμα γονιδίων που κωδικοποιούν μια εναλλακτική βιοσυνθετική οδό για την παραγωγή πρόδρομων ουσιών του κυτταρικού τοιχώματος που δεσμεύουν ελάχιστα τη βανκομυκίνη.

Σε αντίθεση με τις κανονικές πρόδρομες ουσίες πεπτιδογλυκάνης (PG), οι οποίες έχουν τερματικό διπεπτίδιο d-αλανυλ-d-αλανίνης (d-Ala-d-Ala), εκείνες των εντερόκοκκων με επίκτητη αντοχή στη βανκομυκίνη (εκτός από τους τύπους *VanE*) καταλήγουν στο αποσιπεπτίδιο d-αλανυλ-d-λακτάτη (d-Ala-d-Lac). Η βανκομυκίνη δεσμεύεται σε αυτά τα τροποποιημένα μόρια με συγγένεια 0,001 φορές μεγαλύτερη από τη συγγένεια με την οποία δεσμεύεται στην εγγενή πρόδρομη PG. Αυτή η μεταβολή της θέσης-στόχου για τα γλυκοπεπτιδικά αντιβιοτικά επιτυγχάνεται από διάφορες πρωτεΐνες που

αντιλαμβάνονται την παρουσία του φαρμάκου (ή μια επίδραση του φαρμάκου), παράγουν έναν ανθεκτικό στο φάρμακο στόχο και εξαλείφουν τον ευαίσθητο στο φάρμακο στόχο με συντονισμένο τρόπο. Στους εντερόκοκκους VanA, για παράδειγμα, η πρωτεΐνη VanR (ο ρυθμιστής απόκρισης), και η πρωτεΐνη VanS (ένας αισθητήρας κινάσης ιστιδίνης) σχηματίζουν ένα ρυθμιστικό σύστημα 2 συστατικών (Elioroulos & Gold, 2001).

Η παρουσία βανκομυκίνης, τεϊκοπλανίνης (και αρκετών άλλων ενώσεων), ή ίσως πιο πιθανό κάποια διαταραχή των πρόδρομων ουσιών του κυτταρικού τοιχώματος που προκαλείται από αυτά τα φάρμακα, προκαλεί την αυτοφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης VanS, και στη συνέχεια με τη σειρά της φωσφορυλίωση της VanR. Εκτός από την αύξηση της έκφρασης των vanR και vanS, η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη VanR συνδέεται με την περιοχή υποκινητή για το vanHAX, οδηγώντας τη μεταγραφή αυτών των γονιδίων που κωδικοποιούν τα βασικά δομικά μόρια του γονιδιακού συμπλέγματος - δηλαδή, το σύστημα επάγεται από την παρουσία βανκομυκίνης ή τεϊκοπλανίνης (Elioroulos & Gold, 2001).

Η πρωτεΐνη VanH μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε d-λακτικό, το οποίο συνδυάζεται με d-αλανίνη από τη λιγάση VanA για τη δημιουργία d-Ala-d-Lac. Η διπεπτιδάση VanX υδρολύει τη d-Ala-d-Ala (το προϊόν της εγγενούς d-Ala:d-Ala λιγάσης), μειώνοντας έτσι τη δεξαμενή της d-Ala-d-Ala που είναι διαθέσιμη για τη δημιουργία της ευαίσθητης στη βανκομυκίνη πρόδρομης ουσίας PG. Η VanY είναι μια βοηθητική δομική πρωτεΐνη που αφαιρεί το τελικό κατάλοιπο d-Ala από την πρόδρομη ουσία PG. Αυτή η καρβοξυπεπτιδάση αυξάνει την ανθεκτικότητα στα γλυκοπεπτιδία αφαιρώντας τις εναπομένουσες θέσεις δέσμευσης της βανκομυκίνης. Η λειτουργία της πρωτεΐνης VanZ δεν είναι κατανοητή, αλλά συμβάλλει στην αντίσταση στην τεϊκοπλανίνη. Όπως και οι εγγενείς πρόδρομες PG, αυτές οι τροποποιημένες πρόδρομες πολυμερίζονται σε λειτουργικό κυτταρικό τοίχωμα.

Το σύμπλεγμα vanB είναι λειτουργικά παρόμοιο με το σύμπλεγμα vanA, αλλά διαφέρει ως προς τη ρύθμισή του. Στους εντερόκοκκους vanB, η βανκομυκίνη, αλλά όχι η τεϊκοπλανίνη, προκαλεί αντοχή σε διαφορετικές συγκεντρώσεις βανκομυκίνης. Μεταλλακτικές μελέτες δείχνουν ότι αυτή η εξειδίκευση της επαγωγής είναι χαρακτηριστικό της VanSB. Εκτός από τα ομόλογα του vanRS, το σύμπλεγμα vanB περιέχει γονίδια που είναι ομόλογα

με το vanHAX. Ένα ομόλογο της VanY (καρβοξυπεπτιδάση) υπάρχει σε ορισμένα στελέχη, αλλά η λειτουργία μιας πρόσθετης πρωτεΐνης, της VanW, είναι άγνωστη. Οι εντερόκοκκοι VanD διαθέτουν μηχανισμό αντίστασης στα γλυκοπεπτιδία παρόμοιο με τους μικροοργανισμούς VanA και VanB -δηλαδή, το σχηματισμό πρόδρομων PG με κατάληξη d-Ala²-d-Lac που μεσολαβείται από μια συστάδα γονιδίων με ομολογία με τα vanRS, vanY και vanHAX (Elioroulos & Gold, 2001).

Έχουν περιγραφεί λοίμωξη και αποικισμός που προκαλούνται από εντερόκοκκους εξαρτώμενους από τη βανκομυκίνη. Ο μηχανισμός αυτού του φαινομένου είναι η απώλεια μιας λειτουργικής οδού για την παραγωγή των πρόδρομων εγγενών PG και η συνακόλουθη απαίτηση για την παρουσία γλυκοπεπτιδίων για την επαγωγή της εναλλακτικής οδού (Elioroulos & Gold, 2001).

Η προέλευση αυτών των γονιδίων ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη δεν είναι γνωστή, αλλά τα γονίδια vanHAX έχουν διάταξη πανομοιότυπη και σημαντική προβλεπόμενη ομοιότητα αμινοξέων-ακολουθίας με εκείνα των γονιδίων που βρίσκονται στους *Streptomyces toyocaensis* και *Amycolatopsis orientalis*, ακτινομύκητες που παράγουν γλυκοπεπτιδικά αντιβιοτικά.

Σημαντικές διαφορές μεταξύ της περιεκτικότητας σε G + C (γουανίνη + κυτοσίνη) αυτών των 2 ομάδων ομόλογων γονιδίων υποδηλώνουν ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί πρόσφατη μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη από αυτούς τους παραγωγούς αντιβιοτικών στους εντερόκοκκους.

Μια άλλη, πιο στενά συνδεδεμένη ομάδα ομόλογων γονιδίων vanHAX (με βάση την αφαιρεθείσα ομολογία αμινοξέων-ακολουθίας και την περιεκτικότητα σε G + C) βρέθηκε στο ανθεκτικό στη βανκομυκίνη βιοπαρασιτοκτόνο *Paenibacillus popilliae*.

Η εξελικτική καταγωγή αυτών των ομάδων ομόλογων γονιδίων δεν είναι σαφής, αλλά ενδέχεται να έχουν έναν κοινό, απομακρυσμένο πρόγονο. Αρκετοί εγγενώς ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη, θετικοί κατά gram οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Pediosoccus*, *Leucostoc* και ορισμένων γαλακτοβακίλλων, παράγουν επίσης πρόδρομες ουσίες PG που καταλήγουν σε d-Lac. Ωστόσο, οι λιγασες d-Ala:d-Lac που απαντώνται σε αυτούς τους οργανισμούς είναι μόνο απομακρυσμένα συγγενείς με τις λιγασες VanA, VanB

και VanD. Λόγω των διαφορών στην περιεκτικότητα σε G + C, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι τα ρυθμιστικά γονίδια (*vanR* και *vanS*) και τα βοηθητικά γονίδια (*vanY* και *vanZ*) μπορεί να προέρχονται από διαφορετική πηγή από ό,τι τα απαραίτητα δομικά γονίδια (*vanHAX*). Τα ρυθμιστικά γονίδια των συστάδων *vanA* και *vanB* παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερη ομολογία μεταξύ τους από ό,τι το *vanHAX* με το *vanHBBXB* (Eliopoulos & Gold, 2001).

Οι συστάδες γονιδίων ανθεκτικότητας στα γλυκοπεπτίδια *vanA* και *vanB* μεταφέρονται σε τρανσποζόνια. Το πιο γνωστό τρανσποζόνιο *vanA*, το Tn1546, είναι ένα μη συζευκτικό τρανσποζόνιο 10,8 χιλιοβάσεων που έχει εντοπιστεί σε πλασμίδια και χρωμοσωμικό DNA. Το σύμπλεγμα *vanB* μπορεί επίσης να υπάρχει στο χρωμόσωμα ή στο πλασμιδιακό DNA και μέχρι στιγμής έχει βρεθεί σε 2 διαφορετικά τρανσποζόνια, το Tn1547 και το Tn5382. Το Tn5382 έχει αναφερθεί ότι αποτελεί μέρος ενός μεγαλύτερου στοιχείου που φέρει το PBP5 (που μεσολαβεί για την υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη), μαζί με το σύμπλεγμα *vanB*. Αποδείχθηκε ότι ορισμένα γεωγραφικά διαφορετικά απομονωμένα στελέχη τύπου VanB συνμεταφέρουν αντίσταση στη βανκομυκίνη και αντίσταση σε υψηλές συγκεντρώσεις αμπικιλίνης.

Οι εντερόκοκκοι VanC διαθέτουν 2 διαφορετικές οδούς για τη σύνθεση των πρόδρομων ουσιών PG. Το ένα μονοπάτι παράγει πρόδρομες ουσίες με d-Ala-d-Ala απολήξεις. Τα γονιδιακά συμπλέγματα *vanC* μεσολαβούν στο άλλο μονοπάτι, παράγοντας πρόδρομες ουσίες PG με d-alanyl-D-serine απολήξεις που δεσμεύουν ελάχιστα τη βανκομυκίνη και αποτελούν την πηγή της εγγενούς αντοχής στη βανκομυκίνη των *E. gallinarum* και *E. casseliflavus*. Έχει περιγραφεί ένα μόνο απομονωμένο *E. faecalis* που χρησιμοποιεί τον ίδιο μηχανισμό αντοχής, δηλαδή την παραγωγή πρόδρομων PG που τερματίζουν με d-alanyl-d-serine, με αποτέλεσμα έναν φαινότυπο παρόμοιο με τον VanC, που ονομάστηκε VanE (Eliopoulos & Gold, 2001).

3.4 Τύποι αντοχής στην βανκομυκίνη

Από τις πρώτες αναφορές των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων (VRE) στη δεκαετία του 1980, επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία και τις οικονομικές επιπτώσεις από

λοιμώξεις που σχετίζονται με VRE και επίμονο αποικισμό στην ανθρώπινη ιατρική. Εναλλακτικά, οι VRE είναι σπάνια αίτια λοίμωξης στα ζώα και σπάνια συναντώνται σε ζώα συντροφιάς (Boehn & Sassoubre, 2014).

Ο κύριος μηχανισμός της αντοχής στα γλυκοπεπτίδια (π.χ. βανκομυκίνη) στους εντερόκοκκους περιλαμβάνει την τροποποίηση της οδού σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης, συγκεκριμένα την αντικατάσταση της D-αλανίνης-D-αλανίνης (D-Ala-D-Ala), είτε σε D-αλανίνη-D-γαλακτικό (D-Ala-D-Lac) είτε σε D-αλανίνη-D-σερίνη (D-Ala-D-Ser). Τέτοιες τροποποιήσεις μπορούν να οδηγήσουν σε ποικίλες εκφράσεις αντοχής στα γλυκοπεπτίδια. Για παράδειγμα, τα αντίστοιχα τροποποιημένα D-Ala-D-Lac και D-Ala-D-Ser οδηγούν σε μικρότερη συγγένεια πρόσδεσης των φαρμάκων γλυκοπεπτιδίων σε σύγκριση με τα φυσιολογικά πρόδρομα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος D-Ala-D-Ala- ~1000 φορές μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης για το D-Ala-D-Lac και ~7 φορές για το D-Ala-D-Ser (Ahmed & Baptiste, 2018).

Η ικανότητα πρόκλησης τέτοιων μεταβολών σχετίζεται με διάφορα γονίδια που φιλοξενούνται σε κινητά γενετικά στοιχεία ή/και σε χρωμοσωμικά κωδικοποιημένες περιοχές διαφόρων ειδών *Enterococcus*. Οι τελευταίοι μηχανισμοί φαίνεται να βρίσκονται πίσω από τους περισσότερους φαινότυπους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη και τη μεταβλητή σύνθεση των μορφών αντοχής που σχετίζονται με τη βανκομυκίνη. Αυτή η διάκριση μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τα διαφορετικά επίπεδα (χαμηλού επιπέδου έναντι υψηλού επιπέδου) αντοχής στα γλυκοπεπτίδια (Ahmed & Baptiste, 2018).

Μέχρι σήμερα, τα οπερόνια που σχετίζονται με την αντοχή των εντερόκοκκων στη βανκομυκίνη περιγράφονται ως vanA, -B, -C, -D, -E, -G, -L, -M και N. Αυτά διακρίνονται από το βαθμό μειωμένης ευαισθησίας, δηλαδή ανθεκτικότητας στα γλυκοπεπτίδια, τη δυνατότητα μεταφοράς και την επαγωγιμότητα. Ένα επιπλέον οπερόνιο (vanF) έχει επίσης περιγραφεί, αλλά μέχρι στιγμής μόνο στον *Paenibacillus popilliae*. Αυτή η παραλλαγή vanF έχει μεγάλη ομοιότητα με τις αλληλουχίες αμινοξέων του οπερονίου vanA και ως εκ τούτου ο *P. popilliae* έχει προταθεί ως πιθανή προέλευση της ανθεκτικότητας των εντερόκοκκων στη βανκομυκίνη (Ahmed & Baptiste, 2018).

Τα περισσότερα κρούσματα VRE σε ανθρώπινους πληθυσμούς αποδίδονται στις συστάδες γονιδίων *vanA* και *vanB*, οι οποίες έχουν επίσης εντοπιστεί σε διάφορα αποικισμένα ζώα και περιβαλλοντικά υλικά. Πρόκειται για πολύπλοκους διακριτούς γενετικούς προσδιορισμούς και τα πιο διαδεδομένα παγκοσμίως *van*-οπερόνια (Ahmed & Baptiste, 2018).

