



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

ΕΝΟΤΗΤΑ 3. Σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στη διατροφή

A. Μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων

Διάλεξη 5.6.2014

**Αδαμαντίνη Κυριακού
Επικ. Καθηγήτρια
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Περιγραφή του Μαθήματος

Η διάλεξη είναι χωρισμένη σε δύο μέρη. Στο Α Μέρος γίνεται αναφορά στην αναγκαιότητα θέσπισης μικροβιολογικών κριτηρίων και στους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται ως δείκτες για τον έλεγχο της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων.

Στο Β Μέρος γίνεται αναφορά στις τροφογενείς ασθένειες, τη σημασία τους για την υγεία και το οικονομικό κόστος με το οποίο επιβαρύνουν τις κοινωνίες. Από τα τροφογενή παθογόνα, επιλέγονται τα πιο σημαντικά αναδυόμενα (*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*) και γίνεται αναλυτικά η παρουσίασή τους (Χαρακτηριστικά του παθογόνου, Ασθένεια, Επιδημιολογία, Επικίνδυνα τρόφιμα, Μέθοδοι ανίχνευσης).

Μέρος Α

Μικροβιολογικά κριτήρια στα τρόφιμα

Για ποιο λόγο θεσπίζονται τα μικροβιολογικά κριτήρια στα τρόφιμα;

Είναι αποδεκτό ότι την μεγαλύτερη ποσότητα μικροοργανισμών την δεχόμαστε μέσω της κατανάλωσης των τροφίμων. Οι μικροοργανισμοί μπορεί απλώς να μεταφέρονται μέσω των τροφίμων, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούν το τρόφιμο ως υπόστρωμα και πολλαπλασιάζονται χρησιμοποιώντας τις μεταβολικές τους δυνατότητες, ως αποικοδομητές.

Η αύξηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα συνήθως επιφέρει αλλαγές στην σύσταση των τροφίμων λόγω της κατανάλωσης των συστατικών τους αλλά και της παραγωγής των μικροβιακών μεταβολιτών με επακόλουθο να μεταβάλλονται οι οργανοληπτικές τους ιδιότητες, να εμφανίζονται αλλοιώσεις και να υποβαθμίζεται η ποιότητά τους.

Εάν μάλιστα κάποιοι από τους μικροοργανισμούς που αυξάνονται είναι παθογόνοι ή εκκρίνουν τοξικές ενώσεις τότε τα τρόφιμα παύουν να είναι ασφαλή.

Τα μικροβιολογικά κριτήρια χρησιμοποιούνται για την διευκόλυνση τόσο των ελεγκτικών αρχών όσο και των ίδιων των παραγωγών να ελέγχουν με μικροοργανισμούς δείκτες ή με επίπεδα μικροβιακών μεταβολιτών την ποιότητα ή την ασφάλεια των τροφίμων. Με την χρήση των μικροβιολογικών κριτηρίων μπορεί να ελεγχθεί τόσο η τελική ποιότητα/ασφάλεια ενός τροφίμου, όσο και η διαδικασία που ακολουθείται (εάν γίνεται χρήση ορθών βιομηχανικών πρακτικών, εάν είναι αποτελεσματική η μέθοδος απομάκρυνσης των μικροοργανισμών που ακολουθείται κλπ).

Η θέσπιση ενός μικροβιολογικού κριτηρίου απαιτείται όταν υπάρχει κάποιος κίνδυνος από την κατανάλωση μίας κατηγορίας τροφίμων που βασίζεται είτε σε επιδημιολογικά κριτήρια, είτε προκύπτει μετά από ανάλυση επικινδυνότητας. Επίσης εάν η φύση του τροφίμου το καθιστά ευπαθές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, εάν υπόκειται ή όχι σε κάποια

επεξεργασία που να περιορίζει την μικροχλωρίδα του και ακόμη εάν η όλη επεξεργασία, αποθήκευση, μεταφορά του μπορεί να προκαλέσει επιμολύνσεις. Τα κριτήρια μπορεί να είναι είτε υποχρεωτικά, είτε συμβουλευτικά.

Ένα μικροβιολογικό κριτήριο μπορεί να είναι είτε μέρος ενός νόμου ή διάταξης και τότε δεν επιτρέπεται η υπέρβασή του, οπότε στην περίπτωση αυτή ορίζεται ως κανονισμός.

Αντίθετα ένα μικροβιολογικό κριτήριο μπορεί να χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία τροφίμων ή από τις ελεγκτικές αρχές για την παρακολούθηση μίας βιομηχανικής διαδικασίας και της συμμόρφωσης με τις ορθές βιομηχανικές πρακτικές, οπότε τότε αποτελεί οδηγία και είναι συμβουλευτικό κριτήριο.

Υπάρχουν και μικροβιολογικά κριτήρια που θεσπίζονται ως απαραίτητη προϋπόθεση για την κυκλοφορία ενός προϊόντος στην αγορά ή για την αγορά ενός προϊόντος και τότε μπορεί να είναι είτε υποχρεωτικά ή συμβουλευτικά.

Μικροοργανισμοί δείκτες

Οι μικροοργανισμοί δείκτες χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή των μικροβιολογικών κριτηρίων και συνήθως επιλέγονται έτσι ώστε η πληροφορία που παίρνουμε να είναι γρήγορη και αξιόπιστη σε σχέση με την ποιότητα/ασφάλεια των πρώτων υλών ή με τη διαδικασία της επεξεργασίας και της αποθήκευσης.

Μικροοργανισμοί δείκτες ποιότητας στα τρόφιμα

Οι μικροοργανισμοί δείκτες θεσπίζονται είτε για να καλύψουν μικροβιολογικά κριτήρια ελέγχου της ποιότητας ενός τροφίμου, είτε ελέγχου της ασφάλειας δηλαδή αποτελούν δείκτες τροφογενών παθογόνων και τοξινών.

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας θα πρέπει να:

- Ανιχνεύονται σε όλα τα τρόφιμα που πρόκειται να γίνει εκτίμηση της ποιότητάς τους
- Υπάρχει άμεση συσχέτιση των αριθμητικών τους μεγεθών με την ποιότητα του τροφίμου
- Υπάρχει εύκολη και γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης και καταμέτρησής τους

Οι μικροοργανισμοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας ενός τροφίμου μπορεί να χρησιμοποιηθούν και για την πρόβλεψη της ζωής ενός τροφίμου. Η επιλογή του ή των μικροοργανισμών δεικτών εξαρτάται από το τρόφιμο στο οποίο θα εφαρμοστούν και είναι συνήθως οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί που απαντώνται στο τρόφιμο π.χ. οι συμπυκνωμένοι φυσικοί χυμοί ελέγχονται για την παρουσία ζυμών ή το *Pseudomonas putrefaciens* χρησιμοποιείται ως μικροοργανισμός δείκτης για τον έλεγχο της ποιότητας του βουτύρου. Πολύ συχνά η ολική μεσόφιλη αερόβια μικροχλωρίδα (ΟΜΧ) αποτελεί δείκτη ποιότητας του τροφίμου ή της κατάστασης του εξοπλισμού και των σκευών που χρησιμοποιούνται. Ειδικά για δείκτες τόσο γενικούς απαιτείται πολύ καλή γνώση της φυσικής μικροχλωρίδας του δείγματος στο συγκεκριμένο σημείο για να μπορούν να αιτιολογηθούν οι τυχόν μεταβολές της. Δεν συμβαδίζει πάντοτε με την οργανοληπτική ποιότητα του δείγματος γιατί για την αλλοίωση αυτών των χαρακτηριστικών απαιτούνται συνήθως υψηλοί πληθυσμοί. Από την άλλη υποβάθμιση της ποιότητας μπορεί να συμβεί και με χαμηλούς πληθυσμούς ΟΜΧ που παρουσιάζουν διαφορετικές βιοχημικές δραστηριότητες.

Εκτός από τις καλλιεργητικές μεθόδους συχνά χρησιμοποιείται και η άμεση καταμέτρηση μικροβιακών κυττάρων στο μικροσκόπιο, όπου η πιο σημαντική διαφορά είναι ότι γίνεται καταμέτρηση των ζωντανών και των μη-ζωντανών κυττάρων.

Επίσης η ανίχνευση κάποιου μικροβιακού μεταβολικού προϊόντος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ποιότητας ενός τροφίμου π.χ. η αιθανόλη για τον χυμό μήλου και τα προϊόντα αλιείας (Montville T.& Matthews K., Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδ. Ίων, Αθήνα 2010).

Μικροοργανισμοί δείκτες ασφάλειας στα τρόφιμα

Τα τροφογενή παθογόνα ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη σοβαρότητα της επικινδυνότητας: Κατηγορία I, II και III όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1 που ακολουθεί.

Πίνακας 1: Τροφογενή παθογόνα ομαδοποιημένα σύμφωνα με την σοβαρότητα κινδύνου (Πηγή: Montville T. & Matthews K., 2010)

| Κατηγορία κινδύνου | Μικροοργανισμοί |
|---|---|
| I (σοβαροί κίνδυνοι) | <i>Clostridium botulinum</i> (A, B, E, F) |
| | <i>Shigella dysenteriae</i> |
| | <i>Salmonella enterica</i> (Paratyphi A, B) |
| | Εντεροαιμορραγική <i>E.coli</i> (EHEC) |
| | Ιοί ηπατίτιδας A, E |
| | <i>Brucella abortus</i> , <i>B.suis</i> |
| | <i>Vibrio cholerae</i> O1 |
| | <i>Vibrio vulnificus</i> |
| | <i>Taenia solium</i> |
| II (μέτριοι κίνδυνοι, πιθανή εκτεταμένη εξάπλωση) | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| | <i>Salmonella</i> spp. |
| | <i>Shigella</i> spp. |
| | <i>E.coli</i> (άλλα μολυσματικά στελέχη) |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| | Rotavirus |
| | Ιοί τύπου Norwalk |
| | <i>Entamoeba histolytica</i> |
| | <i>Diphyllobothrium latum</i> |
| | <i>Ascaris lumbricoides</i> |
| | <i>Cryptosporidium parvum</i> |
| III (μέτριοι κίνδυνοι, περιορισμένη εξάπλωση) | <i>Bacillus cereus</i> |
| | <i>Campylobacter jejuni</i> |
| | <i>Clostridium perfringens</i> |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| | <i>V. cholerae</i> |
| | <i>V.parahaemolyticus</i> |
| | <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| | <i>Giardia lamblia</i> |
| | <i>Taenia saginata</i> |

Υπάρχουν τρόφιμα που έχουν ενοχοποιηθεί πολλές φορές ότι είναι φορείς τροφογενών λοιμώξεων και απαιτούν την θέσπιση ιδιαίτερων μικροβιολογικών κριτηρίων, ελέγχων και μέτρων έτσι ώστε να φθάνουν ασφαλή στον καταναλωτή. Τέτοια περίπτωση είναι το γάλα.