Το οπερόνιο *vanA* συνδέεται συνήθως με τρανσποζόνια (Tn), όπως το Tn1546 που περιλαμβάνει δύο γονίδια για τη μετάθεση του στοιχείου (*orf1* και *orf2*) και ένα γονίδιο που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην τευκοπλανίνη (*vanZ*). Το γονιδιακό σύμπλεγμα *vanA* περιλαμβάνει επτά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης που μεταγράφονται από δύο διαφορετικούς υποκινητές. Η ρυθμιστική συσκευή κωδικοποιείται από το σύστημα δύο συστατικών *vanR* (ρυθμιστής απόκρισης) και *vanS* (κινάση του αισθητήρα), τα οποία μεταγράφονται από έναν κοινό υποκινητή, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια μεταγράφονται από έναν δεύτερο υποκινητή. Τα γονιδιακά προϊόντα που τροποποιούν ειδικά την παραγωγή πρόδρομων ουσιών πεπτιδογλυκάνης περιλαμβάνουν το *vanH* (αφυδρογονάση που μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε γαλακτικό) και το *vanA* (λιγάση που σχηματίζει το διπεπτιδίο D-Ala-D-Lac) (Ahmed & Baptiste, 2018).

Ένα ουσιαστικό μέρος του φαινομένου της ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη είναι ότι δεν συνεχίζεται η παραγωγή του φυσιολογικού άκρου D-Ala-D-Ala του πενταπεπτιδίου. Αυτό επιλύεται με τα γονίδια *vanX* και *vanY*, όπου το *vanX* (διπεπτιδάση που διασπά την D-Ala-D-Ala) υδρολύει και έτσι διακόπτει την παραγωγή των πενταπεπτιδίων και το *vanY* (D, D-καρβοξυπεπτιδάση) διασπά τα πενταπεπτιδία που μπορεί να εξακολουθούν να παράγονται. Μπορεί να υπάρξουν παραλλαγές στη σύνθεση αυτού του οπερονίου αντίστασης στη βανκομυκίνη λόγω εισαγωγής στοιχείων IS και οι παραλλαγές αυτές περιγράφονται ως στοιχεία τύπου *vanA* (Ahmed & Baptiste, 2018).

Το τυπικό οπερόνιο *vanB* έχει παρόμοια γενετική ραχοκοκαλιά με το *vanA*. Έχει αναφερθεί υψηλού επιπέδου αντίσταση στη βανκομυκίνη εντός των υποτύπων *vanB* και έχει χαρακτηριστεί ως *vanB1-3* με τον *vanB-2* να είναι ο πιο διαδεδομένος γονότυπος παγκοσμίως. Η μεταφορά των αλληλόμορφων ανθεκτικότητας *vanB* πραγματοποιείται μέσω της απόκτησης και/ή της ανταλλαγής τρανσποζονίων όπως τα Tn1547, Tn1549 και Tn5382.

Το συζευκτικό τρανσποζόνιο vanB, γνωστό ως Tn1549 είναι ευρέως διαδεδομένο μεταξύ των εντερόκοκκων τύπου vanB και άλλων θετικών κατά Gram βακτηρίων. Πρόκειται κυρίως για χρωμοσωμικό τρανσποζόνιο και λιγότερο συχνά απαντάται σε πλασμίδια (Zheng et al., 2009).

Η γενετική οργάνωση του vanB είναι παρόμοια με εκείνη του vanA, δεδομένου ότι περιέχει δύο διαφορετικούς υποκινητές που μεταγράφουν επτά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, αλλά υπάρχουν ορισμένες σημαντικές διαφορές. Για παράδειγμα, το vanB κωδικοποιεί ένα σύστημα σηματοδότησης δύο συνιστωσών (που ονομάζονται vanRB και vanSB) το οποίο διαφέρει σημαντικά από αυτό που κωδικοποιείται στο vanA. Επιπλέον, το vanB κωδικοποιεί ομόλογα του vanH και της D-Ala-D-Ala λιγάσης (που κωδικοποιείται από το vanB), καθώς και των πεπτιδασών (vanX και vanY). Ωστόσο, η vanB στερείται ομόλογου της vanZ και αντ' αυτού κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με το όνομα vanW, της οποίας ο ρόλος στην ανθεκτικότητα δεν είναι πλήρως κατανοητός (Werner et al., 2012).

Αντίθετα, το οπερόνιο vanC είναι γενετικά διαφορετικό από τα vanA και vanB και τυπικά "λιγότερο ιογενείς" εντερόκοκκοι από εκείνους που φέρουν επαγώγιμες ομάδες γονιδίων vanA και vanB. Οι υποτύποι vanC-ανθεκτικότητας, vanC-1, vanC-2 και vanC-3, είναι γνωστό ότι είναι εγγενώς παρόντες στους *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* και *Enterococcus flavescens*, αντίστοιχα, και μερικές φορές θεωρούνται ως δείκτες για αυτά τα εντεροκοκκικά είδη. Το γονιδιακό σύμπλεγμα vanC-2 στον *E. casseliflavus* παρουσιάζει σύνθεση παρόμοια με το σύμπλεγμα vanC-1 στον *E. gallinarum*. Πρόσφατα, περιγράφηκε επίσης ένας υπότυπος vanC-4 με 93-95% νουκλεοτιδική ομολογία με το vanC-2/-3 (Ahmed & Baptiste, 2018).

Τα οπερόνια vanD είναι αποκλειστικά χρωμοσωμικά και παρόμοια με τα vanA και vanB. Αυτό το οπερόνιο αντιπροσωπεύει έναν αριθμό διαφορετικών συνδυασμών μεταλλάξεων και επιπλέον, διαφορετικά στελέχη εντερόκοκκου επιδεικνύουν φαινότυπο συνισταμένης αντοχής που προκύπτει από διαφορετικές μεταλλάξεις εντός των ρυθμιστών του οπερονίου. Αυτές οι διάφορες τροποποιήσεις έχουν οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα υποτύπων και φαινοτύπων αντοχής. Παρ' όλα αυτά, το vanD περιγράφεται αραιά μεταξύ διαφόρων ειδών εντερόκοκκων και μπορεί επίσης να μεταφέρεται από το vanC *E. Gallinarum* (Ahmed & Baptiste, 2018).

Το γονιδιακό σύμπλεγμα vanE έχει περιγραφεί σε λίγα στελέχη *E. faecalis* από τη Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία. Το σύμπλεγμα vanE μοιάζει με το vanC1, το οποίο απαντάται φυσικά στο *E. gallinarum*. Μελέτες έχουν προτείνει ότι ένα σύμπλεγμα εντός ενός γονιδίου ιντεγκράσης του vanE- *E. faecalis* μπορεί να έχει εξελιχθεί με την απόκτηση αυτού του οπερονίου. Ωστόσο, οι αναφορές δεν έχουν προσδιορίσει τη δυνατότητα μεταφοράς αυτού του γονιδιακού συμπλέγματος. Έχουν περιγραφεί *Enterococcus faecalis* που διαθέτουν ένα σύμπλεγμα vanG και έχουν ταυτοποιηθεί δύο υπότυποι. Σε αντίθεση με τα άλλα οπερόνια van D-Ala-D-Ser (δηλαδή vanE, vanC vanL και vanN), αυτό το οπερόνιο έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να μεταφερθεί μέσω ενός συζευκτικού πλασμιδίου από το *E. faecalis* (Ahmed & Baptiste, 2018).

Το σύνολο των γονιδίων van διευρύνθηκε πρόσφατα μετά την ανακάλυψη των οπερονίων vanL, vanM και vanN. Το vanM είναι γενετικά και φαινοτυπικά παρόμοιο με τα vanA, vanB και vanD, ενώ τόσο το vanL όσο και το vanN είναι παρόμοια με το vanC. Το γονιδιακό σύμπλεγμα vanL παρουσιάζει 49-51% ταυτότητα αλληλουχίας με τις λιγάσες vanE και vanC. Ωστόσο, το εν λόγω απομονωμένο *E. faecalis* VRE δεν επέδειξε ούτε ικανότητα μεταφοράς ούτε ικανότητα σύζευξης, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γονιδιακό σύμπλεγμα vanL κωδικοποιείται χρωμοσωμικά. Το οπερόνιο vanM έχει περιγραφεί σε απομονωμένα *E. faecium* VRE και επέδειξε στενή γονιδιακή διάταξη με την vanD και in vitro μεταβιβάσιμη αντίσταση μέσω σύζευξης. Το οπερόνιο vanN είναι το πιο πρόσφατα αναγνωρισμένο γονιδιακό σύμπλεγμα που περιγράφηκε στο *E. faecium*. Πρόκειται για ένα παρόμοιο οπερόνιο με το vanG, αλλά πιο μοναδικό, καθώς έχει επίσης αναφερθεί ότι είναι μεταβιβάσιμο μέσω κινητών γενετικών στοιχείων και μόνο στο *E. faecium*. Σε γενικές γραμμές, τα οπερόνια D-Ala-D-Ser κωδικοποιούνται συχνά χρωμοσωμικά, αλλά ορισμένα από τα τελευταία προστιθέμενα οπερόνια (δηλ. G και N) είναι μεταβιβάσιμα στο *E. faecalis* και στο *E. faecium* αντίστοιχα, και μόνο κατ' εξαίρεση (Ahmed & Baptiste, 2018).

Κεφάλαιο 4: Κανόνες Ε.Ε., Υγιεινή και Τρόποι Αντιμετώπισης

4.1 Κανόνες Ευρωπαϊκής Ένωσης

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), τα μέλη του γένους *Enterococcus* δεν συνιστώνται για τον κατάλογο QPS ούτε για το καθεστώς GRAS σύμφωνα με την Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, ΗΠΑ, λόγω της αμφιλεγόμενης επιδημιολογικής τους κατάστασης. Όσον αφορά το καθεστώς ασφαλείας τους, οι εντερόκοκκοι κατατάσσονται στην ομάδα κινδύνου 2, μαζί με άλλους μικροοργανισμούς που φέρουν παράγοντες ιογένεσης (European Parliament, 2000).

Από τη μία πλευρά, οι εντερόκοκκοι έχουν συσχετιστεί με βακτηριαμιά και νοσοκομειακή λοιμώξεις που σχετίζονται κυρίως με την παρουσία εγγενών ή επίκτητων γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που βρίσκονται σε χρωμοσώματα, πλασμίδια ή τρανσποζόνια, καθώς και με εκείνη των γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες ιογένεσης (Porovic et al., 2018).

Επιπλέον, μια αμφιλεγόμενη συσχέτιση μεταξύ του *E faecalis* και του καρκίνου του παγκρέατος και του παχέος εντέρου προτάθηκε πρόσφατα. Εκτός από την ικανότητα να προκαλεί ασθένειες, η παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας και ιογένεσης αποτελεί τεράστια απειλή για την παγκόσμια υγεία λόγω της πιθανότητας οριζόντιας μεταφοράς των γονιδίων αυτών μέσω των τροφίμων αλυσίδας σε κλινικά σημαντικά παθογόνα. Αξίζει να σημειωθεί ειδικότερα ότι οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (VRE) αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στην υγειονομική περίθαλψη, δεδομένου ότι η βανκομυκίνη χρησιμοποιείται συχνά ως η τελευταία εναλλακτική λύση στη θεραπεία των νοσοκομειακών λοιμώξεων που προκαλούνται από πολλαπλά ανθεκτικούς στα αντιβιοτικά εντερόκοκκους (Ogier & Serror, 2008).

Όσον αφορά την παρουσία γονιδίων ιογένεσης, προηγούμενα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τη ζελατινάση (*gelE*), τον ενεργοποιητή κυτταρολυσίνης (*cylA*), την υαλουρονιδάση (*hylEfm*), ουσία συσσώρευσης (*agg*), κολλαγονική συγκολλητίνη (*ace*) και

εντεροκοκκική επιφανειακή πρωτεΐνη (esp) ανιχνεύονται σποραδικά σε απομονώσεις γαλακτοκομικών προϊόντων (Porovic et al., 2018).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχουν δύο ομάδες παραγόντων ιογένεσης, οι επιφανειακοί παράγοντες που εμπλέκονται στον αποικισμό των κυττάρων του ξενιστή και οι παράγοντες που προκαλούν βλάβες στους ιστούς του ξενιστή. Οι παράγοντες ιογένεσης που επιτρέπουν τη λειτουργία του ξενιστή αποικισμό, συμπεριλαμβανομένης της ουσίας συσσώρευσης (AS), της προσκολλητικής ουσίας του κυτταρικού τοιχώματος (EfaA), της πρωτεΐνης δέσμωσης κολλαγόνου (Ace) και της επιφανειακής πρωτεΐνης του εντερόκοκκου (Esp), παρέχουν τη δέσμωση εντερόκοκκων σε υποδοχείς στο επιθήλιο του ξενιστή [16]. Ως εκ τούτου, αν και ο αποικισμός αποτελεί το πρώτο βήμα στην παθογένεια, οι παράγοντες προσκόλλησης από μόνοι τους δεν εμπλέκονται απαραίτητα στην παθογένεια. Τα γονίδια για την αιμολυτική δραστηριότητα, καθώς και για τις προσκολλήσεις (esp και efaA) βρέθηκαν με υψηλή συχνότητα σε όλα τα εξετασθέντα στελέχη *E. faecalis* (Veljovic et al., 2014).

Αν και τα γονίδια agg και esp σχετίζονται θετικά με τα προβιοτικά χαρακτηριστικά σε γαλακτοκομικά απομονωμένα στελέχη εντερόκοκκων, αυτό πρέπει αναμφισβήτητα να λαμβάνεται με προσοχή δεδομένου ότι η AS αποτελεί μέρος της διαδικασίας σύζευξης που είναι υπεύθυνη για την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ βακτηριακών κυττάρων κατά τη συζυγιακή μεταφορά πλασμιδίων φερομόνης φύλου και θα μπορούσε να ευνοήσει την οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Sartingen et al., 2000).

Επιπλέον, το γονίδιο esp που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Esp βρίσκεται στη νησίδα παθογένειας (PAI), η οποία περιέχει επίσης γονίδια που εμπλέκονται στην εκροή αντιβιοτικών. Ακόμη, η πρωτεΐνη Esp εμπλέκεται στην προσκόλληση, τον αποικισμό και την αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος.

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ένα συγκεκριμένο στέλεχος ως συμπλήρωμα διατροφής, είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί η παρουσία/απουσία μεταβιβάσιμων γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και/ή γονιδίων ιογένεσης, δεδομένου ότι η παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και παράγοντες ιογένεσης στον

εντερόκοκκο στελέχη που προορίζονται για καλλιέργεια εκκίνησης στην παραγωγή τροφίμων θα μπορούσαν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στα στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων λόγω της πιθανής οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων σε όλη την τροφική αλυσίδα ή ακόμη και να προκαλέσει την εμφάνιση ασθενειών (Ramos et al., 2020).

Η κατάσταση ασφάλειας 636 απομονωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων που ανήκουν στα είδη *E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. italicus* και *Enterococcus hirae*, διερευνήθηκε με τη χρήση διαφόρων μικροβιολογικών και μοριακών μεθόδων. Το 29,1% των εντερόκοκκων ήταν ευαίσθητοι στα αντιβιοτικά, αλλά η χρήση της μεθόδου μικροδιάλυσης έδειξε ότι μεταξύ αυτών ακόμη και το 57% ήταν ανθεκτικοί στην σιπροφλοξασίνη ή την γενταμυκίνη, γεγονός που υποδεικνύει ότι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά θα πρέπει να επιλέγεται προσεκτικά (Porovic et al., 2018).

Η αυγή του 21^{ου} αιώνα σηματοδότησε για την Ευρωπαϊκή Ένωση την εποχή της λεγόμενης «εναρμόνισης» του δικαίου τροφίμων, συμμορφούμενη με την «διατροφική παγκοσμιοποίηση», η οποία έθεσε στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος την ασφάλεια και την ποιότητα των διατροφικών προϊόντων. Στόχος της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη νέα χιλιετία υπήρξε η εξασφάλιση τόσο της διατροφικής ευεξίας των ευρωπαίων πολιτών, όσο και η ελεύθερη διακίνηση διατροφικών εμπορευμάτων μεταξύ των κρατών μελών (Comodo & Bonaccorsi, 2007).

Θεμέλιος λίθος της εναρμόνισης του δικαίου τροφίμων υπήρξε ο *Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 178/2002 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 28ης Ιανουαρίου 2002, για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφαλείας των τροφίμων (General Food Law)*.

Νομική βάση για την θέσπιση του υπήρξαν τα άρθρα 37, 95, 133 και 152 παρ. 4 στ. β' της Συνθήκης της Ευρωπαϊκής Κοινότητας. Ο Κανονισμός 178/2002 αποτέλεσε την πρώτη ολοκληρωμένη προσέγγιση εκ μέρους της Ευρωπαϊκής Ένωσης επί της ασφάλειας τροφίμων, σε όλα τα στάδια της παραγωγής και για αυτό το λόγο θεωρείται το «Σύνταγμα» του συγκεκριμένου τομέα 163. Απαρτίζεται από τέσσερα κεφάλαια: ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΠΕΔΙΟ

ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΓΕΝΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΑΡΧΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΓΚΑΙΡΗΣ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ, ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΡΙΣΕΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΕΚΤΑΚΤΗΣ ΑΝΑΓΚΗΣ.

Στόχος του Κανονισμού 178/2002 ήταν να αποτελέσει τη βάση για την εξασφάλιση υψηλού επιπέδου προστασίας της υγείας του ανθρώπου και των συμφερόντων των καταναλωτών σε σχέση με τα τρόφιμα, λαμβάνοντας ειδικότερα υπόψη την λυμορφία στον εφοδιασμό τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των παραδοσιακών προϊόντων, ενώ παράλληλα να εξασφαλίσει την αποτελεσματική λειτουργία της εσωτερικής αγοράς. Καθιέρωσε κοινές αρχές και ευθύνες, τα μέσα ώστε να παρέχονται ισχυρή επιστημονική βάση, αποτελεσματικές οργανωτικές ρυθμίσεις και διαδικασίες με τις οποίες θα υποστηριχθεί η λήψη αποφάσεων σε θέματα ασφάλειας των τροφίμων (Άρθρο 1). Με άλλα λόγια, με τον εν λόγω Κανονισμό επιδιώχθηκε ο προσδιορισμός του ίδιου του δικαίου τροφίμων. Μάλιστα, επιδιώχθηκε μια ολιστική προσέγγιση, προκειμένου να εφαρμόζεται ενιαίο νομοθετικό πλαίσιο σε κάθε στάδιο της διατροφικής αλυσίδας, «από το χωράφι ως το πιρούνι», καθώς το πεδίο εφαρμογής του εκτείνεται σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής των τροφίμων και των ζωοτροφών (Van der Meulen, 2013).

Ακόμη, σημαντική συμβολή του Κανονισμού – Πλαίσιο είναι ότι όρισε την έννοια του «τροφίμου»: ως «τρόφιμα» (ή «είδη διατροφής») νοούνται ουσίες ή προϊόντα, είτε αυτά έχουν υποστεί πλήρη ή μερική επεξεργασία είτε όχι, τα οποία προορίζονται για βρώση από τον άνθρωπο ή αναμένεται ευλόγως ότι θα χρησιμεύσουν για τον σκοπό αυτόν.

Στα «τρόφιμα» περιλαμβάνονται ποτά, τσίχλες και οποιαδήποτε ουσία, περιλαμβανομένου του νερού, η οποία ενσωματώνεται σκόπιμα στα τρόφιμα στη διάρκεια της παραγωγής, της παρασκευής ή της επεξεργασίας τους... Στα «τρόφιμα» δεν περιλαμβάνονται τα ακόλουθα: α) ζωοτροφές, β) ζώντα ζώα, εκτός εάν παρασκευάζονται για διάθεση στην αγορά για ανθρώπινη κατανάλωση, γ) φυτά πριν από τη συγκομιδή, δ) φαρμακευτικά προϊόντα... ε) καλλυντικά... στ) καπνός και προϊόντα καπνού... ζ) ναρκωτικές ή ψυχοτρόποι ουσίες κατά την έννοια της ενιαίας σύμβασης των Ηνωμένων Εθνών για τα ναρκωτικά του 1961, και της σύμβασης των Ηνωμένων Εθνών για τις

ψυχοτρόπους ουσίες του 1971, η) τα κατάλοιπα και οι μολυσματικές προσμείξεις. (Άρθρο 2). Σε περίπτωση, λοιπόν, που ένα προϊόν ανταποκρίνεται στον ανωτέρω δοθέν ορισμό, πρόκειται δηλαδή κατ' ουσίαν για «τρόφιμο», βρίσκεται στο πεδίο εφαρμογής του Κανονισμού 178/2002.

Με τον Κανονισμό – Πλαίσιο προσδιορίστηκε, επίσης, το *αντικείμενο* του ευρωπαϊκού δικαίου τροφίμων το οποίο έθεσε ως *γενικούς στόχους* τα εξής: Κατέστη σαφές πως η νομοθεσία για τα τρόφιμα, πρώτον, επιδιώκει έναν ή περισσότερους από τους γενικούς στόχους που αφορούν την υψηλού επιπέδου προστασία της ανθρώπινης ζωής και υγείας και την προστασία των συμφερόντων των καταναλωτών, συμπεριλαμβανομένων των ορθών πρακτικών στο εμπόριο τροφίμων, λαμβάνοντας υπόψη, όπου συντρέχει λόγος, την προστασία της υγείας και της ορθής μεταχείρισης των ζώων, καθώς και την προστασία των φυτών και του περιβάλλοντος. Η νομοθεσία για τα τρόφιμα, δεύτερον, αποσκοπεί στο να επιτύχει την ελεύθερη κυκλοφορία στην Κοινότητα των τροφίμων και των ζωοτροφών που παράγονται ή διατίθενται στην αγορά. Κατά την σύνταξη ή την προσαρμογή της σχετικής νομοθεσίας λαμβάνονται υπόψη διεθνή πρότυπα (Άρθρο 5). Χαρακτηριστικό παράδειγμα υιοθέτησης διεθνών προτύπων αποτελεί ο ορισμός της έννοιας του «τροφίμου», όπως εκτέθηκε παραπάνω, ο οποίος έχει σαφώς δεχτεί επιρροές από τον αντίστοιχο ορισμό του λεγόμενου «Codex Alimentarius» (Van der Meulen, 2013).

Προκειμένου να καταστούν επιτεύξιμοι οι γενικοί στόχοι που έθεσε ο Κανονισμός 178/2002, επιστρατεύθηκε η *ανάλυση κινδύνου* (*Risk Analysis – RA*): Η αξιολόγηση του κινδύνου βασίζεται στα διαθέσιμα επιστημονικά στοιχεία και διεξάγεται με τρόπο ανεξάρτητο, αντικειμενικό και διαφανή, ενώ η διαχείριση κινδύνου λαμβάνει υπόψη τα αποτελέσματα της εν λόγω αξιολόγησης και ιδίως τις γνώμες της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (βλ. αναλυτικά παρακάτω), άλλους παράγοντες, όπως αρμόζει στο εκάστοτε θέμα, καθώς και την αρχή της προφύλαξης (Άρθρο 6).

Ειδικότερα για την αρχή της προφύλαξης προβλέπεται πως σε ειδικές περιπτώσεις κατά τις οποίες εντοπίζεται πιθανότητα βλαβερών επιπτώσεων στην υγεία, αλλά εξακολουθεί να υπάρχει επιστημονική αβεβαιότητα, μπορούν να ληφθούν τα προσωρινά μέτρα διαχείρισης του κινδύνου που είναι αναγκαία για την εξασφάλιση του υψηλού επιπέδου προστασίας της υγείας που έχει

επιλεγεί στην Κοινότητα, μέχρι να υπάρξουν περαιτέρω επιστημονικές πληροφορίες για μια πιο εμπειριστατωμένη αξιολόγηση του κινδύνου (Άρθρο 7). Εξάλλου, η αρχή της προφύλαξης αποτέλεσε εκείνο το χρονικό διάστημα βασική θεματική ενδιαφέροντος και για το –τότε Δικαστήριο Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. Για τη θεματική αυτή προέκυψαν ιδιαίτερα κρίσιμα νομολογιακά συμπεράσματα (Van der Meulen, 2013).

Εν ολίγοις, ο ενωσιακός νομοθέτης ανέπτυξε ένα σύστημα που δίνει τη δυνατότητα στις αρμόδιες αρχές να λάβουν προστατευτικά μέτρα βασισμένες, ουσιαστικά, στο «πλέον δυσμενές σενάριο» (worst case scenario), όπως αυτό –πιθανόν- να προκύψει από επιστημονικά δεδομένα που έχουν στη διάθεση τους. Η πολύχρονη πλέον εφαρμογή του εν λόγω συστήματος, όπως προβλέπεται από τον Κανονισμό 178/2002, φαίνεται να έχει λειτουργήσει επιτυχώς, εξασφαλίζοντας την προστασία των καταναλωτών από την παραπλάνηση και τις βλαπτικές ουσίες, παράλληλα με την ενεργοποίηση της εσωτερικής αγοράς (Van der Meulen, 2013).

Βασική πρόβλεψη του ενωσιακού δικαίου τροφίμων είναι πως τρόφιμα τα οποία είναι μη ασφαλή, δηλαδή είτε είναι επιβλαβή για την υγεία είτε ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση δεν διατίθενται στην αγορά (Άρθρο 14). Αποτελεί υποχρέωση των υπεύθυνων επιχειρήσεων να εξασφαλίζουν πως τα τρόφιμα ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις του νομοθετικού πλαισίου (Άρθρο 17). Η οριοθέτηση των υποχρεώσεων αυτών σε μεγάλο βαθμό επετεύχθει με τη βοήθεια της νομολογίας του Δικαστηρίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. Από την άλλη, ο ρόλος των κρατών μελών είναι να παρακολουθούν και να επαληθεύουν τα παραπάνω μέσω επίσημων ελέγχων (Άρθρο 17). Οι εθνικές αρχές για την ασφάλεια τροφίμων έχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των πολιτικών που προβλέπει ο Κανονισμός, καθώς έχουν διαμορφώσει ένα πολυεπίπεδο κανονιστικό δίκτυο το οποίο συνεισφέρει τόσο τεχνικά όσο και επιστημονικά (Abels & Kobusch, 2010).

Τέλος, η Οδηγία 2001/95/ΕΟΚ172 και ο Κανονισμός 178/2002 ανέπτυξαν ένα Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για την κοινοποίηση άμεσων ή έμμεσων κινδύνων για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων που προέρχονται από τρόφιμα ή ζωοτροφές. Σε αυτό συμμετέχουν τα κράτη μέλη, η Επιτροπή και η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων. Όταν

ένα μέλος του δικτύου διαθέτει οποιαδήποτε πληροφορία σχετικά με την ύπαρξη σοβαρού άμεσου ή έμμεσου κινδύνου για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων, που προέρχεται από τρόφιμα ή ζωοτροφές, κοινοποιεί αμέσως την πληροφορία αυτή στην Επιτροπή, μέσω του συστήματος έγκαιρης προειδοποίησης και η Επιτροπή με τη σειρά της τη διαβιβάζει αμέσως στα μέλη του δικτύου. (Άρθρο 50).

Στη συνέχεια, η Επιτροπή, ύστερα από συζήτηση με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων θεσπίζει τα απαραίτητα μέτρα (Άρθρο 51). Σε περιπτώσεις *Κατάστασης Έκτακτης Ανάγκης*, όταν δηλαδή είναι προφανές ότι τα τρόφιμα ή οι ζωοτροφές που προέρχονται από την Κοινότητα ή εισάγονται από τρίτη χώρα είναι πιθανό να αποτελέσουν σοβαρό κίνδυνο που δεν μπορεί να περιορισθεί ικανοποιητικά με τα μέτρα που λαμβάνει το αφορώμενο κράτος μέλος, η Επιτροπή, ενεργώντας με δική της πρωτοβουλία ή κατόπιν αιτήματος κράτους μέλους, θεσπίζει αμέσως ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα μέτρα, ανάλογα με τη σοβαρότητα της κατάστασης:

- Στην περίπτωση τροφίμων ή ζωοτροφών κοινοτικής προέλευσης:
 - αναστολή της διάθεσης στην αγορά ή της χρήσης των εν λόγω τροφίμων.
 - αναστολή της διάθεσης στην αγορά ή της χρήσης των εν λόγω ζωοτροφών.
 - καθορισμός ειδικών όρων για τα εν λόγω τρόφιμα ή ζωοτροφές.
 - κάθε άλλο κατάλληλο προσωρινό μέτρο.
- Στην περίπτωση τροφίμων ή ζωοτροφών που εισάγονται από τρίτη χώρα:
 - ανάκληση των εισαγωγών των εν λόγω τροφίμων ή ζωοτροφών από ολόκληρη ή μέρος της επικράτειας της εν λόγω τρίτης χώρας και, εάν ενδείκνυται, από την τρίτη χώρα διαμετακόμισης ο καθορισμός ειδικών όρων για τα εν λόγω τρόφιμα ή ζωοτροφές από ολόκληρη ή μέρος της επικράτειας της εν λόγω τρίτης χώρας.
 - κάθε άλλο κατάλληλο προσωρινό μέτρο (Άρθρο 53).

Σε κάποιες καταστάσεις, που ενέχουν άμεσους ή έμμεσους κινδύνους, που εκτιμάται δεν μπορούν να προληφθούν, να εξαλειφθούν ή να μειωθούν σε ένα επιτρεπτό επίπεδο με την παραπάνω διαδικασία, η Επιτροπή σε στενή συνεργασία με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων θεσπίζει *Γενικό Σχέδιο Διαχείρισης Κρίσεων* στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων και των ζωοτροφών, το οποίο καθορίζει τις πρακτικές διαδικασίες που απαιτούνται για τη διαχείριση μιας κρίσης, συμπεριλαμβανομένων των προς εφαρμογή αρχών διαφάνειας και μιας επικοινωνιακής στρατηγικής (Άρθρο 55).