Επίσης εκτός από το τρόφιμο που χαρακτηρίζεται ευαίσθητο ή υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα που φαίνεται ότι η κατανάλωσή του εμπλέκεται συχνά με την πρόκληση διατροφικών ασθενειών, σημαντικός παράμετρος είναι και η μολυσματικότητα του παθογόνου. Υπάρχουν παθογόνα που η παρουσία

τους στο τρόφιμο και μόνο είναι σημαντικός κίνδυνος για την υγεία. Πάντοτε πρέπει να λαμβάνει κανείς υπόψη τις συνθήκες που επικρατούν κατά την επεξεργασία του τροφίμου, που μπορεί να ευνοούν ή αντίθετα να ελέγχουν την αύξηση συγκεκριμένων παθογόνων. Η γρήγορη έναρξη της ζυμωτικής διαδικασίας στα ζυμωμένα τρόφιμα από την ζυμωτική μικροχλωρίδα (οξυγαλακτικά βακτήρια) και η γρήγορη παραγωγή οξέος είναι σημαντικός παράγοντας που παρεμποδίζει την ανάπτυξη παθογόνων όπως το *Staphylococcus aureus* και την έκκριση της εντεροτοξίνης του, ενώ αντίθετα δεν διασφαλίζει πάντα το προϊόν από την ανάπτυξη του πολύ σημαντικού παθογόνου *E.coli* O157:H7.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι ο ίδιος ο καταναλωτής και η κατάσταση στην οποία βρίσκεται. Είναι λογικό όταν το τρόφιμο απευθύνεται σε ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού όπως βρέφη, παιδιά, ηλικιωμένοι, ή ανοσοκατασταλμένοι άνθρωποι, να ισχύουν πιο αυστηρά κριτήρια. Και εδώ παίζει ρόλο σημαντικό βέβαια και το δειγματοληπτικό σχέδιο που ακολουθείται για τα τρόφιμα που προορίζονται για τέτοιες ομάδες του πληθυσμού.

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την ασφάλεια των τροφίμων δεν είναι απαραίτητως παθογόνοι. Θα πρέπει όμως να είναι εύκολα και γρήγορα ανιχνεύσιμοι, να διαχωρίζονται εύκολα από άλλους μικροοργανισμούς που αποτελούν τη φυσική μικροχλωρίδα του τροφίμου, να συσχετίζονται με το /τα παθογόνα που υποδεικνύουν, να παρουσιάζονται όταν παρουσιάζεται το παθογόνο, να μειώνονται όταν μειώνεται το παθογόνο και να απουσιάζουν όταν το παθογόνο απουσιάζει από το τρόφιμο.

Οι πιο γνωστοί δείκτες είναι οι περιπρωματικοί δείκτες. Τα περιπρωματικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως δείκτες πρέπει να απαντώνται μόνο στο περιβάλλον του εντέρου και να ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα κόπρανα, αλλά να μπορούν να μετρηθούν ακόμα και σε χαμηλές ποσότητες με αξιόπιστη και γρήγορη μέθοδο. Είναι κυρίως τα κολίμορφα βακτήρια και το *E.coli* και η παρουσία τους ουσιαστικά σημαίνει ότι υπάρχει κοπρανώδης μόλυνση και είναι πιθανή η παρουσία άλλων παθογόνων ίδιας προέλευσης.

Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται και μεταβολικά προϊόντα μικροοργανισμών για τον έλεγχο της ασφάλειας κάποιων τροφίμων, όπως π.χ.

έλεγχος των σιτηρών για αφλατοξίνες με χρήση υπεριώδους φωτισμού
(Montville T.& Matthews K., Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδ. Ίων, Αθήνα 2010).

Μέρος Β

Τροφογενείς ασθένειες

Οι τροφογενείς ασθένειες αναγνωρίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) ως ασθένειες που έχουν προκληθεί από την κατανάλωση κάποιου τροφίμου και ή οφείλονται σε κάποιο μολυσματικό παράγοντα ή σε κάποια τοξίνη.

Αν και είναι πολύ δύσκολο να υπολογίσει κανείς, θεωρείται ότι περίπου 1,8 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν το 2005 από διαρροϊκές ασθένειες, εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό οφείλονταν σε κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου και νερού. Στις βιομηχανοποιημένες χώρες το 30% του πληθυσμού υποφέρει από τροφογενείς νόσους (Velusamy et al., 2010).

Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι περίπου 9,1 εκατομμύρια περιστατικά που οφείλονται σε 31 τροφογενή παθογόνα συμβαίνουν κάθε χρόνο, εκ των οποίων οι 55.961 νοσηλεύονται και περίπου 1.351 πεθαίνουν (Scallan et al., 2011).

Στις παγκοσμιοποιημένες κοινωνίες που ζούμε τα τρόφιμα που φθάνουν στο πιάτο μας πολύ συχνά είναι αποτέλεσμα ενός αρκετά πολύπλοκου δικτύου διακίνησης και διαδικασιών επεξεργασίας, που περιλαμβάνει την προμήθεια των πρώτων υλών, την μεταφορά τους στον τόπο επεξεργασίας, την επεξεργασία τους, την μεταφορά των προϊόντων στους τόπους διανομής και από εκεί την τελική επεξεργασία στην κουζίνα του καταναλωτή. Συνήθως αυτό το πολύπλοκο δίκτυο το θυμούμαστε όταν ξεσπούν κρίσεις μετά από την κατανάλωση αλλοιωμένων τροφίμων και εντείνονται οι προσπάθειες για την ανίχνευση του παθογόνου και του σημείου εισόδου του στο δίκτυο παραγωγής του τροφίμου.

Η ανάγκη για παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας τροφής και πιο ειδικά κρέατος που ακολουθεί την αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, έχει οδηγήσει στην εντατική κτηνοτροφία και γεωργία και φαίνεται ότι έχει επηρεάσει την ασφάλεια των τροφίμων με την εμφάνιση και νέων παθογόνων.

Η αλήθεια είναι ότι τα τελευταία χρόνια τα συστήματα παρακολούθησης των τροφογενών νόσων έχουν εντατικοποιηθεί στις χώρες που υπήρχε ήδη σύστημα καταγραφής κάποιων παθογόνων και σε αρκετές ακόμα χώρες που δεν υπήρχε, δημιουργήθηκε. Αυτό έχει ως συνέπεια την εμφάνιση διαφόρων τροφογενών παθογόνων που πλέον ανιχνεύονται, καταγράφονται και δημοσιοποιούνται, σε αντίθεση με το παρελθόν που απλώς δεν υπήρχαν αυτές οι πληροφορίες. Και βέβαια η μη εμφάνιση περιστατικών για τις χώρες εκείνες που δεν έχουν σύστημα παρακολούθησης και καταγραφής, δεν σημαίνει ότι δεν συμβαίνουν.

Τα περισσότερα δεδομένα που έχουμε είναι από τις χώρες της Βορείου Αμερικής (κυρίως ΗΠΑ και Καναδά) και Ευρώπης. Το αποτέλεσμα της καταγραφής όταν συνοδεύεται από προσπάθεια κατανόησης της δημιουργίας του προβλήματος και επίλυσής του, συνήθως έχει πολύ σημαντικά αποτελέσματα για την δημόσια υγεία. Για παράδειγμα η συστηματική προσπάθεια στις ΗΠΑ κατά τον 20ό αιώνα, για τον περιορισμό των ζωνοσών που μεταδίδονται στους ανθρώπους σε επίπεδο κοππαδιού, είχε ως αποτέλεσμα τον περιορισμό σημαντικά της βρουκέλωσης και της βοείου φυματίωσης. Επίσης μετά από προσπάθειες που έγιναν στις συνθήκες που επικρατούν στα χοιροτροφεία και ιδιαίτερα στην ποιότητα της ζωοτροφής, μειώθηκε σημαντικά η παρουσία του παρασίτου *Trichinella* και κατά συνέπεια η αντίστοιχη ασθένεια που μεταδίδεται στον καταναλωτή χοιρινού κρέατος (τριχινέλωση) (Schantz et al., 1983).

Το 2012 δύο μεγάλες μελέτες διεξήχθησαν στις ΗΠΑ σε σχέση με το οικονομικό κόστος που έχουν οι τροφογενείς νόσοι στην δημόσια υγεία.

Οι ερευνητές και από τις δύο μελέτες συμφώνησαν ότι η νόσος που κοστίζει περισσότερο είναι η σαλμονέλλωση (μη-τυφοειδής) και δεύτερη σε κόστος είναι η νόσος που προκαλείται από το πρωτόζωο *Toxoplasma gondii*, ενώ ακολουθούν η λιστερίωση (*Listeria monocytogenes*), οι ιώσεις που προκαλεί ο Νοροϊός, και η καμπυλοβακτηρίωση (*Campylobacter*).