Συνοπτικά, ο Κανονισμός 178/2002 στηρίζεται στις έννοιες: *της ασφάλειας, της ευθύνης, της ιχνηλασιμότητας, της διαφάνειας, της κατάστασης ανάγκης, της πρόληψης και της συνεργασίας* (Van der Meulen, 2013).

4.2 Υγιεινή για την αποφυγή Εντερόκοκκων

Τον Απρίλιο του 2004 εγκρίθηκε η «δέσμη κανόνων για την υγιεινή» (hygiene package), η οποία αφορούσε κυρίως την υγιεινή των τροφίμων και τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και ενός κοινοτικού πλαισίου για τους επίσημους ελέγχους στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Σύμφωνα με τους συγκεκριμένους κανόνες, άμεσα υπεύθυνοι για την υγιεινή των τροφίμων είναι οι διάφοροι παράγοντες που εμπλέκονται στην τροφική αλυσίδα μέσω ενός αυτορρυθμιζόμενου συστήματος, το οποίο παρακολουθείται μέσω επίσημων ελέγχων που πρέπει να διενεργούνται από τις αρμόδιες αρχές. Τα τρία αυτά βασικά νομοθετήματα, συμπληρώνονται από δύο ακόμη, τα οποία έρχονται να ολοκληρώσουν τη «δέσμη» (Dwinger et al., 2007):

*Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 852/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για την υγιεινή των τροφίμων*¹⁷⁹. Νομική βάση του εν λόγω Κανονισμού υπήρξε το άρθρο 95 και το άρθρο 152 παρ. 4 στ. β' της Συνθήκης για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας και απαρτίζεται από πέντε κεφάλαια: *ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΟΔΗΓΟΙ ΟΡΘΗΣ ΠΡΑΚΤΙΚΗΣ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV:*

ΕΙΣΑΓΩΓΕΣ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΕΣ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΤΕΛΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ. Ο Κανονισμός 852/2004 θεσπίζει τους γενικούς κανόνες για τους υπεύθυνους επιχειρήσεων τροφίμων όσον αφορά την υγιεινή των τροφίμων και εφαρμόζεται σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τροφίμων, καθώς και στις εξαγωγές.

Αντίθετα, δεν βρίσκει εφαρμογή στην πρωτογενή παραγωγή τροφίμων για ιδιωτική οικιακή χρήση, στην οικιακή παρασκευή, χειρισμό ή αποθήκευση τροφίμων για ιδιωτική οικιακή κατανάλωση, στην άμεση προμήθεια από τον παραγωγό μικρών ποσοτήτων πρωτογενών προϊόντων στον τελικό καταναλωτή ή στα τοπικά καταστήματα λιανικής πώλησης που προμηθεύουν άμεσα τον τελικό καταναλωτή και στα κέντρα συλλογής και βυρσοδεψεία (Άρθρο 1). Ως «υγιεινή των τροφίμων» ορίζονται τα μέτρα και οι όροι που είναι αναγκαία για τον έλεγχο των πηγών κινδύνου και για την εξασφάλιση της καταλληλότητας των τροφίμων για ανθρώπινη κατανάλωση, λαμβανομένης υπόψη της σκοπούμενης χρήσης τους (Άρθρο 2). Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων εξασφαλίζουν ότι όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής που βρίσκονται υπό τον έλεγχό τους πληρούν τις σχετικές απαιτήσεις (Άρθρο 3), θεσπίζοντας, εφαρμόζοντας και διατηρώντας πάγια διαδικασία ή διαδικασίες βάσει των αρχών HACCP180 (Άρθρο 5) (Dwinger et al., 2007).

Επίσης, ο Κανονισμός 852/2004 προβλέπει τη συνεργασία μεταξύ των υπεύθυνων επιχειρήσεων τροφίμων με την αρμόδια αρχή, κοινοποιώντας της κάθε εγκατάσταση υπό τον έλεγχό τους η οποία εκτελεί οποιοδήποτε στάδιο παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τροφίμων, προκειμένου να καταχωρισθεί (Άρθρο 6). Οδηγοί Καλής Πρακτικής (Κεφάλαιο III) αναφορικά με την υγιεινή των τροφίμων και την εφαρμογή των αρχών HACCP, καταρτισμένοι είτε από τους κλάδους επιχειρήσεων τροφίμων, είτε σε εθνικό είτε σε κοινοτικό επίπεδο, συμβάλλουν στην συμμόρφωση των επιχειρήσεων με τις υποχρεώσεις τους.

Τέλος, οι υποχρεώσεις των υπεύθυνων επιχειρήσεων τροφίμων είναι δεσμευτικές και στις περιπτώσεις των εισαγόμενων (Άρθρο 10), όσο και των εξαγομένων και επανεξαγομένων τροφίμων (Άρθρο 11). Το Παράρτημα I του κανονισμού καλύπτει δραστηριότητες που συνδέονται με την πρωτογενή παραγωγή, και περιλαμβάνει: τη μεταφορά, την αποθήκευση και το χειρισμό

πρωτογενών προϊόντων καθώς και τη μεταφορά ζώντων ζώων. Στο *Παράρτημα II* ορίζονται οι γενικοί στόχοι υγιεινής για τομείς όπως (Dwinger et al., 2007):

- τους χώρους τροφίμων και τον εξοπλισμό,
- τις συνθήκες μεταφοράς,
- τα απορρίμματα τροφίμων,
- την παροχή νερού,
- την ατομική υγιεινή και την εκπαίδευση των εργαζομένων στον τομέα

των τροφίμων,

- την πρώτη και δεύτερη συσκευασία,
- τη θερμική επεξεργασία *Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 853/2004 του*

Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Νομική βάση του Κανονισμού υπήρξε το άρθρο 152 παρ. 4 στ. β' της Συνθήκης για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, ενώ απαρτιζόταν από τέσσερα κεφάλαια: *ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΕΜΠΟΡΙΑ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΤΕΛΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ.* Με τον Κανονισμό 853/2004 θεσπίστηκαν ειδικοί κανόνες για τους υπεύθυνους επιχειρήσεων τροφίμων όσον αφορά την υγιεινή των τροφίμων ζωικής προέλευσης, οι οποίοι ήρθαν να συμπληρώσουν τις ρυθμίσεις του Κανονισμού 852/2004 και εφαρμόζονται στα μη μεταποιημένα και στα μεταποιημένα προϊόντα ζωικής προέλευσης, αλλά όχι στα τρόφιμα που περιέχουν προϊόντα φυτικής προέλευσης, εκτός και αν ρητά προβλέπεται ο αντίθετο (*Άρθρο 1*). Για παράδειγμα, ο εν λόγω Κανονισμός εφαρμόζεται στο κρέας, στα ζώντα δίθυρα μαλάκια, αλιευτικά προϊόντα, στο γάλα, στα αβγά, στα βατραχοπόδαρα και στα σαλιγκάρια. Ειδικότερα, μεταποιημένα προϊόντα είναι τα προϊόντα με βάση το κρέας, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα προϊόντα αβγών, τα μεταποιημένα αλιευτικά προϊόντα, το τετηγμένο ζωικό λίπος, τα κατάλοιπα ζωικού λίπους, η ζελατίνη, το κολλαγόνο, τα επεξεργασμένα στομάχια, ουροδόχοι κύστες και έντερα. Εξ αντιδιαστολής, ο Κανονισμός 853/2004, δεν βρίσκει εφαρμογή στην πρωτογενή παραγωγή τροφίμων για ιδιωτική οικιακή χρήση, στην οικιακή παρασκευή, στον χειρισμό ή στην αποθήκευση τροφίμων για ιδιωτική οικιακή κατανάλωση, στην άμεση

προμήθεια, από τον παραγωγό, μικρών ποσοτήτων πρωτογενών προϊόντων στον τελικό καταναλωτή ή σε τοπικά καταστήματα λιανικής πώλησης που εφοδιάζουν απευθείας τον τελικό καταναλωτή, στην άμεση προμήθεια από τον παραγωγό στον τελικό καταναλωτή ή σε τοπικά καταστήματα λιανικής πώλησης που προμηθεύουν το κρέας αυτό στον τελικό καταναλωτή ως νωπό κρέας, μικρών ποσοτήτων κρέατος πουλερικών και λαγομόρφων που σφάζονται στο αγρόκτημα και στους κυνηγούς που προμηθεύουν μικρές ποσότητες αγρίων θηραμάτων ή κρέατος αγρίων θηραμάτων απευθείας στον τελικό καταναλωτή ή σε τοπικά καταστήματα λιανικής πώλησης που εφοδιάζουν απευθείας τον τελικό καταναλωτή (Άρθρο 1). Στις περιπτώσεις αυτές, της άμεσης προμήθειας στον τελικό καταναλωτή εφαρμόζεται Κανονισμός 852/2004 (Dwinger et al., 2007):

Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 854/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών διατάξεων για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Νομική βάση του Κανονισμού υπήρξε, επίσης, το άρθρο 152 παρ. 4 στ. β' της Συνθήκης για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας και απαρτίζεται από τέσσερα κεφάλαια: ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΕΠΙΣΗΜΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΤΩΝ ΚΟΙΝΟΤΙΚΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ, ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΤΕΛΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ. Ο συγκεκριμένος Κανονισμός ορίζει ειδικούς κανόνες για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης (Άρθρο 1), την οργάνωση δηλαδή κάθε μορφής ελέγχου που διενεργεί η αρμόδια για τους κτηνιατρικούς ελέγχους αρχή κράτους μέλους για την εξακρίβωση της συμμόρφωσης με τη νομοθεσία για τα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των κανόνων για την υγεία και την ορθή μεταχείριση των ζώων (Άρθρο 2). Επίσημοι έλεγχοι διενεργούνται επί του νωπού κρέατος (Άρθρο 5), των ζώντων διθύρων μαλακίων (Άρθρο 6), των αλιευτικών προϊόντων (Άρθρο 7), του νωπού γάλατος και των γαλακτοκομικών προϊόντων (Άρθρο 8). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 882/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για τη διενέργεια επίσημων ελέγχων της συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και προς τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων. Νομική βάση για τον Κανονισμό 882/2004 υπήρξαν τα

άρθρα 37, 95 και το άρθρο 152 παρ. 4 στ. β' της Συνθήκης για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας και χωρίζεται σε δέκα τίτλους, οι οποίοι με τη σειρά τους χωρίζονται σε επιμέρους κεφάλαια: *ΤΙΤΛΟΣ I*: ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ, ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ, *ΤΙΤΛΟΣ II*: ΕΠΙΣΗΜΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΑΠΟ ΤΑ ΚΡΑΤΗ ΜΕΛΗ, *ΤΙΤΛΟΣ III*: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ, *ΤΙΤΛΟΣ IV*: ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΗ ΣΥΝΔΡΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, *ΤΙΤΛΟΣ V*: ΣΧΕΔΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ, *ΤΙΤΛΟΣ VI*: ΚΟΙΝΟΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ, *ΤΙΤΛΟΣ VII*: ΜΕΤΡΑ ΕΠΙΒΟΛΗΣ, *ΤΙΤΛΟΣ VIII*: ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΚΟΙΝΟΤΙΚΗΣ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑΣ, *ΤΙΤΛΟΣ IX*: ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ, *ΤΙΤΛΟΣ X*: ΤΕΛΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ. Άρχισε να εφαρμόζεται από την 1η Ιανουαρίου 2006, με εξαίρεση τις διατάξεις για τη χρηματοδότηση των επίσημων ελέγχων (*Άρθρο 27, 28*), οι οποίες άρχισαν να εφαρμόζονται από την 1η Ιανουαρίου 2007 (*Άρθρο 67*). Ο εν λόγω Κανονισμός θεσπίζει γενικούς κανόνες για τη διεξαγωγή επίσημων ελέγχων για να εξακριβώνεται η συμμόρφωση προς τους κανόνες που έχουν ως στόχο, ιδίως την πρόληψη, την εξάλειψη ή τη μείωση σε αποδεκτό επίπεδο, των κινδύνων για τον άνθρωπο και τα ζώα, είτε άμεσα είτε μέσω του περιβάλλοντος, και τη διασφάλιση θεμιτών πρακτικών κατά το εμπόριο ζωοτροφών και τροφίμων και την προστασία των συμφερόντων των καταναλωτών, συμπεριλαμβανομένης της επισήμανσης των ζωοτροφών και των τροφίμων και άλλων μορφών ενημέρωσης των καταναλωτών. Από την άλλη, ο Κανονισμός δεν ισχύει για τους επίσημους ελέγχους που διενεργούνται για την εξακρίβωση της συμμόρφωσης προς τους κανόνες για τις κοινές οργανώσεις των αγορών γεωργικών προϊόντων (*Άρθρο 1*). Η διασφάλιση της τακτικής πραγματοποίησης των επίσημων ελέγχων βάσει των κινδύνων και με την κατάλληλη συχνότητα είναι υποχρέωση των κρατών μελών (*Άρθρο 3*), τα οποία ορίζουν τις αρμόδιες αρχές οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σκοπό αυτό (*Άρθρο 4*). Οι μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο επίσημων ελέγχων πρέπει να είναι σύμφωνες με τους οικείους κοινοτικούς κανόνες, ή ελλείψει αυτών, με διεθνώς αναγνωρισμένους κανόνες ή πρωτόκολλα, ιδίως δε με εκείνους που έχει αποδεχθεί η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (CEN), ή με εκείνους που περιέχονται στην εθνική νομοθεσία, ή ελλείψει αυτών, με άλλες μεθόδους που είναι κατάλληλες για τον επιδιωκόμενο σκοπό ή που έχουν αναπτυχθεί

σύμφωνα με επιστημονικά πρωτόκολλα (Άρθρο 11). Ακόμη, τα κράτη μέλη είναι εκείνα που εξασφαλίζουν τη χρηματοδότηση των επίσημων ελέγχων (Άρθρο 26). Κατ' εφαρμογή του Κανονισμού 882/2004, τα κράτη μέλη καταρτίζουν ολοκληρωμένο πολυετές εθνικό σχέδιο ελέγχου προκειμένου να εξασφαλιστούν η υγεία και η καλή διαβίωση των ζώων (Άρθρο 41). Από την άλλη, εμπειρογνώμονες της Επιτροπής διεξάγουν γενικές και ειδικές εξετάσεις στα κράτη μέλη (Άρθρο 45) και επίσημους ελέγχους σε τρίτες χώρες προκειμένου να επαληθεύουν τη συμμόρφωση ή την ισοδυναμία της νομοθεσίας και των συστημάτων των τρίτων χωρών με την κοινοτική νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και με την κοινοτική νομοθεσία για την υγεία των ζώων (Άρθρο 46) (Dwinger et al., 2007):

Οδηγία 2004/41/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 21ης Απριλίου 2004 για την κατάργηση ορισμένων οδηγιών σχετικών με την υγιεινή των τροφίμων και τους υγειονομικούς όρους για την παραγωγή και διάθεση στην αγορά ορισμένων προϊόντων ζωικής προέλευσης που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και για την τροποποίηση των οδηγιών του Συμβουλίου 89/662/ΕΟΚ και 92/118/ΕΟΚ και της απόφασης 95/408/ΕΚ του Συμβουλίου. Στα πλαίσια της εναρμόνισης του ευρωπαϊκού δικαίου τροφίμων η Οδηγία 2004/41 ήρθε να καταργήσει και να τροποποιήσει μια σειρά προγενέστερων Οδηγιών. Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις αναγκαίες νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις για να συμμορφωθούν με τη συγκεκριμένη Οδηγία έως την ημερομηνία εφαρμογής των Κανονισμών 852/2004, 853/2004, 854/2004 (20 Μαΐου 2004) (Dwinger et al., 2007).

4.3 Ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις

Ο όρος «ενδονοσοκομειακός» χρησιμοποιείται για κάθε νόσημα που αποκτάται από ασθενή υπό ιατρική περίθαλψη. Πρόκειται για μια λοίμωξη που αποκτάται από τον ασθενή κατά τη διάρκεια της παραμονής του στο νοσοκομείο. Πρόσφατα, ένας νέος όρος, οι «λοιμώξεις που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη» χρησιμοποιείται για το είδος των λοιμώξεων που προκαλούνται από την παρατεταμένη παραμονή στο νοσοκομείο και αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για σοβαρά προβλήματα υγείας που οδηγούν στο θάνατο [2]. Περίπου το 75% της επιβάρυνσης από αυτές τις

λοιμώξεις παρατηρείται στις αναπτυσσόμενες χώρες. Ασυμπτωματικοί ασθενείς μπορούν να θεωρηθούν μολυσμένοι εάν οι παθογόνοι αυτοί παράγοντες βρεθούν στα σωματικά υγρά ή σε αποστειρωμένο σημείο του σώματος, όπως το αίμα ή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Οι λοιμώξεις που αποκτώνται από το προσωπικό του νοσοκομείου, τους επισκέπτες ή άλλο προσωπικό υγειονομικής περίθαλψης μπορούν επίσης να θεωρηθούν ως ενδονοσοκομειακές (Khan et al., 2015).

Η ικανότητα του *E. faecium* να ανταλλάσσει κινητά γενετικά στοιχεία που φέρουν γονίδια αντιμικροβιακής αντοχής και καθοριστικούς παράγοντες ιογένεσης έχει οδηγήσει σε κλώνους προσαρμοσμένους στα νοσοκομεία. Το Esp ήταν το πρώτο προσαρμοστικό στοιχείο που βρέθηκε σε νοσοκομειακά στελέχη του *E. faecium*. Το γονίδιο Esp του *E. faecium* έχει συνδεθεί με το σχηματισμό βιοφίλμ, την ουρολοίμωξη και την ενδοκαρδίτιδα. Νέοι καθοριστικοί παράγοντες έχουν πλέον συνδεθεί με νοσοκομειακά απομονωμένα στελέχη του *E. Faecium* (Van Schaik et al., 2010).

Μια μελέτη γονιδιωματικής ανάλυσης νοσοκομειακών στελεχών *E. faecium* εντόπισε κέρδος και απώλεια ομάδων γονιδίων σε κλινικές και μη κλινικές απομονώσεις του *E. faecium* (Kim & Marco, 2013). Γονιδιωματικές μελέτες νοσοκομειακής λοίμωξης από *E. faecium* επιβεβαίωσαν τη μετάδοση του *E. faecium* Clad A115. Πρόσφατα διαπιστώθηκε σημαντική παρουσία νοσοκομειακών σειρών VRE fm στα λύματα και ανάγκη ελέγχου της διάδοσης του VRE fm που σχετίζεται με την υγειονομική περίθαλψη. Ωστόσο, μελέτες σχετικά με τους οικοτύπους του *E. faecalis* δεν έχουν δείξει την εμφάνιση διακριτών στελεχών *E. faecalis* για σημαντικό χρονικό διάστημα (Gouliouris et al., 2019).

Σε απομονωμένα στελέχη του *E. faecalis* εντοπίζονται παράγοντες ιογένεσης, όπως η αντοχή στα αντιβιοτικά και γονίδια ιογένεσης, ιδίως γονίδια πολυσακχαριτών κάψουλας και γονίδια που καθορίζουν τη ζελατινάση, τον παράγοντα συσσωμάτωσης, την κυτταρολυσίνη και το ace. Η μη εμφάνιση διακριτών οικοτύπων του *E. faecalis* και η πολλαπλότητα στενά συνδεδεμένων οικοτύπων δεν παρατηρείται στον *E. faecalis* σε σύγκριση με τον *E. faecium*. Μια γονιδιωματική ανάλυση 168 νοσοκομειακών απομονωμένων στελεχών *E. faecalis* έδειξε ότι δεν υπάρχουν γονίδια και μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου στις τρεις γενεαλογικές

γραμμές των νοσοκομειακών στελεχών. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε επίσης ότι η απόκτηση κινητών γενετικών στοιχείων στο *E. faecalis* V583, το καθιστά ανίκανο να συνυπάρξει με τους κοινόχρηστους εντερόκοκκους στον άνθρωπο (Raven et al., 2016; Gouliouris et al., 2019).

Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις από εντερόκοκκους είναι ουρολοίμωξη, ενδοκαρδίτιδα, βακτηραιμία, λοιμώξεις που σχετίζονται με καθετήρες, λοιμώξεις τραυμάτων, ενδοκοιλιακές και πνευλικές λοιμώξεις και πρόσφατα έχουν αναφερθεί ακόμη και στοματικές λοιμώξεις (Raven et al., 2016).

Οι εντερόκοκκοι προκαλούν τόσο μη επιπλεγμένες όσο και επιπλεγμένες ουρολοιμώξεις που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη. Το ανθεκτικό στη βανκομυκίνη *E. faecalis* και το ανθεκτικό στη βανκομυκίνη *E. faecium* ενοχοποιούνται κυρίως για τις εντεροκοκκικές ουρολοιμώξεις. Ο VRE εξελίσσεται γρήγορα σε σημαντική αιτία ουρολοίμωξης που σχετίζεται με την υγειονομική περίθαλψη. Η θεραπεία της ουρολοίμωξης περιλαμβάνει τη χρήση αντιβιοτικών ευρέος φάσματος, η οποία αποτελεί σημαντική αιτία ανθεκτικών στελεχών στη βανκομυκίνη (VRE). Οι επιπλοκές κυμαίνονται από μη επιπλεγμένη κυστίτιδα, πνευμονοφρίτιδα, περινεφρικό απόστημα και προστατίτιδα. Αυτοί οι οργανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη νοσοκομειακή λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος ιδίως σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Οι εντερόκοκκοι έχουν αναφερθεί ιδιαίτερα σε λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος που σχετίζονται με καθετήρες, CAUTI (28,4%) (Raven et al., 2016).

Τα είδη εντερόκοκκων είναι ικανά να παράγουν βιοϋμένια, τα οποία είναι ένας πληθυσμός κυττάρων που προσκολλώνται αμετάκλητα σε διάφορες βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες. Οι CAUTI σχετίζονται με βιοϋμένια πολλών ειδών. Τα βιοϋμένια είναι δύσκολο να απομακρυνθούν και οδηγούν σε πολλές χρόνιες λοιμώξεις. Τα βακτήρια στα βιοϋμένια αποικίζουν ιατρικές συσκευές όπως καθετήρες, βηματοδότες, προσθετικές καρδιακές βαλβίδες και ορθοπεδικές συσκευές. Αυτά τα βιοϋμένια πολλαπλών ειδών έχουν συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές επιδράσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των ειδών. Πολλές μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση εντερόκοκκων που παράγουν βιοφίλμ και ουροκαθετήρα (Akhter et al., 2014; Galvan et al., 2016).

Τα βιοϋμένια εντερόκοκκων που σχηματίζονται στον καθετήρα σε CAUTI είναι ανθεκτικά στην ανοσοκαθαριστική διαδικασία, στη δύναμη ούρησης και ακόμη και στα αντιβιοτικά. Αυτοί οι εντερόκοκκοι χρησιμοποιούν το ινωδογόνο που σχηματίζεται στην επιφάνεια του καθετήρα και σχηματίζουν ανθεκτικά βιοφίλμ. Η προσκόλληση του *E. faecalis* στο σχηματισμό βιοφίλμ που παρατηρείται in vitro αναστέλλεται εν μέρει από ουροπαθογόνο *E. coli* (UPEC), αλλά ο σχηματισμός βιοφίλμ από *K. pneumoniae* ή UPEC δεν επηρεάζεται από τον *E. faecalis*, αλλά ο *E. faecalis* αύξησε την *E. coli* τη συσσώρευση μάζας βιοφίλμ και έχει παρατηρηθεί ότι η συγκαλλιέργεια ενός προβιοτικού στελέχους *E. faecium* με εντεροπαθογόνο *E. coli* αύξησε την ευαισθησία του *E. coli* στα αντιβιοτικά σε αμινογλυκοσίδες, Β-λακτάμες και κινολόνες (Akhter et al., 2014; Galvan et al., 2016).

Ο σχηματισμός βιοφίλμ προσδίδει στον οργανισμό αντοχή στη φαγοκυττάρωση και στους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η UTI από τον *E. faecalis* διαμεσολαβείται από παράγοντες virulence των γονιδίων *esp.*, *srtC*, *ebp A*, *ebpC*, *ace*, *epaB*, *msrA*, *msr B*, *sigV*, *efbA* και *grvR/etaR*. Το *E. faecium* εμφανίζει επίσης παρόμοια γονίδια που σχετίζονται με την ιωτικότητα. Τόσο το *E. faecalis* όσο και το *E. faecium* που απομονώνονται από νοσοκομειακές ουρολοιμώξεις παρουσιάζουν τροπισμό των νεφρών. Είναι σημαντικό να μελετηθούν οι παράγοντες στον εντερόκοκκο που προκαλεί πυελονεφρίτιδα (Akhter et al., 2014; Galvan et al., 2016).

Υπάρχει υψηλός επιπολασμός λοιμώξεων της κυκλοφορίας του αίματος που προκαλούνται από θετικά κατά Gram βακτήρια και το 45% προκαλείται από εντερόκοκκους. Η βακτηριαιμία αποτελεί συχνή εκδήλωση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων. Λόγω της χρήσης ενδοαγγειακών και ουροκαθετήρων αποκτώνται αυτές οι νοσοκομειακές λοιμώξεις. Το *E. faecium* στην κυκλοφορία του αίματος σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα λόγω των υψηλών επιπέδων ανθεκτικότητας. Οι παράγοντες κινδύνου που έχουν ταυτοποιηθεί με τη βακτηριαιμία VRE περιλαμβάνουν εντερικό αποικισμό, μακροχρόνια χρήση αντιβιοτικών, σοβαρότητα της νόσου, μεταμόσχευση μυελού των οστών, αιματολογική κακοήθεια, ενδοαγγειακούς ουροκαθετήρες, θεραπεία με κορτικοστεροειδή, χημειοθεραπεία και παρεντερική διατροφή (Akhter et al., 2014; Galvan et al., 2016).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η βακτηριαμία που προκαλείται από ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη εντερόκοκκων φέρει υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας (2,5 φορές μεγαλύτερη) σε σύγκριση με τη βακτηριαμία που προκαλείται από ευαίσθητα στη βανκομυκίνη στελέχη. Σε μια τέτοια μελέτη η πρόγνωση της βακτηριαμίας από VRE δεν άλλαξε πολύ ακόμη και με τη διαθεσιμότητα αντιμικροβιακών παραγόντων με μεγαλύτερη δραστικότητα. Ο παράγοντας Sigma Sig V του *E. faecalis* που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων σε απόκριση σε συνθήκες στρες έχει ενοχοποιηθεί για την επιβίωση και τον αποικισμό των εντερόκοκκων σε συστηματική λοίμωξη. Η απουσία του Sig V σε συστηματική λοίμωξη σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της βακτηριακής μετατόπισης μειώνοντας τον αποικισμό των νεφρών και του ήπατος. Παράγοντες ιογένεσης όπως οι Bgs A και Bgs B έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για τον αποικισμό ενδοκαρδιακών βλαβών και βακτηριαμίας. Οι BgsA και Bgs B χρησιμοποιούνται τώρα για τη θεραπεία εντεροκοκκικών λοιμώξεων με τη χρήση τους ως φαρμακευτικών στόχων (Akhter et al., 2014; Galvan et al., 2016).

Ομοίως, το γονίδιο *Asr* έχει εμπλακεί στην παθογένεια του *E. faecium* σε συστηματικές λοιμώξεις. Νοσοκομειακή εντεροκοκκική βακτηριαμία έχει συνδεθεί με ουροκαθετήρες, ενδοκοιλιακές, εγκαυματικές πληγές, πνευλικές, χοληφόρες και οστικές πηγές. Η βακτηριαμία VRE έχει ως αποτέλεσμα 2,5 φορές μεγαλύτερη θνησιμότητα σε σύγκριση με την ευαίσθητη στη βανκομυκίνη (VSE) βακτηριαμία (O'Driscoll & Crank, 2015).

Οι εντερόκοκκοι είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας. Η ενδοκαρδίτιδα που προκαλείται από VRE *faecalis* προκαλεί γαστρεντερικούς ή γαστρεντερικούς χειρισμούς, λοιμώξεις της μιτροειδούς ή της αορτικής βαλβίδας, μεταμόσχευση ήπατος, ενώ η ενδοκαρδίτιδα από VRE *faecium* συνδέεται με λοίμωξη της τριγλώχινας βαλβίδας. Το *E. faecalis* σχετίζεται επίσης με ενδοκαρδίτιδα που αποκτάται στην κοινότητα. Τα χαρακτηριστικά σημεία της λοίμωξης περιλαμβάνουν πυρετό ή νέο φύσημα. Τα τυπικά στίγματα της ενδοκαρδίτιδας όπως πετέχειες, κηλίδες Osler είναι σπάνια και εμφανίζονται με υποξεία λοίμωξη. Η ουρογεννητική λοίμωξη ή η τοποθέτηση οργάνων συχνά προηγείται της εμφάνισης εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας. Σε δημοσιευμένες σειρές εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας οι άνδρες είναι συχνά περισσότεροι από τις γυναίκες και ως επί το πλείστον

εμφανίζεται σε ηλικιωμένα άτομα. Με τα σημερινά θεραπευτικά σχήματα, το ποσοστό θνησιμότητας της εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας παραμένει γύρω στο 20% (O'Driscoll & Crank, 2015).