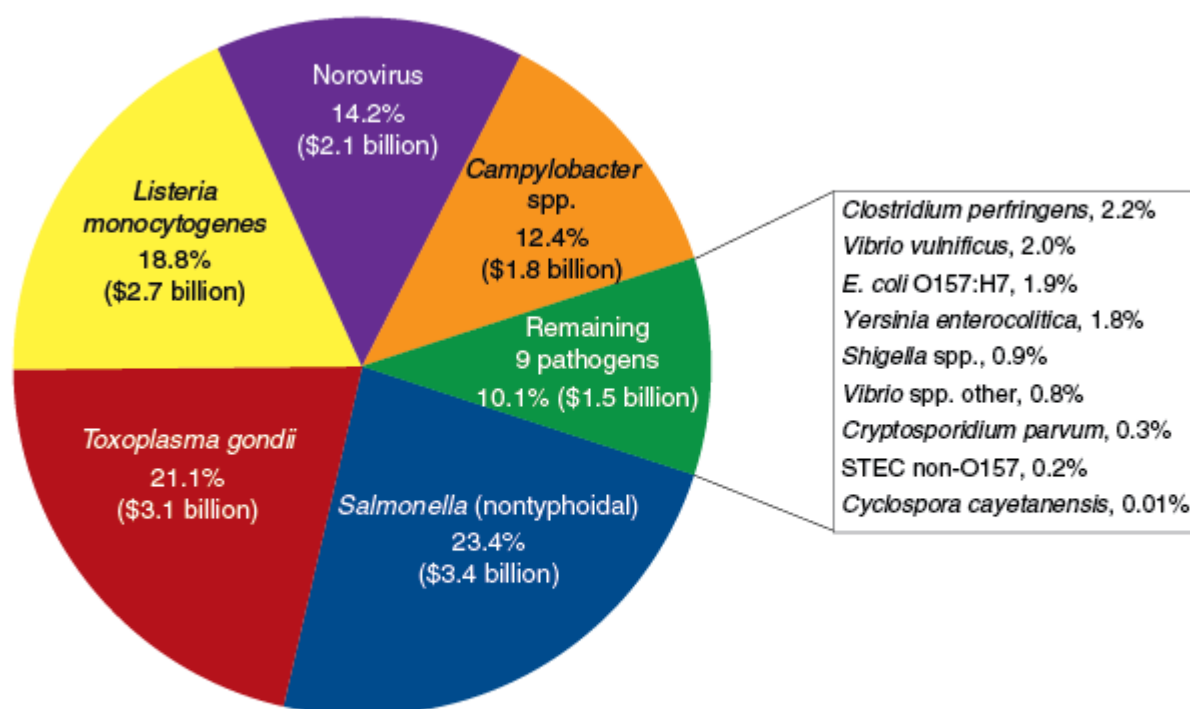
Το κόστος από την εκδήλωση αυτών των πέντε παθογόνων φθάνει το 85% του συνολικού κόστους που προέρχεται από τα τροφογενή παθογόνα.

Το Κέντρο για τον Έλεγχο και την Πρόληψη Ασθενειών των ΗΠΑ (US, CDC) θεωρεί ότι τα 14 παθογόνα που παρουσιάζονται στο σχήμα που ακολουθεί

είναι υπεύθυνα για περισσότερο από το 95% των περιστατικών τροφογενών ασθενειών, με νοσηλεία σε νοσοκομείο και θάνατο, που είναι γνωστή η παθογόνος αιτία.

Το κόστος που εκτιμήθηκε ανέρχεται για την μία μελέτη σε 14,6 δις δολάρια, ενώ για την άλλη σε 16,3 δις δολάρια κάθε χρόνο. Οι διαφορές πιστεύεται ότι οφείλονται σε διαφορετικές προσεγγίσεις των ερευνητικών ομάδων ως προς τις επιπτώσεις των τροφογενών ασθενειών και χρησιμοποιούν διαφορετικά εργαλεία π.χ. για την εκτίμηση του κόστους των αποβολών σε εγκύους, θανάτους βρεφών, παραγωγικότητα των γονέων που περιθάλπουν ανήλικες ασθενείς (Hoffmann S. & Anekwe T., 2013).

Salmonella imposes the greatest cost of the 14 major foodborne pathogens



Note: Annual cost estimates are in 2010 dollars based on disease incidence estimates published in 2011.

Source: USDA, Economic Research Service.

Εικόνα 1. Παρουσίαση του κόστους για τη Δημόσια Υγεία της εμφάνισης των σημαντικότερων τροφογενών παθογόνων (Hoffmann S. & Anekwe T., 2013)

Αναδυόμενα τροφογενή παθογόνα

Νέα ή αναδυόμενα τροφογενή παθογόνα χαρακτηρίζονται είτε καινούργια στελέχη που δεν είχαν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα και συνδέεται η μετάδοσή τους με την κατανάλωση τροφίμων και ποτών ή ακόμα ήδη γνωστά παθογόνα που αποδεικνύεται πλέον η μετάδοσή τους μέσω της κατανάλωσης τροφής (Behravesht et al., 2012).

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα τροφογενή παθογόνα που έχουν εμφανιστεί τα τελευταία 30 χρόνια (Πηγή: The National Academies, Inst. of Medicine, 2012).

Τα περισσότερα από αυτά προέρχονται από ζώα και κάποια φαίνεται ότι παρουσιάζουν ιδιαίτερη προτίμηση σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα, οπότε είναι και πιο εστιασμένες οι μέθοδοι αντιμετώπισής τους. Για παράδειγμα τα στελέχη του *Campylobacter* φαίνεται ότι έχουν προσαρμοστεί στα πτηνά και περισσότερο στα κοτόπουλα, που έχουν γίνει σχεδόν φυσική τους μικροχλωρίδα και κατά τη διάρκεια της σφαγής μολύνουν το κρέας τους. Κάποια στελέχη επίσης του ίδιου παθογόνου μολύνουν τα βοοειδή και μεταδίδονται μέσω του αγελαδινού γάλακτος.

Πίνακας 2. Τα σημαντικότερα τροφογενή παθογόνα που έχουν εμφανιστεί τα τελευταία 30 χρόνια

| Βακτήρια | Μύκητες | Φύκη | Παράσιτα | Ιοί | Prions |
|---|---------------------------------------|---|--------------------------------|---|---|
| <i>Arcobacter butzleri</i> | <i>Aspergillus flavus</i> (aflatoxin) | <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> (domoic acid-producing) | <i>Cryptosporidium</i> | Astrovirus | new Variant Creutzfeldt Jacob Disease prion |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | | | <i>Cyclospora cayetanensis</i> | Caliciviridae (norovirus and sapovirus) | |
| <i>Campylobacter fetus</i> | | | <i>Sarcocystis</i> | Hepatitis E | |
| <i>Cronobacter sakazakii</i> | | | <i>Trypanosoma cruzi</i> | Nipah virus | |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | | | | Rotavirus | |
| <i>E. coli</i> , non-O157 STEC | | | | | |
| <i>E. coli</i> , enteroaggregative/STEC | | | | | |
| <i>E. coli</i> , other diarrheagenic | | | | | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | | | | | |
| <i>Vibrio cholerae</i> O139, toxigenic | | | | | |
| <i>Vibrio vulnificus</i> | | | | | |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | | | | | |
| <i>Yersinia enterocolica</i> | | | | | |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | | | | | |

Συνήθως αντιλαμβανόμαστε τα περιβάλλοντα που εγκαθίστανται τα παθογόνα, τους τρόπους και ιδιαίτερα τα τρόφιμα μέσω των οποίων μεταδίδονται όταν ξεσπούν κρίσεις των ασθενειών. Μεταξύ των ετών 2005-2012 καταγράφηκαν 15 νέα τρόφιμα που προκάλεσαν τροφογενείς ασθένειες: συσκευασμένο σπανάκι, παστεριωμένος χυμός καρότου, φυστικοβούτυρο, σκόνη μπρόκολου σε παιδικό snack, ξηρή τροφή σκύλων, καταψυγμένες πίτες, κονσερβοποιημένη σάλτσα τσίλι, καυτερές πιπεριές, άσπρο και μαύρο πιπέρι, αποξηραμένη ζύμη (μίγμα) για μπισκότα, φουντούκια, φύτρα μοσχοσίταρου, παπάγια, κουκουναρόσποροι,

«κιμάς» τόνου ωμού και κατεψυγμένου

Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι αρκετά από αυτά τα τρόφιμα είναι επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, ενώ συνήθως μέχρι τώρα θεωρούσαμε ότι τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης παρουσιάζουν περισσότερους κινδύνους.

Το δίκτυο Foodnet από τις ΗΠΑ, ένας δημόσιος φορέας που επιτηρεί και καταγράφει την εμφάνιση κυρίως τροφογενών ασθενειών, δημοσίευσε ότι το 2010 η συχνότητα εμφάνισης του *E.coli* O157:H7 μειώθηκε κατά 44% σε σχέση με την περίοδο αναφοράς 1996-1998, ότι αντίστοιχα η συχνότητα εμφάνισης του *Campylobacter* μειώθηκε κατά 27% και η συχνότητα εμφάνισης λιστεριώσεων κατά 38%. Αντίθετα η συχνότητα εμφάνισης των σαλμονελλώσεων δεν μειώθηκε καθόλου. Η πρόοδος που σημειώθηκε οφείλεται στη βελτίωση των μέτρων υγιεινής στα σφαγεία και στην επεξεργασία των κρεάτων (The National Academies, Inst. of Medicine, 2012).

Gram αρνητικά τροφογενή παθογόνα

Salmonella spp.

Χαρακτηριστικά του παθογόνου

Το *Salmonella* spp. είναι Gram αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει δύο είδη: *S. enterica* που είναι το χαρακτηριστικό είδος και το *S. bongori* που παλαιότερα ήταν το υπο-είδος V.

Το *S. enterica* περιλαμβάνει έξι υπο-είδη που χαρακτηρίζονται με λατινικό νούμερο και όνομα (I: *S. enterica* subs. *enterica*, II: *S. enterica* subs. *salamae*, IIIa: *S. enterica* subs. *arizonae*, IIIb: *S. enterica* subs. *diarizonae*, IV: *S. enterica* subs. *houtenae*, VI: *S. enterica*, subs. *indica*).

Η επιπλέον ταξινόμηση των στελεχών της σαλμονέλλας γίνεται με τα διαφορετικά αντιγόνα που διαθέτουν τα στελέχη στο στρώμα των λιποπολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος (O), τα αντιγόνα του μαστιγίου (H) και τα αντιγόνα του ελύτρου (Vi). Τα τελευταία (Vi) συναντώνται μόνο στους ορότυπους Typhi, Paratyphi C και Dublin.

Το είδος *S. enterica* υπολογίζεται ότι αριθμεί περίπου 2443 διαφορετικούς ορότυπους, ενώ το είδος *S. bongori* διαθέτει 20 ορότυπους. Άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό για την κατάταξή τους είναι η ευαισθησία τους σε συγκεκριμένους βακτηριοφάγους (PT: provisional phage type. DT: definitive phage type).

Ο ορότυπος Typhimurium DT 104, εμφανίστηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και έκτοτε έχει προκαλέσει μεγάλη ανησυχία για την εξάπλωσή του. Παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, τη χλωραμφενικόλη, τη στρεπτομυκίνη, τα σουλφοναμίδια και την τετρακυκλίνη. Κάποια στελέχη εμφανίζουν ανθεκτικότητα και στη τζενταμυκίνη, στις φθοροκινολόνες, το trimethoprim ή και σε άλλες αντιβιοτικές ενώσεις. Από την δεκαετία του 1990 θεωρείται ότι υπάρχει πανδημία του συγκεκριμένου τύπου τόσο στους ανθρώπους, όσο και στα ζώα, αφού στελέχη ανθεκτικά του συγκεκριμένου τύπου έχουν απομονωθεί από ξεσπάσματα επιδημιών σε πολλές χώρες (Ευρώπη, Ασία, Αμερική). Τα συμπτώματα είναι συνήθως πιο βαριά από άλλα στελέχη και ο χρόνος νοσηλείας μεγαλύτερος. Η αρχική πηγή μόλυνσης

για τους ανθρώπους θεωρείται ότι είναι τα ζώα (ζωο-ανθρωονόσος) και μεταδόθηκε είτε μέσω της άμεσης επαφής με τα ζώα φορείς, είτε μέσω επιμόλυνσης από την τροφή.

Παρουσιάζει ενδιαφέρον επίσης ότι τα γενετικά στοιχεία που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά εντοπίζονται στο χρωμόσωμα, παρότι είναι γνωστό ότι πολλά στελέχη της σαλμονέλλας διαθέτουν σημαντικά πλασμίδια που περιέχουν γενετικές πληροφορίες που σχετίζονται με την μολυσματικότητά της (Threlfal J., 2000; Mather A.E. et al., 2013).

Ασθένεια

Οι ορότυποι *S.Typhi* και *S.Paratyphi* προκαλούν τον τυφοειδή πυρετό, μία πολύ σοβαρή γενικευμένη λοίμωξη που μεταδίδεται κυρίως από ανθρώπους φορείς ή ασθενείς. Τα ποσοστά θνησιμότητας φθάνουν περίπου 10%. Θεωρείται ότι τα κρούσματα της ασθένειας αυτής ήταν εξαιρετικά σπάνια στις αναπτυγμένες χώρες κατά τον 20^ο αιώνα, χάρις στα μέτρα υγιεινής που λαμβάνονται, στην χλωρίωση του νερού και φυσικά στην θεραπεία με αντιβιοτικά.

Η μη-τυφοειδής σαλμονέλλωση είναι μία εντοπισμένη σοβαρή λοίμωξη του εντερικού επιθηλίου. Τα συμπτώματα είναι διάρροια με μεγάλο κίνδυνο αφυδάτωσης, εμετός, κοιλιακοί πόνοι και πυρετός.

Ο χρόνος επώασης για την εκδήλωση των συμπτωμάτων από τον χρόνο της μόλυνσης του οργανισμού είναι 12-72 ώρες και η διάρκεια των συμπτωμάτων είναι 2-7 ημέρες.

Η μόλυνση γίνεται από την επαφή με κάποιο ασθενή ή φορέα του βακτηρίου, ή πιο συχνά μέσω της κατανάλωσης κάποιου αλλοιωμένου τροφίμου.

Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από την μολυσματικότητα του στελέχους που έχει προσβάλλει τον ασθενή, αλλά και από την κατάσταση της υγείας του προσβεβλημένου.

Οι ιδιαίτερα επιθετικοί ορότυποι (*Choleraesuis*, *Dublin*) μπορεί να προκαλέσουν και γενική σηψαιμία. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι περίπου 1%.

Τα άτομα που ανήκουν σε ευαίσθητες ομάδες, όπως νεογνά, παιδιά, ηλικιωμένοι και ανοσοκατασταλεμένοι πιθανόν να εκδηλώσουν πολύ βαρύτερα συμπτώματα.

Η δόση του παθογόνου που είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της ασθένειας (μολυσματική δόση) ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος, τον ασθενή αλλά και το φορέα τρόφιμο. Υπολογίζεται ότι για κάποιον υγιή ενήλικα απαιτείται η κατανάλωση περισσότερων από 10.000 κυττάρων. Υπάρχουν όμως πολλές αναφορές που δείχνουν ότι με πολύ λιγότερα κύτταρα μπορεί να προκληθεί ασθένεια (<100 κύτταρα του παθογόνου). Κοινό στοιχείο σε αυτές τις περιπτώσεις ήταν η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη των τροφών που μετέφεραν το παθογόνο π.χ. σοκολάτα, τυριά (Montville T. & Matthews K., 2010)

Εκτός από την σοβαρή γαστρεντερίτιδα, τα θύματα σαλμονέλλωσης μπορεί να εμφανίσουν στη συνέχεια και άλλες επιπλοκές όπως: μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, πνευμονία, χολοκυστίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα κ.α

Επιδημιολογία

Πιστεύεται ότι κάθε χρόνο 90 εκατομμύρια άνθρωποι προσβάλλονται από σαλμονέλλωση, ενώ το κόστος για τα συστήματα Δημόσιας Υγείας ανέρχεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε 3δισ € και στις ΗΠΑ σε 2.7 δισ δολάρια (Matther et al., 2013).

Στις ΗΠΑ αναφέρεται από το CDC (Centers for Disease control and Prevention) ότι προσβάλλονται περίπου 1,2 εκατομμύρια άνθρωποι κάθε χρόνο, από αυτούς οι 23.000 νοσηλεύονται σε νοσοκομεία ενώ περίπου 450 πεθαίνουν.

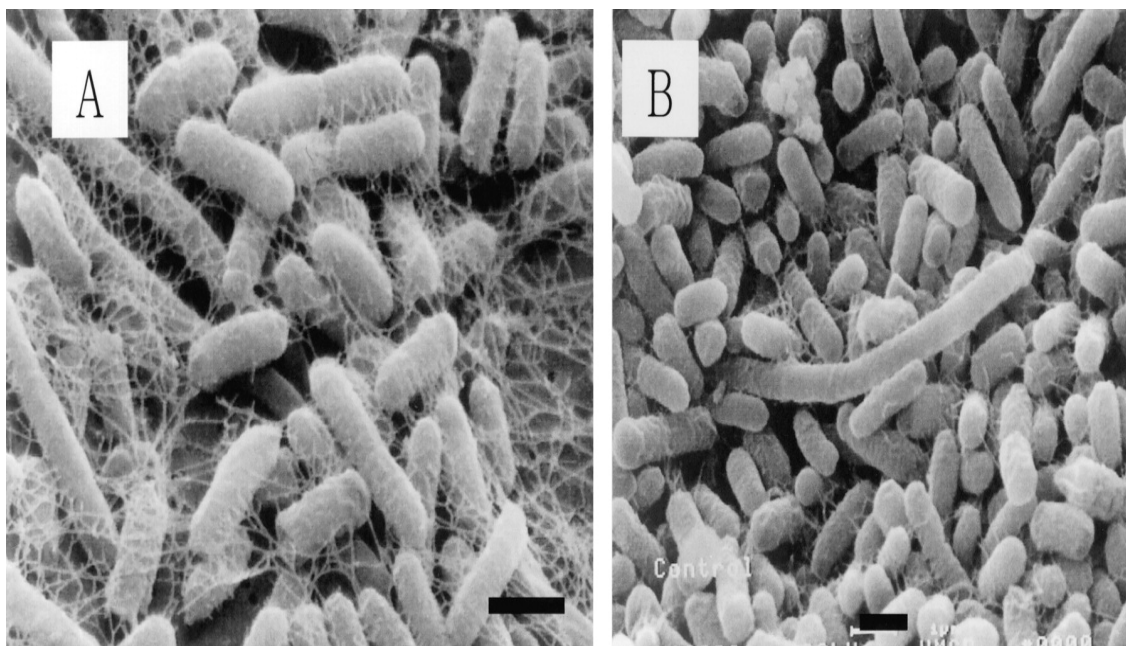
Οι Majowicz και συνεργάτες σε ένα άρθρο τους το 2010 υπολογίζουν ότι σε παγκόσμιο επίπεδο πρέπει να προσβάλλονται περίπου 93,8 εκατομμύρια άνθρωποι από σαλμονέλλωση και 155.000 πεθαίνουν από τον ίδιο παθογόνο παράγοντα.

Επικίνδυνα τρόφιμα

Παραδοσιακά τα τρόφιμα που έχουν κατηγορηθεί περισσότερο είναι το κρέας των πουλερικών, τα αυγά και όλα τα τρόφιμα που περιέχουν τα συστατικά αυτά.

Όμως όλα τα κρέατα και γενικότερα τα προϊόντα ζωικής προέλευσης έχουν λειτουργήσει ως φορείς σαλμονέλλας.