Ο VRE έχει απομονωθεί από ενδοκοιλιακές και πτυελικές λοιμώξεις. Οι συνήθεις λοιμώξεις περιλαμβάνουν αποστήματα πλεγές ή περιτονίτιδα. Συχνά αποτελεί μέρος πολυμικροβιακής λοίμωξης με αρνητικούς κατά Gram ή αναερόβιους οργανισμούς. Συνήθως τα μολυσματικά στελέχη προέρχονται από την εντερική χλωρίδα των ασθενών και προκαλούν ενδοκοιλιακή λοίμωξη. Οι εντερόκοκκοι είναι σε θέση να προκαλέσουν μονομικροβιακές λοιμώξεις περιτονίτιδας ιδίως σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χρόνια περιτοναϊκή κάθαρση ή κίρρωση του ήπατος (O'Driscoll & Crank, 2015).

Οι εντεροκοκκικές λοιμώξεις που σχετίζονται με το γαστρεντερικό σύστημα είναι ευκαιριακές λοιμώξεις που συμβαίνουν ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων του παχέος εντέρου και του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ο προ-αποικισμός με VRE σε ασθενείς μπορεί να οδηγήσει σε βακτηριαμία μετά από διαταραχή της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου που προκαλείται από αντιβιοτικά. Η Reg Illy, μια λεκτίνη τύπου c εκκρίνεται από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα rapeth που απομακρύνει τα θετικά κατά Gram βακτήρια από το έντερο. Η θεραπεία με αντιβιοτικά προκαλεί υπορύθμιση της Reg Illy (Kommineni et al., 2015). Έχουν επινοηθεί θεραπευτικές στρατηγικές για την πρόληψη του εντερικού αποικισμού των ανθεκτικών εντερόκοκκων, εισάγοντας προβιοτικά *E. faecalis* φερομόνη που προκαλεί θανάτωση των ανθεκτικών στα φάρμακα *E. faecalis* επαναδραστηριοποιώντας τη Reg Illy εισάγοντας υποχρεωτικά αναερόβια κοινά βακτήρια που περιέχουν είδη *Barnesiella* τα οποία αποτρέπουν τον εντερικό αποικισμό και τη βακτηριαμία του *E. faecium* (Ubeda et al., 2013).

Στελέχη *E. faecalis* με υψηλή παραγωγή κολλαγενάσης έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με διαρροή αναστομωτικού υλικού στο παχύ έντερο μέσω της ενεργοποίησης της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 της ιστικής μήτρας που διασπά την εξωκυτταρική μήτρα του ξενιστή. Οι εντερόκοκκοι παράγουν μενακινόνη και εξωκυτταρικό υπεροξειδίο στο έντερο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα υψηλό οξειδωτικό στρες το οποίο συνδέεται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου ως υψηλή γονιδιωματική αστάθεια των εντερικών καρκινικών κυττάρων, καθώς

περίπου το 80% των καρκίνων του παχέος εντέρου προκαλούνται λόγω γενετικών μεταλλάξεων (Shogan et al., 2015).

Αν και λοιμώξεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) έχουν αναφερθεί σπάνια με VRE, αλλά συμβαίνουν σε ηλικιωμένους ασθενείς που έχουν υποκείμενα προβλήματα υγείας όπως κακοήθειες, πνευμονικές και καρδιακές επιπλοκές. Σε αυτούς ο VRE faecium αναφέρεται σε ποσοστό 82% και λιγότερο ο VRE faecalis. Αυτές οι λοιμώξεις παρουσιάζονται με πυρετό, ψυχικό αποπροσανατολισμό, εστιακά ελλείμματα του ΚΝΣ και πετεχειώδες εξάνθημα. Οι εξετάσεις του Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού (ΕΝΥ) δείχνουν πλειοκυττάρωση, χαμηλή γλυκόζη και αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών (Wang et al., 2014).

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν μέρος των πολυμικροβιακών λοιμώξεων οι οποίες βρέθηκαν να σχετίζονται με SSSE. Οι εντερόκοκκοι απομονώνονται συχνά από έλκη διαβητικών ποδιών και σε ποσοστό 2-5% των ασθενών που υποβάλλονται σε ενδονοσοκομειακή χειρουργική επέμβαση. Σε μελέτες με τη χρήση ζωικών μοντέλων έχει διαπιστωθεί ότι ο καψικός πολυσακχαρίτης του *E. faecalis* σε SSSI κατά κύριο λόγο σχετίζεται με την εμμονή του οργανισμού. Ένα γονίδιο *crpI* κωδικοποιεί τον υδατάνθρακα για τον καψικό πολυσακχαρίτη (Arrias & Murray, 2015).

Οι εντερόκοκκοι είναι κάτοικοι της στοματικής κοιλότητας και ως ευκαιριακά παθογόνα προκαλούν νόσους του στόματος όπως τερηδόνα, ενδοδοντικές λοιμώξεις, περιοδοντίτιδα και περιεμφυτευματίτιδα. Στις ενδοδοντικές λοιμώξεις η αποτυχία της θεραπείας των ριζικών σωλήνων από ενδοδοντικές λοιμώξεις είναι πλέον καλά αποδεδειγμένη. Οι εντερόκοκκοι έχουν υψηλή αντοχή στα ενδοδοντικά φάρμακα και σχηματίζουν ανθεκτικά βιοφίλμ. Αυτό ενοχοποιείται για την αποτυχία της θεραπείας των ριζικών σωλήνων (Arrias & Murray, 2015).

Ο επιπολασμός των εντερόκοκκων παρατηρείται επίσης στην ουλίτιδα και την περιοδοντίτιδα (3,7-35%). Οι εντερόκοκκοι του στόματος αποτελούν το υψηλότερο ποσοστό ιογόνων γονιδίων και ικανότητας σχηματισμού ανθεκτικών βιοϋμενίων. Συνεπώς, η στοματική κοιλότητα μπορεί να αποτελεί σημαντική δεξαμενή ιογόνων στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά εντερόκοκκων.

Ο αποικισμός VRE συμβαίνει κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα, το δέρμα, το ουρογεννητικό σύστημα και τη στοματική κοιλότητα. Οι εντερόκοκκοι μπορούν να παραμείνουν από μήνες έως χρόνια. Τα χέρια των εργαζομένων στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης αποτελούν την πιο κοινή πηγή μετάδοσης στις νοσοκομειακές λοιμώξεις (Arrias & Murray, 2015).

Η ανάγκη στοματικής φροντίδας είναι ιδιαίτερα σημαντική στις νοσοκομειακές ρυθμίσεις. Η εξάπλωση των νοσοκομειακών VRE λαμβάνει χώρα και όταν η ανοσία είναι μειωμένη οι VRE πολλαπλασιάζονται για να προκαλέσουν νόσο. Λίγες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά εντερόκοκκοι μεταδίδονται με τα τρόφιμα, αλλά πρόσφατα έχει υποστηριχτεί ότι δεν υπάρχει μετάδοση των εντερόκοκκων που σχετίζεται με τα τρόφιμα. Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν πλέον υψηλό βαθμό ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, τη χλωραμφενικόλη, την ερυθρομυκίνη εκτός από τη βανκομυκίνη αποτελούν απειλή για την εξάπλωση της νοσοκομειακής λοίμωξης ιδίως σε ασθενείς των ΜΕΘ και σε ασθενείς με μηχανικό αναπνευστήρα. Η ανοχή στη βανκομυκίνη αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για τη συνολική αύξηση του νοσοκομειακού κόστους για τον ασθενή αλλά και για το κάθε νοσοκομείο (Puchter et al., 2018).

4.4 Τρόποι αντιμετώπισης

Οι κατευθυντήριες γραμμές για την αποστείρωση και την απολύμανση των επεμβατικών συσκευών και των ιατρικών εργαλείων που χρησιμοποιούνται για χειρουργικές επεμβάσεις αναπτύχθηκαν και ενημερώνονται συνεχώς, καθώς τα ποσοστά των λοιμώξεων τείνουν να αυξάνονται. Επιπλέον, το 2009 εκπονήθηκαν επίσης κατευθυντήριες γραμμές για την πρόληψη των ουρολοιμώξεων που σχετίζονται με καθετήρες (Cole et al., 2015).

Η έλλειψη συμμόρφωσης με τις κατευθυντήριες γραμμές, οδηγεί στη μετάδοση νοσοκομειακών λοιμώξεων. Το CDC παρέχει τη μεθοδολογία για την επιτήρηση των νοσοκομειακών λοιμώξεων μαζί με τη διερεύνηση των μεγάλων κρουσμάτων. Έχουν αναπτυχθεί κατευθυντήριες γραμμές για την πρόληψη και τον έλεγχο των λοιμώξεων, αλλά η εφαρμογή τους δεν είναι

ακόμη πολύ γνωστή. Η εκπαίδευση των επαγγελματιών του τομέα της υγειονομικής περίθαλψης, ιδίως των νοσηλευτών, είναι εξαιρετικά σημαντική για τον έλεγχο και την πρόληψη των λοιμώξεων. Παρόλα αυτά, υπάρχει μεγάλο χάσμα μεταξύ της ύπαρξης κατευθυντήριων γραμμών και της πραγματικής εφαρμογής τους (Cole et al., 2015).

Η επιτήρηση μπορεί να ερμηνευθεί ως "η συνεχής, συστηματική συλλογή, ανάλυση και ερμηνεία δεδομένων υγείας που είναι απαραίτητα για τον σχεδιασμό, την εφαρμογή και την αξιολόγηση της πρακτικής της δημόσιας υγείας, στενά συνδεδεμένη με την έγκαιρη διάδοση των δεδομένων αυτών σε όσους πρέπει να γνωρίζουν". Ως μέρος του προγράμματος ελέγχου των λοιμώξεων, η επιτήρηση υποχρεώνει τα δεδομένα που σχετίζονται με τα μολυσμένα άτομα με τις περιοχές μόλυνσης τους. Τα νοσοκομεία μπορούν να εργαστούν με βάση αυτά τα δεδομένα για τον έλεγχο των λοιμώξεων αξιολογώντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Μέσω αυτής της επιτήρησης τα νοσοκομεία μπορούν να καταστρώσουν μια στρατηγική που περιλαμβάνει πρακτικές ελέγχου των λοιμώξεων (Cole et al., 2015).

Όπως προαναφέρθηκε, τα εντεροκοκκικά είδη μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες λοιμώξεις, όπως λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, βακτηριαιμία, ενδοκαρδίτιδα και μηνιγγίτιδα.

Οι λοιμώξεις που οφείλονται στον *E. faecalis* τείνουν να είναι πιο ιογενείς από τις λοιμώξεις που οφείλονται στον *E. faecium*. Επιπλέον, η βακτηριαιμία που οφείλεται σε *E. faecalis* είναι πιθανότερο να σχετίζεται με ενδοκαρδίτιδα από ό,τι η βακτηριαιμία που οφείλεται σε *E. faecium*. Οι κλινικές απομονώσεις του *E. faecalis* τείνουν να είναι σημαντικά πιο ευαίσθητες στους παράγοντες β-λακτάμης από ό,τι οι κλινικές απομονώσεις του *E. faecium*. Οι απομονώσεις του *E. faecalis* είναι συνήθως ευαίσθητες στην αμπικιλίνη αλλά ανθεκτικές στην κινουπριστίνη-δαλφοπριστίνη, ενώ οι περισσότερες απομονώσεις του *E. faecium* είναι ανθεκτικές στην αμπικιλίνη (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ≥ 16 mcg/mL), αλλά ευαίσθητες στην κινουπριστίνη-δαλφοπριστίνη (Baddour et al., 2015).

Οι εντερόκοκκοι είναι σχετικά ανθεκτικοί στην πενικιλίνη και την αμπικιλίνη (σε σύγκριση με τους περισσότερους στρεπτόκοκκους)- ακόμη και όταν αυτοί οι παράγοντες που δρουν στο κυτταρικό τοίχωμα αναστέλλουν τους εντερόκοκκους, συχνά δεν τους σκοτώνουν- η βανκομυκίνη είναι ακόμη

λιγότερο βακτηριοκτόνος. Τα κλινικά απομονωμένα στελέχη του *E. faecium* είναι πιο ανθεκτικά στην πενικιλίνη από ότι ο *E. faecalis* (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για το 90 % των στελεχών [MIC₉₀] >16 mg/ml έναντι 2 έως 4 mcg/ml, αντίστοιχα)- οι MIC της αμπικιλίνης είναι συνήθως κατά 1 αραιώση χαμηλότερες από εκείνες της πενικιλίνης. Η δραστηριότητα της πιπερακιλλίνης είναι παρόμοια με εκείνη της πενικιλίνης και η ιμιπενέμη είναι γενικά δραστική έναντι της ευαίσθητης στην πενικιλίνη *E. faecalis*. Στους παράγοντες με δραστικό κυτταρικό τοίχωμα με περιορισμένη ή καθόλου δραστηριότητα έναντι των εντερόκοκκων περιλαμβάνονται η ναφκιλλίνη, η οξακιλλίνη, η τικαρκιλλίνη, η ερταπενέμη, οι περισσότερες κεφαλοσπορίνες και η αζτρεονάμη (Baddour et al., 2015).

Οι εντερόκοκκοι είναι επίσης σχετικά αδιαπέραστοι στις αμινογλυκοσίδες και οι συγκεντρώσεις αμινογλυκοσίδων στον ορό που απαιτούνται για βακτηριοκτόνο δράση είναι πολύ υψηλότερες από αυτές που μπορούν να επιτευχθούν με ασφάλεια στον άνθρωπο. Ωστόσο, η ταυτόχρονη χρήση ενός παράγοντα που δρα στα κυτταρικά τοιχώματα αυξάνει τη διαπερατότητα του κυττάρου έτσι ώστε να μπορεί να επιτευχθεί ενδοκυτταρική βακτηριοκτόνος συγκέντρωση αμινογλυκοσίδων. Η βακτηριοκτόνος αντιμικροβιακή δράση δικαιολογείται σε κλινικές περιπτώσεις απειλητικής για τη ζωή λοίμωξης (Baddour et al., 2015).

Τα απομονωμένα εντερόκοκκα συνήθως ελέγχονται για ευαισθησία στην αμπικιλίνη, την πενικιλίνη και τη βανκομυκίνη. Η παρουσία β-λακταμάσης είναι πολύ σπάνια- προσδίδει αντοχή στην πενικιλίνη και την αμπικιλίνη όταν υπάρχει μεγάλος αριθμός οργανισμών, παρόλο που ο οργανισμός μπορεί να είναι ευαίσθητος με τη χρήση τυποποιημένων εργαστηριακών εμβολίων. Έτσι, για να αποκλειστεί αυτή η πιθανότητα σε ασθενείς με απειλητική για τη ζωή εντεροκοκκική λοίμωξη (όπως μηνιγγίτιδα ή ενδοκαρδίτιδα), ορισμένοι ειδικοί συνιστούν να ελέγχεται το απομονωμένο άτομο για παραγωγή β-λακταμάσης με νιτροκεφίνη, μια χρωμογόνο κεφαλοσπορίνη, ακόμη και αν είναι ευαίσθητο στην αμπικιλίνη. Υπάρχουν επίσης σπάνιες αναφορές για απομονωμένα στελέχη *E. faecalis* με μεγαλύτερη αντοχή στην πενικιλίνη ή/και στην ιμιπενέμη, τα οποία διατηρούν την ευαισθησία στην αμπικιλίνη (αν και με υψηλότερες από τις συνήθειες MIC) (Conceicao et al., 2014).