Τα τελευταία χρόνια όλο και πιο συχνά παρατηρούμε ξεσπάσματα κρουσμάτων σαλμονελλώσεων από την κατανάλωση φρέσκων λαχανικών και φρούτων ή προϊόντων που δεν θεωρούνταν μέχρι τώρα ευαίσθητα τρόφιμα (π.χ. μπαχαρικά). Ο λόγος είναι ότι στις καλλιέργειες αυτές έχει χρησιμοποιηθεί νερό άρδευσης αμφίβολης ποιότητας ή κοπριά που ήταν ακατάλληλη μικροβιολογικά. Τα τρόφιμα αυτά επιπλέον καταναλώνονται χωρίς θερμική επεξεργασία, με αποτέλεσμα να μην θανατώνεται το παθογόνο (Bell C. & Kyriakides A., 2002)



Εικόνα 2: *Salmonella enterica* Typhimurium DT104, καλλιεργημένη σε διαφορετικές συνθήκες (ηλεκτρονική μικροσκοπία) A: θρεπτικό stress, B: θρεπτικό υπόστρωμα TSB (Πηγή: Gurpte et al., 2003)

Μέθοδοι ανίχνευσης του *Salmonella* spp.

Ένα από τα πρώτα θέματα που πρέπει να εξετάσει κανείς για τον έλεγχο του παθογόνου είναι η δειγματοληψία (σχέδιο δειγματοληψίας, αριθμός δειγμάτων). Ο μικρός αριθμός των κυττάρων του παθογόνου που μπορεί να υπάρχουν, η μεγάλη σε ποικιλία και αριθμούς κυττάρων υπόλοιπη μικροχλωρίδα, αλλά και η χημική σύσταση του τροφίμου είναι από τους παράγοντες που θα πρέπει να ξεπεραστούν για να γίνει ανίχνευση και σωστή καταμέτρηση των κυττάρων της σαλμονέλλας. Για τους λόγους αυτούς

απαιτείται μεγάλος αριθμός δειγμάτων και κατάλληλο δειγματοληπτικό σχέδιο, αλλά επίσης και κατάλληλη επεξεργασία των δειγμάτων.

Η ανίχνευση της σαλμονέλλας γίνεται σε 25 ή 10g δείγματος, ανάλογα με το βαθμό επικινδυνότητας του τροφίμου ή τους καταναλωτές στους οποίους απευθύνεται.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της σαλμονέλλας συνήθως χωρίζονται στις:

- ο κλασσικές μικροβιολογικές που χρησιμοποιούν καλλιεργητικές τεχνικές και παραμένουν στις μεθόδους αναφοράς που αναγνωρίζονται από τις ελεγκτικές αρχές
- ο ανοσολογικές που στηρίζονται στη χρήση αντισωμάτων. Κάποια τέτοια μέθοδος απαιτείται έστω και στο τελικό στάδιο της ταυτοποίησης του στελέχους που απομονώνεται για να βρεθεί ο ορολογικός του τύπος
- ο μοριακές που στηρίζονται στην ανίχνευση κάποιας ακολουθίας DNA που είναι χαρακτηριστική για το παθογόνο. Οι μέθοδοι αυτοί συχνά χρησιμοποιούν κάποια παραλλαγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης του *Salmonella* spp.

Η μεθοδολογία που ακολουθείται για την ανίχνευση της σαλμονέλλας με καλλιεργητική τεχνική βασίζεται στα ακόλουθα βήματα:

Βήμα 1: Προ-εμπλουτισμός

Εμβολιασμός με το δείγμα στο υλικό του προ-εμπλουτισμού, που συνήθως είναι πεπτονούχο νερό (buffered peptone water) σε αναλογία 1 μέρος δείγμα: 9 μέρη υλικό προ-εμπλουτισμού. Ακολουθεί επώαση στους 35-37°C για 16-20 ώρες. (Ημέρα 0)

Βήμα 2: Εμπλουτισμός

Εμβολιασμός από το υλικό του προ-εμπλουτισμού σε υλικό εμπλουτισμού. Πολύ συχνά επιλέγονται 2 τέτοια υλικά για να μην αποκλειστούν στελέχη που δεν ενισχύονται με το ένα μόνο υλικό εμπλουτισμού. Συνήθως είναι το Rappaport –Vasiliadis broth (R-V) σε αναλογία 1:100, το Selenite-Cysteine υλικό (SC) σε αναλογία 1: 10, το Tetrathionate broth (TT) σε αναλογία 1: 10.

Το R-V περιέχει πράσινο του μαλαχίτη και χλωριούχο μαγνήσιο σε συγκεντρώσεις οι οποίες παρεμποδίζουν την αύξηση των μικροοργανισμών που κατοικούν στο έντερο, όχι όμως και των στελεχών *Salmonella* (με κάποιες εξαιρέσεις όπως τα *S. typhi* και *S. paratyphi*). Επωάζεται στους 42°C για 24 ώρες ή περισσότερο εάν χρειαστεί (24 ώρες).

Το θρεπτικό υλικό TT, περιέχει χολικά άλατα τα οποία παρεμποδίζουν τους μικροοργανισμούς οι οποίοι δεν αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου. Το tetrathionate παρεμποδίζει πολλά εντερικά βακτήρια (εκτός από αυτά που έχουν την ικανότητα να το ανάγουν όπως το *Salmonella* sp.). Η προσθήκη brilliant green παρεμποδίζει τα gram+ βακτήρια καθώς και κάποια είδη του γένους *Proteus* τα οποία είναι ανθεκτικά στα χολικά άλατα και μπορούν να ανάγουν το tetrathionate.

Επωάζεται στους 42°C για 24 ώρες ή περισσότερο εάν χρειαστεί (24 ώρες).

(Ημέρα 1)

Βήμα 3: Επίστρωση σε εκλεκτικά υλικά

Γίνεται γραμμική διασπορά σε τρυβλία με εκλεκτικά υποστρώματα από τους θετικούς σωλήνες του εμπλουτισμού. Τα υποστρώματα αυτά μπορεί να είναι το Xylose Lysine Desoxycholate agar (XLD), το Salmonella Shigella agar (S.S), το Bismuth Sulfite agar (BS) ή και άλλα. Η επώαση γίνεται στους 35 ή 37°C για 24 ώρες ή περισσότερο εάν χρειαστεί. Συνήθως χρησιμοποιούνται δύο ή τρία υλικά έτσι ώστε να μην αποκλειστούν στελέχη που είναι ευαίσθητα σε κάποιον από τους ανασταλτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται στα υλικά αυτά.

Στο XLD υπόστρωμα περιέχεται ο δείκτης pH ερυθρό της φαινόλης, ο οποίος προκαλεί αλλαγή στο χρώμα του υποστρώματος σε κίτρινο όταν κάποια αποικία (εντεροβακτήρια) ζυμώνει τα σάκχαρα που περιέχει (ξυλόζη, λακτόζη, σακχαρόζη) και παράγει οξέα με αποτέλεσμα να μειώνεται το pH. Επίσης οι αποικίες που διαθέτουν το ένζυμο αποκαρβοξυλάση της λυσίνης (αρκετά στελέχη σαλμονέλλας) μετατρέπουν την λυσίνη σε κανταβερίνη και εμφανίζουν γύρω από τις αποικίες ροζ-βιολετί χρώμα λόγω της αύξησης του pH. Έτσι ανάλογα με την χρονική στιγμή που γίνεται η παρατήρηση μπορεί ο δείκτης του pH να εμφανίζει διαφορετικές αποχρώσεις, από κίτρινο σε κόκκινο μετά από παρατεταμένη επώαση.

(Ημέρες 2^η και 3^η)

Βήμα 4: Έλεγχος για την παρουσία τυπικών αποικιών σαλμονέλλας στα διαφορετικά υποστρώματα

Στο στάδιο αυτό γίνεται έλεγχος για την παρουσία τυπικών αποικιών και πιθανόν να χρειάζεται να γίνουν και κάποιες πρώτες βιοχημικές δοκιμές.

(Ημέρες 3 ή 4 ανάλογα με το υπόστρωμα).

Βήμα 5: Καθαρισμός των ύποπτων αποικιών

Διαδοχικές προσπάθειες γραμμικής διασποράς των ύποπτων αποικιών έτσι ώστε να ληφθούν μεμονωμένες αποικίες. Η διαδικασία γίνεται σε κάποιο γενικό υπόστρωμα όπως το Nutrient agar και τα τρυβλία επωάζονται στους 35 ή 37°C για 24 ώρες

(Ημέρες 4-6)

Βήμα 6: Ταυτοποίηση του στελέχους και του αντιγονικού τύπου

Γίνεται η επιβεβαίωση του βιοχημικού προφίλ του στελέχους και η ανίχνευση των O ή H αντιγόνων. Επίσης μπορεί σε αυτό το στάδιο να γίνει η ταυτοποίηση του στελέχους με μοριακές τεχνικές κυρίως με pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ή με κάποια τεχνική PCR. Επίσης εξετάζεται και η ευαισθησία του σε διάφορα αντιβιοτικά, έτσι ώστε να είναι γνωστές οι πιθανές ανθεκτικότητες που μπορεί να φέρει

(Ημέρες 5-7)

Η διάρκεια που χρειάζονται όλες αυτές οι καλλιεργητικές τεχνικές είναι από 5 έως 7 ημέρες, χρονικό διάστημα που τις περισσότερες φορές είναι μεγάλο για να ληφθεί κάποια απόφαση σχετικά με την τύχη των δειγμάτων.

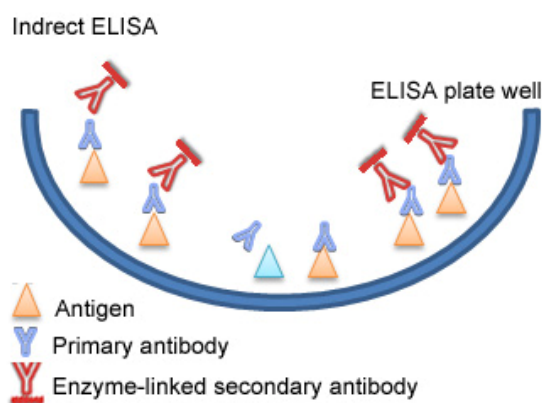
Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης της σαλμονέλλας

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των μεθοδολογιών αυτών είναι ότι είναι πιο γρήγορες και ότι σε ζωντανούς οργανισμούς (π.χ. ζώα κτηνοτροφής) η παρουσία του παθογόνου μπορεί να μην είναι σταθερή, ενώ η παραγωγή αντισωμάτων παραμένει για μεγαλύτερα διαστήματα, άρα είναι δυνατή και η ανίχνευσή της. Μειονέκτημα βέβαια είναι ότι η συγκέντρωση του αντισώματος μπορεί να είναι τέτοια που να μην είναι ικανή η μέθοδος να την ανιχνεύσει, ιδιαίτερα κατά το πρώτο διάστημα της μόλυνσης από το παθογόνο.

Οι σύγχρονες ανοσολογικές μέθοδοι για την ανίχνευση της σαλμονέλλας συνδυάζονται με την τεχνική ELISA και την ελαχιστοποίηση των όγκων των

αντιδραστηρίων σε αντίστοιχα kits. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στις έμμεσες μεθόδους και στις ανταγωνιστικές μεθόδους (Barrow, 1994).

Στις έμμεσες μεθόδους το αντιγόνο βρίσκεται ήδη συνδεδεμένο στο «πηγάδι» του ειδικού πλακιδίου και μετά την προσθήκη ειδικού αντιδραστηρίου που μειώνει τις μη-ειδικές συνδέσεις με το αντίσωμα, προστίθενται τα δείγματα. Η αντίδραση του ειδικού αντιγόνου με το αντίσωμα ανιχνεύεται με κάποια άλλη αντίδραση, μέσω της σύνδεσης του αντισώματος με κάποιο ένζυμο και δίνει τελικά κάποιο σήμα χρωματικό ή φθορισμού. Υπάρχει και εδώ μία ποικιλία μεθόδων για την ανίχνευση της σύνδεσης. Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν λιποπολυσακχαρίδια από το κυτταρικό τοίχωμα (LPS), αντιγόνα από τα μαστίγια, SEF14 ινίδια, αλλά ακόμη και πιο ακατέργαστα μίγματα αντιγόνων του παθογόνου (Barrow, 1994).

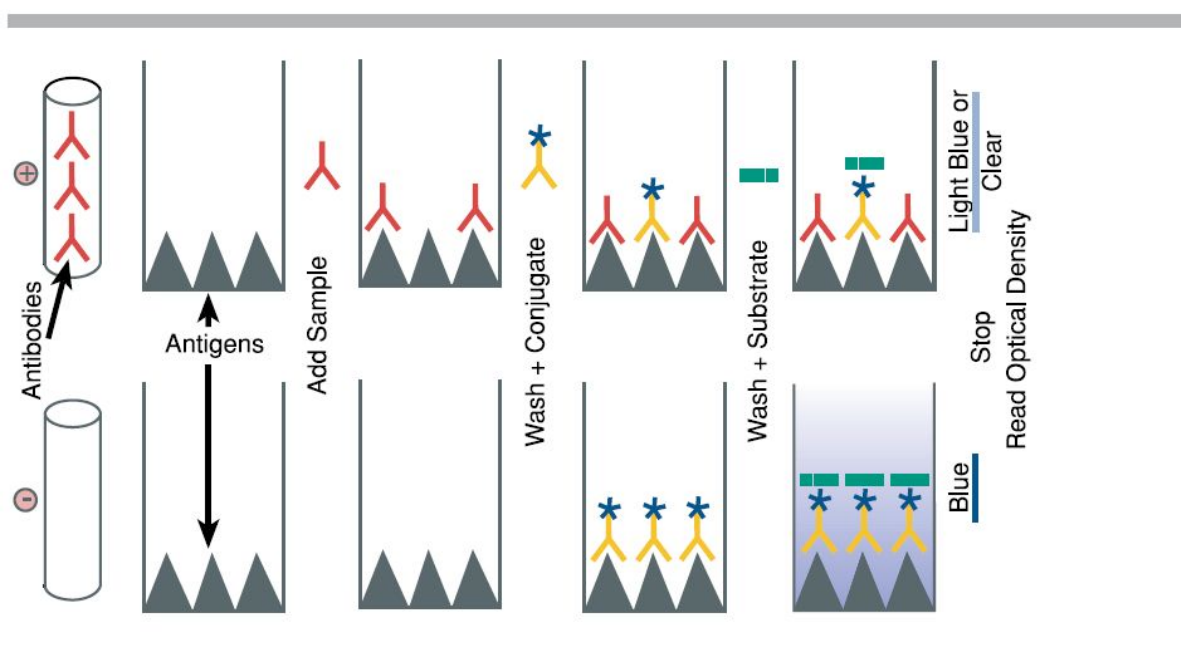


Εικόνα 3: Αρχή λειτουργίας της έμμεσης μεθόδου ELISA (Πηγή:www.elisa-antibody.com)

Στις ανταγωνιστικές μεθόδους γίνεται επώαση του αντισώματος με το δείγμα που περιέχει πιθανά το αντιγόνο. Στη συνέχεια αυτό το μίγμα προστίθεται στο «πηγάδι» του ειδικού πλακιδίου, όπου υπάρχει το ίδιο αντιγόνο. Γίνεται ξέπλυμα της περίσσειας του αντισώματος που δεν έχει προσδεθεί. Όσο πιο πολύ ποσότητα αντιγόνου περιέχεται στο δείγμα, τόσο λιγότερο αντίσωμα θα περισσέψει για να αντιδράσει με το αντιγόνο που υπήρχε στο πλακίδιο. Ακριβώς σε αυτή την ιδέα στηρίζεται και η έννοια του ανταγωνισμού, για τις θέσεις πρόσδεσης (Barrow, 1994).

Στη συνέχεια προστίθεται αντίσωμα προσδεμένο με κάποιο ένζυμο. Ακολουθεί η προσθήκη του υποστρώματος για το ένζυμο και η αντίδραση με παρατήρηση χρώματος ή φθορισμού. Όσο πιο πολύ αντιγόνο υπάρχει στο δείγμα τόσο πιο μικρότερο σήμα θα δώσει η αντίδραση.

Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να χρησιμοποιηθούν δείγματα που είναι πιο ακατέργαστα και πάλι να υπάρχει μεγάλη εξειδίκευση στην αντίδραση. Συνήθως όμως είναι και πιο ακριβή, σε σχέση με την προηγούμενη μέθοδο.



Εικόνα 4: Αρχή λειτουργίας της ανταγωνιστικής μεθόδου ELISA (Πηγή: www.elisa-antibody.com)

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης της σαλμονέλλας

Η ανίχνευση της σαλμονέλλας σε ύποπτα δείγματα πολύ συχνά τα τελευταία χρόνια γίνεται με την χρήση μοριακών τεχνικών, κυρίως δηλαδή με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ή και με την δυνατότητα καταμέτρησης του παθογόνου στο δείγμα με την χρήση της real-time PCR ή qPCR.

Το σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι ότι είναι σύντομες και ευαίσθητες.

Απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και μεγάλη προσοχή στην χρήση ιδιαίτερα της real-time PCR, λόγω της ευαισθησίας που έχει ως μέθοδος. Το πρόβλημα που συνήθως πρέπει να ξεπεραστεί είναι η ύπαρξη αναστολέων στο δείγμα που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα!

Πρέπει να γίνει κατανοητό ότι με τις μεθόδους αυτές δεν είναι εφικτή η απομόνωση του στελέχους και η ταυτοποίησή του. Για την απομόνωση και την διατήρηση του παθογόνου απαιτούνται καλλιεργητικές τεχνικές. Βεβαίως μπορεί να χρησιμοποιηθούν μοριακές τεχνικές μόνο για το τελικό στάδιο της ταυτοποίησης (Velusamy et al., 2010; Oliveira et al., 2003).

Η αρχή λειτουργίας όλων των μεθόδων PCR που προτείνονται από τη διεθνή βιβλιογραφία και υπάρχουν πολλές υπό την μορφή εμπορικών kits είναι η εξής:

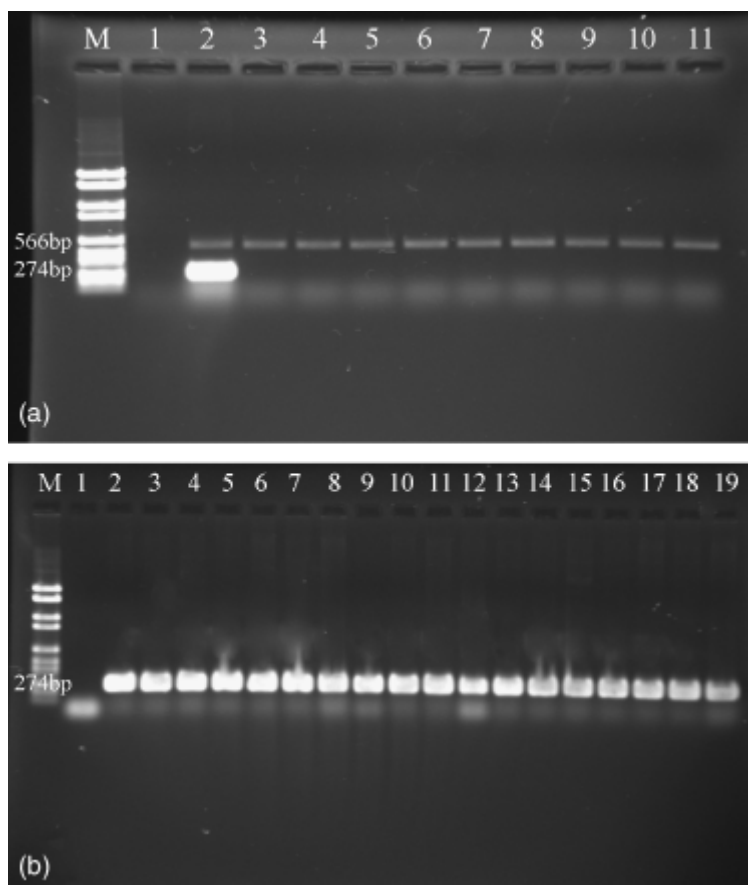
Βήμα 1. Προετοιμασία δείγματος για την απομόνωση του DNA. Στο στάδιο αυτό υπάρχουν πολλές παραλλαγές οι οποίες εξαρτώνται από την φύση του δείγματος (κόπρανα, αίμα, τρόφιμα κ.α.). Πολλοί ερευνητές προτείνουν να προηγείται της απομόνωσης του DNA ένα στάδιο εμπλουτισμού με κάποιο από τα υλικά εμπλουτισμού που χρησιμοποιούνται στις καλλιεργητικές μεθόδους (Rappaport –Vasiliadis broth κ.α.), διότι επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ευαισθησία στη μέθοδο. Σίγουρα το στάδιο αυτό εκτός των άλλων περιλαμβάνει ομογενοποίηση του δείγματος.