Όλοι οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη και την αμπικιλίνη, καθώς και υψηλού επιπέδου αντοχή στις περισσότερες κεφαλοσπορίνες και σε όλες τις ημισυνθετικές πενικιλίνες, ως αποτέλεσμα της έκφρασης πρωτεϊνών που δεσμεύουν πενικιλίνη χαμηλής συγγένειας. Για πολλά στελέχη, το επίπεδο αντοχής τους στην αμπικιλίνη δεν αποκλείει την κλινική χρήση του παράγοντα αυτού.

Στην πραγματικότητα, η αμπικιλίνη παραμένει η θεραπεία επιλογής για εντεροκοκκικές λοιμώξεις που δεν διαθέτουν άλλους μηχανισμούς για υψηλού επιπέδου αντοχή. Οι εντερόκοκκοι είναι επίσης εγγενώς ανθεκτικοί στην κλινδαμυκίνη, η οποία διαμεσολαβείται από το προϊόν του γονιδίου *lsa*, αν και ο μηχανισμός παραμένει ελάχιστα καθορισμένος. Η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη φαίνεται να είναι δραστική έναντι των εντερόκοκκων όταν δοκιμάζεται *in vitro* σε μέσα με έλλειψη φυλλικού οξέος, αλλά αποτυγχάνει σε ζωικά μοντέλα, πιθανώς επειδή οι εντερόκοκκοι μπορούν να απορροφήσουν φυλλικό οξύ από το περιβάλλον. Οι εντερόκοκκοι έχουν επίσης εγγενή αντοχή στις κλινικά εφικτές συγκεντρώσεις αμινογλυκοσιδών, γεγονός που αποκλείει τη χρήση τους ως μεμονωμένων παραγόντων. Αν και ο *E. faecalis* είναι φυσικά ανθεκτικός στην κινουπριστίνη-νταλφοπριστίνη, ο συνδυασμός αυτός είναι ιδιαίτερα δραστικός έναντι στελεχών *E. faecium* που δεν διαθέτουν ειδικούς προσδιοριστές αντοχής.

Η θεραπεία των εντεροκοκκικών λοιμώξεων έχει καταστεί ένα από τα πιο δύσκολα ζητήματα που αντιμετωπίζουν οι κλινικοί γιατροί τον 21^ο αιώνα. Η αυξημένη επικράτηση στελεχών που είναι ανθεκτικά σε όλα σχεδόν τα αντιβιοτικά με *in vitro* βακτηριοκτόνο δράση έναντι των εντερόκοκκων αποτελεί ανησυχητική τάση. Πράγματι, μεταξύ των συνηθέστερων εντεροκοκκικών ειδών που απομονώνονται από βαρέως πάσχοντες ασθενείς στις ΗΠΑ, ο *E. faecium* έχει καταστεί ένα από τα επικρατέστερα, καθώς απομονώνεται σχεδόν εξίσου συχνά από κλινικά δείγματα σε ορισμένα νοσοκομεία με τον *E. Faecalis*. Αυτή η τάση στην επιδημιολογία των εντεροκοκκικών λοιμώξεων έχει σημαντικές κλινικές συνέπειες, δεδομένου ότι η αντοχή σε αντιβιοτικά όπως η αμπικιλίνη και η βανκομυκίνη (τα οποία αποτελούσαν παλαιότερα τα αντιβιοτικά ακρογωνιαίο λίθο για τη θεραπεία των εντεροκοκκικών λοιμώξεων) αποτελεί τον «κανόνα» στις σύγχρονες απομονώσεις του *E. faecium* που σχετίζονται με νοσοκομεία.

Αντίθετα, η αντοχή στην αμπικιλλίνη παρατηρείται σπάνια στον *E. faecalis* και η αντοχή στη βανκομυκίνη είναι πολύ λιγότερο συχνή σε αυτό το είδος. Επιπλέον, η Εταιρεία λοιμωδών νοσημάτων της Αμερικής (IDSA) έχει συμπεριλάβει το *E. faecium* μεταξύ των παθογόνων ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Enterobacter spp.*) (Arias & Murray, 2012).

Μία από τις κύριες προκλήσεις στη θεραπεία των σοβαρών εντεροκοκκικών λοιμώξεων είναι ότι οι οργανισμοί αυτοί είναι είτε ανεκτικοί είτε εγγενώς ανθεκτικοί σε μια ποικιλία αντιμικροβιακών παραγόντων. Για παράδειγμα, σε σύγκριση με τους στρεπτόκοκκους, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις πενικιλλίνης (10 έως >100 φορές) από εκείνες που χρησιμοποιούνται κατά των στρεπτόκοκκων για να θανατωθούν οι εντερόκοκκοι *in vitro* (Murray, 2000).

Επιπλέον, οι εντερόκοκκοι είναι συχνά ανεκτικοί στα αντιβιοτικά β-λακτάμης με ελάχιστες βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις (MBC) πενικιλλίνης και αμπικιλλίνης που υπερβαίνουν >32 φορές την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της αντίστοιχης ένωσης β-λακτάμης. Επίσης, οι εντερόκοκκοι διαθέτουν συχνά γονίδια που τους καθιστούν εγγενώς ανθεκτικούς στις ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική. Για παράδειγμα, ο *E. faecium* φέρει ένα ένζυμο ακετυλάση (AAC(6')) που ροκαλεί υψηλότερες MICs σε αρκετές αμινογλυκοσίδες (όπως η τομπραμυκίνη και η αμικασίνη), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συνεργιστικής επίδρασης με τους παράγοντες κυτταρικού τοιχώματος (Arias, Contreras, & Murray, 2008).

Ομοίως, οι περισσότεροι *E. faecalis* περιέχουν ένα γονίδιο (με την ονομασία *lsa*) που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη δέσμευσης ATP, η οποία προσδίδει εγγενή αντίσταση στην κινουπριστίνη/νταλφοριστίνη (Q/D). Αυτά τα θεραπευτικά ζητήματα είχαν σημαντικό αντίκτυπο από τις πρώτες ημέρες της εποχής των αντιβιοτικών (δεκαετία του 1940). Πράγματι, τα ποσοστά ίασης κατά τη θεραπεία της εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας με μονοθεραπεία με πενικιλλίνη ήταν απογοητευτικά (~60%) σε σύγκριση με εκείνα της στρεπτοκοκκικής ενδοκαρδίτιδας και μόνο η προσθήκη μιας αμινογλυκοσίδης αύξησε τον αριθμό των ευνοϊκών αποτελεσμάτων που σχετίζονται με τη θεραπεία σοβαρών εντεροκοκκικών λοιμώξεων (δηλαδή βακτηριαιμία και

ενδοκαρδίτιδα) τόσο σε ευαίσθητους όσο και σε πολυανθεκτικούς (MDR) εντερόκοκκους.

Η πλειονότητα των εντεροκοκκικών λοιμώξεων περιγράφεται σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς για τους οποίους συνήθως απαιτείται θεραπεία. Η κλινική προσέγγιση της θεραπείας των ευαίσθητων έναντι των ανθεκτικών εντερόκοκκων λοιμώξεων διαφέρει σημαντικά. Η πλειονότητα των σύγχρονων "ευαίσθητων" εντεροκοκκικών λοιμώξεων προκαλείται από απομονώσεις του *E. faecalis* που δεν έχουν αντοχή στην αμπικιλίνη (ή πενικιλίνη) και τη βανκομυκίνη και δεν παρουσιάζουν αντοχή υψηλού επιπέδου (HLR) στις αμινογλυκοσίδες.

Παρόλα αυτά, αν και η αντοχή στην αμπικιλίνη εξακολουθεί να είναι ασυνήθιστη σε κλινικές απομονώσεις του *E. faecalis*, η αντοχή υψηλού επιπέδου (HLR) στις αμινογλυκοσίδες έχει γίνει πιο συχνή και η αντοχή στη βανκομυκίνη φαίνεται να αυξάνεται. Από την άλλη πλευρά, οι περισσότερες MDR εντεροκοκκικές λοιμώξεις προκαλούνται από *E. faecium*, στις οποίες τόσο η αμπικιλίνη όσο και η βανκομυκίνη έχουν καταστεί παρωχημένες και τα απομονωμένα στελέχη εμφανίζουν συχνά HLR στις αμινογλυκοσίδες.

Συμπεράσματα

Οι εντερόκοκκοι βρίσκονται σε φυσιολογικές συνθήκες στον γαστρεντερικό σωλήνα (GI) ανθρώπων και ζώων και, ελλείψει αντιβιοτικών, δημιουργούν συμβιωτική σχέση με την ανθρώπινη μικροβιακή χλωρίδα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι εντερόκοκκοι βρίσκονται σε χαμηλούς αριθμούς στο παχύ έντερο, σε σύγκριση με άλλα μέλη της εντερικής χλωρίδας.

Οι τροφιμογενείς νόσοι έχουν καταστεί μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας παγκοσμίως λόγω της σημαντικά αυξημένης επίπτωσης των τροφιμογενών νόσων τα τελευταία 20 χρόνια. Αν και είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η παγκόσμια επίπτωση των τροφιμογενών ασθενειών, καθώς ορισμένα από τα κρούσματα δεν έχουν αναφερθεί επαρκώς, ιδίως στις

αναπτυσσόμενες χώρες, η αυξημένη επίπτωση των τροφιμογενών ασθενειών παρατηρείται σε πολλά μέρη του κόσμου.

Η «φυσική» ισορροπία στη μικροβιακή χλωρίδα μεταβάλλεται με την παρουσία αντιβιοτικών. Η χορήγηση κεφαλοσπορινών και μετρονιδαζόλης, που χρησιμοποιούνται συχνά ως μέρος μιας εμπειρικής αγωγής σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, σκοτώνει πολλά αρνητικά κατά Gram και αναερόβια βακτήρια στο έντερο, αλλά οι εντερόκοκκοι τείνουν να επιβιώνουν, δεδομένου ότι οι ενώσεις αυτές δεν έχουν ισχυρή δράση εναντίον τους. Επιπλέον, ορισμένες από τις κεφαλοσπορίνες απεκκρίνονται στη χολή, μια φαρμακοκινητική ιδιότητα που αυξάνει τις συγκεντρώσεις αυτής της κατηγορίας αντιβιοτικών στο έντερο, γεγονός που μεγιστοποιεί τη δράση κατά του εντερικού μικροβιόκοσμου και προάγει την επέκταση των εντερόκοκκων, ιδίως των VRE, στον γαστρεντερικό σωλήνα.

Τα VRE έχουν πλέον καταστεί ένα σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς προκαλούν σειρά λοιμώξεων από ουρολοιμώξεις, βακτηριαίμια, λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα, ενδοκοιλιακές και πνευμονικές λοιμώξεις, λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, ακόμη και στοματικές λοιμώξεις. Η ικανότητα των εντερόκοκκων να σχηματίζουν ανθεκτικά βιοφίλμ, να αποικίζουν και να εκφράζουν παράγοντες ιογένεσης, η πλαστικότητα του γονιδιώματος, η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, η ικανότητα επιβίωσης τους καθιστούν ένα σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο για το οποίο πρέπει να επινοηθούν νέες θεραπευτικές στρατηγικές για τη θεραπεία του VRE. Η περιοδική επιτήρηση των VRE στα νοσοκομεία είναι απαραίτητη για τον περιορισμό της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, ενώ η μελλοντική θεραπεία θα πρέπει να στοχεύει στην πρόληψη του αποικισμού VRE σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή.

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι συμβατικές μέθοδοι για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών είναι επιλεκτικές, αλλά μπορεί να είναι χρονοβόρες και επίπονες. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης προκειμένου να ξεπεραστούν οι περιορισμοί των συμβατικών μεθόδων ανίχνευσης. Οι ταχείες μέθοδοι είναι σημαντικές για την ταχεία ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών στα

τρόφιμα, ώστε να προλαμβάνονται οι εστίες τροφιμογενών ασθενειών και η εξάπλωση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών.

Βιβλιογραφία

- Abels, G., Kobusch, A. (2010, Ιούνιος 17-19). *Regulation of Food Safety in the EU: Changing Patterns of Multi-Level Governance* [Conference presentation]. Conference of the ECPR Standing Group on Regulatory Governance, University College Dublin.
- Ahmed, M. O., & Baptiste, K. E. (2018). Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 24(5), 590–606. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0147>
- Akhter, J., Ahmed, S., Saleh, A. A., & Anwar, S. (2014). Antimicrobial resistance and in vitro biofilm-forming ability of Enterococci spp. isolated from urinary tract

- infection in a tertiary care hospital in Dhaka. *Bangladesh Medical Research Council bulletin*, 40(1), 6–9. <https://doi.org/10.3329/bmrcb.v40i1.20320>
- Arias, C. A., Mendes, R. E., Stilwell, M. G., Jones, R. N., & Murray, B. E. (2012). Unmet needs and prospects for oritavancin in the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54 Suppl 3(Suppl 3), S233–S238. <https://doi.org/10.1093/cid/cir924>
- Arias, C.A., & Murray, B.E. (2015). Enterococcus species, Streptococcus gallolyticus group and Leuconostoc species. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Marebel Douglas and Bennetts: Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Saunders; 2015. pp. 2328-2339
- Baddour, L. M., Wilson, W. R., Bayer, A. S., Fowler, V. G., Jr, Tleyjeh, I. M., Rybak, M. J., Barsic, B., Lockhart, P. B., Gewitz, M. H., Levison, M. E., Bolger, A. F., Steckelberg, J. M., Baltimore, R. S., Fink, A. M., O'Gara, P., Taubert, K. A., & American Heart Association Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and Stroke Council (2015). Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*, 132(15), 1435–1486. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000296>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A, Dvorkin, M, Kulikov, A.S, Lesin, V.M ,Nikolenko, S.I, Pham, S., Prjibelski, A.D, Pyshkin, A.V, Sirotkin, A.V, Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A, Pevzner, P.A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J ComputBiol*, 19:455–477.
- Bellais, S., Arthur, M., Dubost, L., Hugonnet, J. E., Gutmann, L., van Heijenoort, J., Legrand, R., Brouard, J. P., Rice, L., & Mainardi, J. L. (2006). Aslfm, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium*. *The Journal of biological chemistry*, 281(17), 11586–11594. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600114200>