Βήμα 2. Απομόνωση του DNA. Το στάδιο αυτό ανάλογα με την μορφή του δείγματος μπορεί να περιλαμβάνει βρασμό και προσθήκη απορρυπαντικών (π.χ. Triton) ή εάν πρόκειται για πιο δύσκολα δείγματα, ακολουθείται πέρασμα του δείγματος μέσα από ειδικές mini-στήλες που κρατούν τους αναστολείς

Βήμα 3. Ενίσχυση της ακολουθίας DNA. Η ακολουθία αυτή μπορεί να χαρακτηρίζει ένα συγκεκριμένο στέλεχος σαλμονέλλας ή είναι γενικό χαρακτηριστικό του γένους αυτού. Η μέθοδος που ακολουθείται για την εκλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος DNA ονομάζεται PCR και για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικά μόρια εκκινητές (ολιγονουκλεοτίδια), τα οποία υποδεικνύουν στο ένζυμο (DNA πολυμεράση) ποιο τμήμα του DNA θα αντιγράψει πολλές φορές, έτσι ώστε να ενισχυθεί και να είναι δυνατή η ανίχνευσή του. Από τη βιβλιογραφία προτείνονται αρκετοί εκκινητές που

συνήθως στοχεύουν στην περιοχή εκείνη του βακτηριακού χρωμοσώματος που κωδικοποιούνται αρκετοί παράγοντες παθογένειας και ονομάζεται νήσος παθογένειας (pathogenicity island) . Από τα πιο χρησιμοποιημένους εκκινητές είναι αυτοί που στοχεύουν στο γονίδιο *invA* σε μία περιοχή 284bp.

Βήμα 4. Αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της PCR γίνονται ορατά μετά από ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων και εντοπισμό της ζώνης εκείνης του DNA που έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Εάν πρόκειται για real-time PCR, τότε τα αποτελέσματα δίνονται μετά και από ποσοτικοποίηση του δείγματος. Για τον σκοπό αυτό πρέπει να γίνεται παράλληλα και κάποια πρότυπη καμπύλη ενός ή κάποιων στελεχών του γένους σαλμονέλλα (Oliveira et al., 2003; Halatsi et al., 2006).



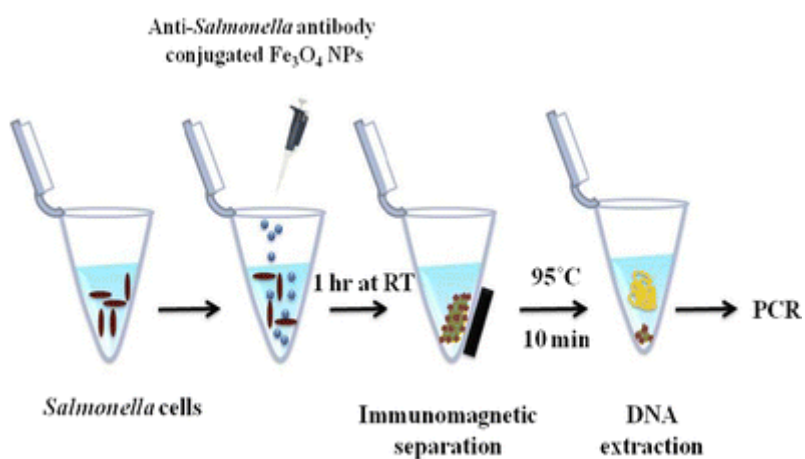
Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την ανίχνευση *Salmonella* spp.. (Πηγή: Halatsi et al., 2006)

A) Δείγματα 1-11: 1. αρνητικός μάρτυρας, 2, *Salmonella enterica* (positive control); 3, *Escherichia coli*; 4, *Shigella dysenteriae*; 5, *Klebsiella pneumoniae*; 6, *Listeriamonocytogenes*; 7, *Pseudomonas aeruginosa*; 8, *Campylobacter jejuni*; 9, *Citrobacter freundii*; 10, *Proteus mirabilis*; 11, *Bifidobacterium longum*.

(b) PCR using as template DNA from *Salmonella* strains. Lanes 1–19: 1, negative control; 2–10, *S. Senftenberg*, 11; *S. Liverpool*; 12, *S. enterica* ssp. *arizonae*; 13, *S. Enteritidis*; 14, *S. enterica* ssp. *salamae*; 15, *S. Choleraesuis*; 16, *S. Typhimurium*; 17, *S. Blockley*; 18, *S. ParatyphiB* var. *Java*; 19, *S. Muenchen*. M: pBR 328/HinfI/BglII DNA ladder (size marker)

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία μεθόδων για την ανίχνευση της σαλμονέλλας που συνδυάζει διαφορετικές τεχνικές. Όπως ανοσολογικές με μοριακές ή καλλιεργητικές με κάποια άλλη κατηγορία.

Ένα τέτοιο παράδειγμα παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα και περιγράφει μία μέθοδο που συνδυάζει ανοσολογικές και μοριακές τεχνικές. Η μέθοδος συνδυάζει μαγνητικά νανο-σωματίδια καλυμμένα με πυρίτιο και ακινητοποιημένα με αντισώματα για τη *Salmonella* spp., έτσι ώστε να γίνει ο διαχωρισμός με μαγνητισμό των κυττάρων της σαλμονέλλας. Ακολουθεί multiplex PCR ή real-time PCR (Bakthavathsalam P et al., 2013)



Εικόνα 6. Αρχή λειτουργίας της ανοσο-μαγνητικής μεθόδου ανίχνευσης της σαλμονέλλας. (Πηγή: Bakthavathsalam P. et al., 2013)

***Escherichia coli* O157:H7**

Χαρακτηριστικά του παθογόνου

Το *Escherichia coli* αποτελεί μέλος του εντερικού μικροβιόκοσμου του ανθρώπου και των ζώων, σε ποσοστό λιγότερο από 1% του συνόλου και αριθμεί περίπου 10^8 κυτ/g υλικού του εντέρου των ενηλίκων. Μεταδίδεται από την μητέρα στο νεογνό κατά τον τοκετό και είναι από τα πρώτα είδη που εποικίζουν το έντερο.

Είναι Gram αρνητικός βάκιλλος, ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και δεν σχηματίζει ενδοσπόρια, ενώ συνήθως έχει αυτόνομη κίνηση (περίτριχα μαστίγια). Ζυμώνει τους υδατάνθρακες και παράγει οξέα ή οξέα και αέρια, δεν διαθέτει οξειδάση, ενώ διαθέτει καταλάση και ανάγει τα νιτρικά ιόντα σε νιτρώδη.

Για την πλήρη ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώνονται είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του ορότυπου. Έχουν αναγνωριστεί περίπου 170 αντιγόνα από το κυτταρικό τοίχωμα (O), περίπου 50 αντιγόνα από το μαστίγιο (H) και πάνω από 70 αντιγόνα από το έλυτρο (K).

Τα περισσότερα στελέχη του *Escherichia coli* δεν είναι παθογόνα, αλλά κάποια στελέχη έχουν συνδεθεί με παθογένεια και ιδιαίτερα με εκδήλωση διάρροιας.

Οι κατηγορίες παθογόνων *E.coli* είναι οι εξής:

Εντεροπαθογόνο (Enteropathogenic-EPEC)

Εντεροτοξικό (Enterotoxigenic-ETEC)

Εντερο-διηθητικό (Enteroinvasive-EIEC)

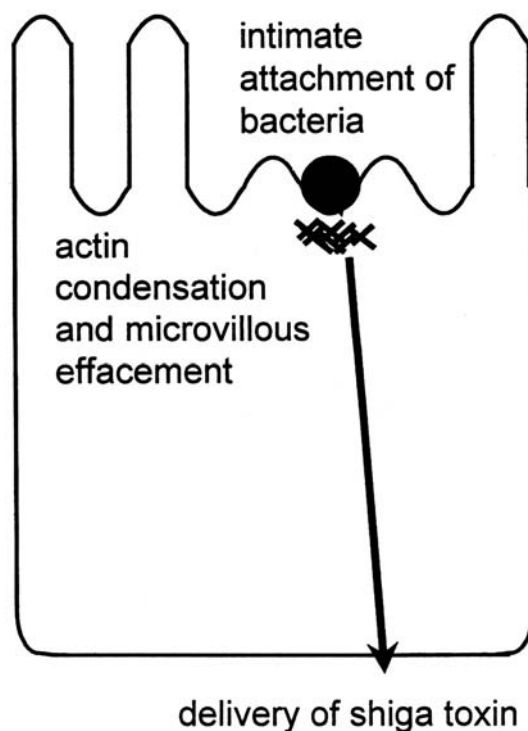
Εντεροαιμορραγικό (Enterohaemorrhagic-EHEC)

Εντεροσυσσωρευτικό (Enteroadgregative-EAEC) και το (Diffusely adherent-DAEC)

Τα στελέχη που ανήκουν στην κατηγορία των εντεροαιμορραγικών (EHEC) προκαλούν περιστατικά αιμορραγικής διάρροιας και μάλιστα μετά από την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή πόσιμου νερού. Οι πιο γνωστοί ορότυποι αυτών των στελεχών είναι ο O26, O111 και ο O157, αλλά υπάρχουν και άλλοι. Όλα τα στελέχη αυτής της κατηγορίας παράγουν κυτταροτοξικούς παράγοντες για τα νεφρικά κύτταρα (Vero) του πράσινου αφρικανικού

πιθήκου και ονομάζονται βεροτοξίνες (vero) ή Shiga –τοξίνες λόγω της ομοιότητάς τους με την τοξίνη που παράγει το *Shigella dysenteriae* (Stxs).