- Bhardwaj, A., Malik, R. K., & Chauhan, P. (2008). Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian journal of microbiology*, *48*(3), 317–325. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0041-2>
- Bhavsar, A. P., & Brown, E. D. (2006). Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: how spirals and spaces challenge paradigms. *Molecular microbiology*, *60*(5), 1077–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05169.x>
- Boehm, A. B., & Sassoubre, L. M. (2014). Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination. In M. S. Gilmore (Eds.) et. al., *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Chen, W., Martinez, G., and Mulchandani, A. (2000). Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Anal. Biochem.* *280*, 166–172. doi: 10.1006/abio.2000.4518
- Chow J. W. (2000). Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *31*(2), 586–589. <https://doi.org/10.1086/313949>
- Chung, M. S., Kim, C. M., and Ha, S. D. (2010). Detection and enumeration of microorganisms in ready-to-eat foods, ready-to-cook foods and fresh-cut produce in Korea. *J. Food Safety* *30*, 480–489. doi: 10.1111/j.1745-4565.2010.00221.x
- Cole, K. A., Kenney, R. M., Perri, M. B., Dumkow, L. E., Samuel, L. P., Zervos, M. J., & Davis, S. L. (2015). Outcomes of Aminopenicillin Therapy for Vancomycin-Resistant Enterococcal Urinary Tract Infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *59*(12), 7362–7366. <https://doi.org/10.1128/AAC.01817-15>
- Comodo, N., Bonaccorsi, G., (2007, Μάρτιος). The new EU regulations for food safety. *Italian Journal of Public Health*. doi: 10.2427/5895
- Conceição, N., da Silva, L. E., Darini, A. L., Pitondo-Silva, A., & de Oliveira, A. G. (2014). Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: *pbp4* gene polymorphism and genetic diversity. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *28*, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.018>
- Cooper, L. (2014). Using Fish and Shellfish Quality Assessment Methods. Learner Workbook. Available at the following link: www.seafoodacademy.org

- DebRoy S, Gao P, Garsin DA, et al. Transcriptional and Post Transcriptional Control of Enterococcal Gene Regulation. 2014 Feb 12. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-.
- De Pascale, G., Lloyd, A. J., Schouten, J. A., Gilbey, A. M., Roper, D. I., Dowson, C. G., & Bugg, T. D. (2008). Kinetic characterization of lipid II-Ala:alanyl-tRNA ligase (MurN) from *Streptococcus pneumoniae* using semisynthetic aminoacyl-lipid II substrates. *The Journal of biological chemistry*, 283(50), 34571–34579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805807200>
- Doyle, M.P. & M.C. Ericson, (2006). Closing the door on the faecal coliform assay. 1: 162-163.
- Dwinger, R. H., Golden, T. E., Hatakka, M. and Daelman, W. (2007). The “Hygiene Package” – A New Approach to Food Safety. *International Society for Animal Hygiene*.
- Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*, 67(4), 1628–1635. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001>
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Blanot, D., & Mengin-Lecreulx, D. (2004). The bacA gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *The Journal of biological chemistry*, 279(29), 30106–30113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401701200>
- Eliopoulos, G.M., & Gold, H.S. (2001). Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 33, Issue 2, Pages 210–219, <https://doi.org/10.1086/321815>
- European Parliament. (2000). Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. *Off. J. Eur. Comm*, 262, 21–45.
- Fay, A., & Dworkin, J. (2009). *Bacillus subtilis* homologs of MviN (MurJ), the putative *Escherichia coli* lipid II flippase, are not essential for growth. *Journal of bacteriology*, 191(19), 6020–6028. <https://doi.org/10.1128/JB.00605-09>

- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, *106*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>
- Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., & Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods--a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology*, *88*(2-3), 105–122. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00174-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00174-0)
- Gagetti, P., Bonofiglio, L., García Gabarrot, G., Kaufman, S., Mollerach, M., Vigliarolo, L., von Specht, M., Toresani, I., & Lopardo, H. A. (2019). Resistance to β -lactams in enterococci. *Revista Argentina de microbiologia*, *51*(2), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.007>
- Galván, E. M., Mateyca, C., & Ielpi, L. (2016). Role of interspecies interactions in dual-species biofilms developed in vitro by uropathogens isolated from polymicrobial urinary catheter-associated bacteriuria. *Biofouling*, *32*(9), 1067–1077. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1231300>
- Giraffa G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS microbiology reviews*, *26*(2), 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x>
- Gouliouris, T., Raven, K. E., Moradigaravand, D., Ludden, C., Coll, F., Blane, B., Naydenova, P., Horner, C., Brown, N. M., Corander, J., Limmathurotsakul, D., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2019). Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* hospital-adapted lineages in municipal wastewater treatment plants indicates widespread distribution and release into the environment. *Genome research*, *29*(4), 626–634. <https://doi.org/10.1101/gr.232629.117>
- Ha, S., Walker, D., Shi, Y., & Walker, S. (2000). The 1.9 Å crystal structure of Escherichia coli MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein science: a publication of the Protein Society*, *9*(6), 1045–1052. <https://doi.org/10.1110/ps.9.6.1045>
- Khan, H.A., Ahmad, A., Mehboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *5*(7): 509-514, <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>.
- Kim, E. B., & Marco, M. L. (2014). Nonclinical and clinical *Enterococcus faecium* strains, but not *Enterococcus faecalis* strains, have distinct structural and func-

- tional genomic features. *Applied and environmental microbiology*, 80(1), 154–165. <https://doi.org/10.1128/AEM.03108-13>
- Klare, I., Werner, G., & Witte, W. (2001). Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. *Contributions to microbiology*, 8, 108–122. <https://doi.org/10.1159/000060406>
- Kommineni, S., Brett, D.J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayword, M., Simpson, P., et al. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*. 526: 719-722. DOI: 10.1038/nature15524. PMID: 26479034
- Kumar, B. K., Raghunath, P., Devegowda, D., Deekshit., V. K., Venugopal, M. N., Karunasagar, I., et al. (2011). Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 244–249. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.030
- Lee, N., Kwon, K. Y., Oh, S. K., Chang, H. J., Chun, H. S., and Choi, S. W. (2014). A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korea ready-to-eat food. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 574–580. doi: 10.1089/fpd.2013.1638
- Lloyd, A. J., Gilbey, A. M., Blewett, A. M., De Pascale, G., El Zoeiby, A., Levesque, R. C., Catherwood, A. C., Tomasz, A., Bugg, T. D., Roper, D. I., & Dowson, C. G. (2008). Characterization of tRNA-dependent peptide bond formation by MurM in the synthesis of *Streptococcus pneumoniae* peptidoglycan. *The Journal of biological chemistry*, 283(10), 6402–6417. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708105200>
- Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., and Pal, U. K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *Am. J. Food. Technol.* 6, 87–102. doi: 10.3923/ajft.2011.87.102
- McGowan, L. L., Jackson, C. R., Barrett, J. B., Hiott, L. M., & Fedorka-Cray, P. J. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *Journal of food protection*, 69(12), 2976–2982. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.12.2976>
- Meroueh, S. O., Bencze, K. Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L., & Mobashery, S. (2006). Three-dimensional structure of the bacterial cell wall

- peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4404–4409. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510182103>
- Mladenović, K.G., Grujović, M., Kiš, M. *et al.* Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 8615–8627 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11655-7>
- Murray B. E. (2000). Vancomycin-resistant enterococcal infections. *The New England journal of medicine*, 342(10), 710–721. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003093421007>
- Nagamatsu, K., Hannan, T.J., Guest, R.L., Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., (2015). Dysregulation of Escherichia coli α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(8): E871-880.
- National Library of Medicine, (2013). *Enterococcus*. Available at the following link: <https://www.idimages.org/atlas/organism/?atlasentryID=80&organism=Enterococcus>
- O'Driscoll, T., & Crank, C. W. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and drug resistance*, 8, 217–230. <https://doi.org/10.2147/IDR.S54125>
- Ogier, J. C., & Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus. *International journal of food microbiology*, 126(3), 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017>
- Omurtag, I., Paulsen, P., Hilbert, F., and Smulders, F. J. M. (2013). The risk of transfer of foodborne bacterial hazards in Turkey through the consumption of meat; risk ranking of muscle foods with the potential to transfer *Campylobacter* spp. *Food Security* 5, 117–127. doi: 10.1007/s12571-012-0230-z
- Patel, J. R., Bhagwat, A. A., Sanglay, G. C., and Solomon, M. B. (2006). Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. *Food Microbiol.* 23, 39–46. doi: 10.1016/j.fm.2005.01.011
- Pietta, E., Montealegre, M. C., Roh, J. H., Cocconcelli, P. S., & Murray, B. E. (2014). Enterococcus faecium PBP5-S/R, the missing link between PBP5-S and PBP5-R. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(11), 6978–6981. <https://doi.org/10.1128/AAC.03648-14>

- Popović, N., Dinić, M., Tolinački, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., Djokić, J., Golić, N., & Veljović, K. (2018). New Insight into Biofilm Formation Ability, the Presence of Virulence Genes and Probiotic Potential of *Enterococcus* sp. Dairy Isolates. *Frontiers in microbiology*, *9*, 78. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00078>
- Puchter, L., Chaberny, I. F., Schwab, F., Vonberg, R. P., Bange, F. C., & Ebadi, E. (2018). Economic burden of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial resistance and infection control*, *7*, 1. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0291-z>
- Qin, X., Galloway-Peña, J. R., Sillanpaa, J., Roh, J. H., Nallapareddy, S. R., Chowdhury, S., Bourgoigne, A., Choudhury, T., Muzny, D. M., Buhay, C. J., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Liu, W., Kovar, C., Sodergren, E., Highlander, S., Petrosino, J. F., Worley, K. C., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., ... Murray, B. E. (2012). Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. *BMC microbiology*, *12*, 135. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-135>
- Rajasekaran, P. (2008). Enterobacteriaceae group of organisms in sewage-fed fishes. *Advanced Biotech.*, *8*:12-14.
- Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). Enterococci, from Harmless Bacteria to a Pathogen. *Microorganisms*, *8*(8), 1118. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081118>
- Raven, K. E., Reuter, S., Gouliouris, T., Reynolds, R., Russell, J. E., Brown, N. M., Török, M. E., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2016). Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. *Nature microbiology*, *1*, 15033. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.33>
- Rice, L. B., Carias, L. L., Rudin, S., Hutton, R., Marshall, S., Hassan, M., Josseume, N., Dubost, L., Marie, A., & Arthur, M. (2009). Role of class A penicillin-binding proteins in the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal of bacteriology*, *191*(11), 3649–3656. <https://doi.org/10.1128/JB.01834-08>
- Ruiz N. (2008). Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(40), 15553–15557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808352105>

- Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., et al. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Cont.* 32, 659–664. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.048
- Salamandane, A., Vila-Boa, F., Malfeito-Ferreira, M., & Brito, L. (2021). High Fecal Contamination and High Levels of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Water Consumed in the City of Maputo, Mozambique. *Biology*, 10(6), 558. <https://doi.org/10.3390/biology10060558>
- Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A., & Marre, R. (2000). Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infection and immunity*, 68(10), 6044–6047. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.6044-6047.2000>
- Sapunaric, F., Franssen, C., Stefanic, P., Amoroso, A., Dardenne, O., & Coyette, J. (2003). Redefining the role of psr in beta-lactam resistance and cell autolysis of *Enterococcus hirae*. *Journal of bacteriology*, 185(20), 5925–5935. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.5925-5935.2003>
- Schwarz, F. V., Perreten, V., & Teuber, M. (2001). Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid*, 46(3), 170–187. <https://doi.org/10.1006/plas.2001.1544>
- Shogan, B. D., Belogortseva, N., Luong, P. M., Zaborin, A., Lax, S., Bethel, C., Ward, M., Muldoon, J. P., Singer, M., An, G., Umanskiy, K., Konda, V., Shakhsher, B., Luo, J., Klappers, R., Hancock, L. E., Gilbert, J., Zaborina, O., & Alverdy, J. C. (2015). Collagen degradation and MMP9 activation by *Enterococcus faecalis* contribute to intestinal anastomotic leak. *Science translational medicine*, 7(286), 286ra68. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010658>
- Singh, J., Batish, V. K., and Grover, S. (2009). A molecular beacon-based duplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in milk and milk products. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1195–1201. doi: 10.1089/fpd.2009.0310
- Son, I., Binet, R., Maounounen-Laasri, A., Lin, A., Hammack, T. S., and Kase, J. A. (2014). Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR. *Food Microbiol.* 40, 31–40. doi: 10.1016/j.fm.2013.11.016

- Touhami, A., Jericho, M. H., & Beveridge, T. J. (2004). Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, *186*(11), 3286–3295. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3286-3295.2004>
- Ubeda, C., Bucci, V., Cabal Hero S., Dju Kovic A, Toussaint NC, Equinda M, et al. (2013). Intestinal microbiota containing *Baresiella* species cures vancomycin resistant *E. faecium* colonization. *Infection and Immunity*. *81*: 965-973. DOI: 10.1128/A.01197-12. PMID: 23319552
- Van der Meulen, B. M. J. (2015, Νοέμβριος). Is current EU food safety law geared up for fighting food fraud? *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. doi: 10.1007/s00003-015-0992-2
- van Schaik, W., Top, J., Riley, D. R., Boekhorst, J., Vrijenhoek, J. E., Schapendonk, C. M., Hendrickx, A. P., Nijman, I. J., Bonten, M. J., Tettelin, H., & Willems, R. J. (2010). Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC genomics*, *11*, 239. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-239>
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., and Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.* *28*, 232–254. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.12.004
- Vesić, D., & Kristich, C. J. (2012). MurAA is required for intrinsic cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56*(5), 2443–2451. <https://doi.org/10.1128/AAC.05984-11>
- Vidojević, A., Veljović, K., Begović, J., Filipić, B., Popović, D., Tolinački, M., Miljković, M., Kojić, M., & Golić, N. (2015). Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures?. *Frontiers in microbiology*, *6*, 954. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00954>
- Wang, J. S., Muzevich, K., Edmond, M. B., Bearman, G., & Stevens, M. P. (2014). Central nervous system infections due to vancomycin-resistant enterococci: case series and review of the literature. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, *25*, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.01.009>
- Werner, G., Klare, I., Fleige, C., Geringer, U., Witte, W., Just, H. M., & Ziegler, R. (2012). Vancomycin-resistant vanB-type *Enterococcus faecium* isolates ex-

- pressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. *Antimicrobial resistance and infection control*, 1(1), 21. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-1-21>
- Willems, R. J., Hanage, W. P., Bessen, D. E., & Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), 872–900. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00284.x>
- Zhang, G. (2013). Foodborne pathogenic bacteria detection: an evaluation of current and developing methods. *Meducator* 1, 15.
- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., and Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J. Microbiol. Biotechn.* 24, 297–312. doi: 10.4014/jmb.1310.10013
- Zheng, B., Tomita, H., Inoue, T., & Ike, Y. (2009). Isolation of VanB-type *Enterococcus faecalis* strains from nosocomial infections: first report of the isolation and identification of the pheromone-responsive plasmids pMG2200, Encoding VanB-type vancomycin resistance and a Bac41-type bacteriocin, and pMG2201, encoding erythromycin resistance and cytolysin (Hly/Bac). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 735–747. <https://doi.org/10.1128/AAC.00754-08>
- Zhou, B., Xiao, J., Liu, S., Yang, J., Wang, Y., Nie, F., et al. (2013). Simultaneous detection of six food-borne pathogens by multiplex PCR with GEXP analyzer. *Food Cont.* 32, 198–204. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.044

ΟΠΙΣΘΟΦΥΛΛΟ