Ο τρόπος δράσης σε κυτταρικό επίπεδο του πιο χαρακτηριστικού και γνωστού παθογόνου της ομάδας αυτής, του O157:H7 είναι ο ακόλουθος: προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο προκαλώντας πληγές και καταστρέφοντας τις μικρολάχνες τοπικά και εισέρχεται στα κύτταρα όπου παράγει τοξίνες Shiga, οι οποίες διαφεύγουν από τον εντερικό αυλό και προκαλούν γενικευμένες βλάβες. Πιστεύεται ότι οι τοξίνες αυτές καταστρέφουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ιδιαίτερα αυτά των νεφρών



Εικόνα 7: Τρόπος δράσης του εντεροαιμορραγικού στελέχους *Escherichia coli* O157:H7

Ασθένεια

Ο χρόνος επώασης της ασθένειας είναι 3-9 ημέρες και η διάρκεια των συμπτωμάτων μπορεί να κρατήσει 2-9 ημέρες.

Τα συμπτώματα ξεκινούν με υδαρή διάρροια που γρήγορα καταλήγει σε αιμορραγική κολίτιδα (σοβαρούς κοιλιακούς πόνους, αιμορραγική διάρροια, εμετός, όχι πυρετός).

Από τους ασθενείς ένα ποσοστό περίπου 5-10% εκδηλώνει θρόμβωση σε μικροαγγεία που μπορεί να καταλήξει σε αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο. Το σύνδρομο αυτό οδηγεί σε οξεία θρομβοκυτταροπενία και ειδικά στα παιδιά σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια, αλλά εκτός από τους νεφρούς μπορεί να επηρεαστούν και άλλα όργανα.

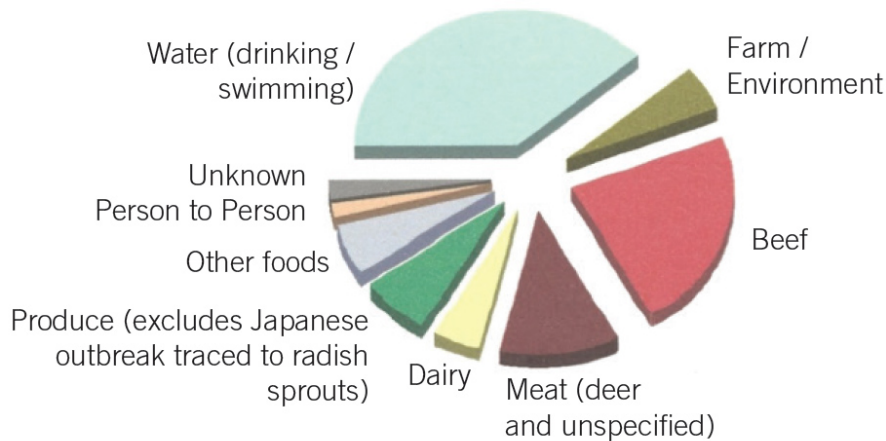
Η θνησιμότητα μπορεί να φθάσει περίπου το 3% των ασθενών.

Η δόση του παθογόνου που είναι απαραίτητη για να εκδηλωθεί ασθένεια πιστεύεται ότι είναι πολύ χαμηλή. Σε ξέσπασμα κρουσμάτων στις ΗΠΑ από κατανάλωση μολυσμένων προτηγανισμένων κεφτέδων το 1993, υπολογίστηκε ότι σε ένα γραμμάριο τροφίμου περιέχονταν 0.3 – 15 cfu του παθογόνου. Η μολυσματική δόση προτείνεται σε λιγότερο από 100 κύτταρα του παθογόνου (Montiville T & Matthews K., 2010).

Επιδημιολογία

Υπολογίζεται ότι το *E. coli* O157:H7 προκαλεί κάθε χρόνο στις ΗΠΑ περίπου 73.500 περιστατικά. Κατά την περίοδο 1982-2002 αναφέρθηκαν στο Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Επιδημιών (CDC) 350 ξεσπάσματα της ασθένειας σε 49 πολιτείες, όπου είχαν ως αποτέλεσμα να ασθενήσουν 8.598 άνθρωποι, εκ των οποίων οι 1493 να χρειαστεί να εισαχθούν στο νοσοκομείο. Από αυτά τα περιστατικά, 354 παιδιά έπαθαν αιμολυτικό – ουρεμικό σύνδρομο και 40 απεβίωσαν (0,4%) (Rangel et al., 2005).

Η κύρια πηγή μόλυνσης είναι η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8



Εικόνα 8: Συχνότητα περιστατικών *E. coli* O157:H7 διεθνώς, κατά τα έτη 1982-2006 και πηγή μόλυνσης του παθογόνου

(Πηγή: Food Research Institute, UW-Madison, August/October 2006)

Επικίνδυνα τρόφιμα

Τα πιο επικίνδυνα τρόφιμα για την μετάδοση του παθογόνου, διαφέρουν μεταξύ των χωρών και αντανακλούν τις διαιτολογικές συνήθειες των κατοίκων. Για παράδειγμα το μεγαλύτερο ξέσπασμα εντεροαιμορραγικής κολίτιδας που οφείλονταν στο *E. coli* O157:H7 συνέβη στην Ιαπωνία (Sakai) το 1996, με 7.966 περιστατικά, από τα οποία 2.764 ήταν μικροβιολογικά ελεγμένα και 106 από αυτά εξελίχθηκαν σε αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο. Η πηγή μόλυνσης ήταν φύτρα από άσπρο ραπανάκι. Στις ΗΠΑ και σε άλλες δυτικές χώρες, η πηγή μόλυνσης είναι κυρίως το κρέας και πιο ειδικά το μοσχάρι κρέας. Επίσης τα γαλακτοκομικά προϊόντα συχνά γίνονται φορέας του παθογόνου, αλλά ακολουθούν και μία σειρά από άλλα τρόφιμα όπως φρούτα και λαχανικά, χυμός μήλου (Pennington H., 2010).

Προβλήθηκε ιδιαίτερα από τα μέσα μαζικής ενημέρωσης το τελευταίο πολύ σοβαρό ξέσπασμα στην Γερμανία το 2011 από την κατανάλωση αγγουριών, άγνωστης τελικά προέλευσης. Το παθογόνο σε αυτή την περίπτωση ήταν διαφορετικό στέλεχος του *E.coli*, το O104:H4 και το οποίο φαίνεται ότι προκαλεί μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών με αιμολυτικό – ουρεμικό σύνδρομο (22%).

Μέθοδοι Ανίχνευσης του *E. coli* O157:H7

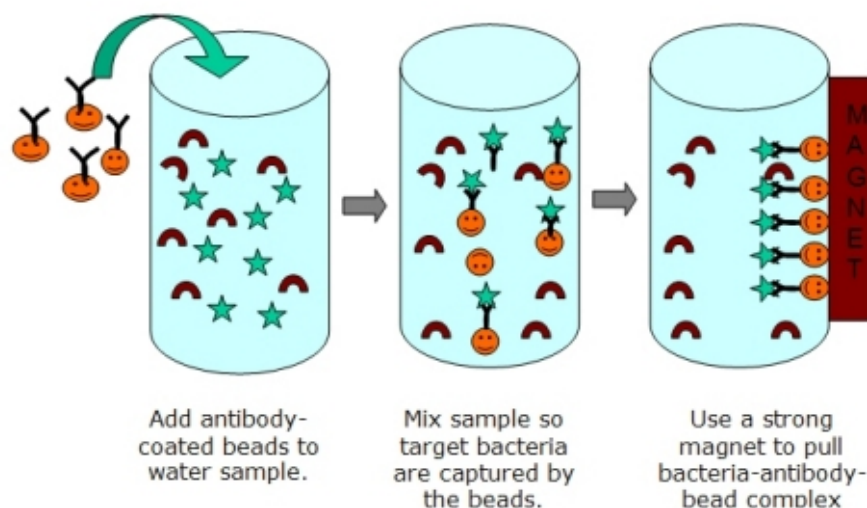
Οι μέθοδοι ανίχνευσης του *E. coli* O157:H7 χρειάζεται να είναι πολύ ευαίσθητες για τον εντοπισμό του παθογόνου, μεταξύ των άλλων μικροοργανισμών ανταγωνιστών στα περιβαλλοντικά ή στα κλινικά δείγματα. Στη βιβλιογραφία προτείνονται αρκετές μέθοδοι που είτε ακολουθούν καλλιεργητικές τεχνικές σε συνδυασμό με ανοσολογικό προσδιορισμό του στελέχους, είτε ανοσολογικές τεχνικές, είτε μοριακές τεχνικές και διάφοροι συνδυασμοί αυτών. Υπάρχουν μάλιστα στην αγορά διαθέσιμα αρκετά εμπορικά kits που βοηθούν ως προς τον περιορισμό του όγκου των δειγμάτων, την ταχύτητα και αυξάνουν την ευαισθησία (Bell C. & Kyriakides A., 2002a).

Κλασικές μέθοδοι ανίχνευσης του *E. coli* O157:H7

Η λογική των μεθόδων αυτών μπορεί να συμπυκνωθεί στο ακόλουθο σχήμα:

1. Εμπλουτισμός. Εμβολιασμός του αντίστοιχου υποστρώματος π.χ. το modified Tryptone Soya broth με novobiocin και επώαση στους 41.5°C για 22 ώρες περίπου
 2. Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός των κυττάρων. Γίνεται με την χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων για 6 ώρες, όπου δεσμεύονται τα κύτταρα του παθογόνου
 3. Μεταφορά με επίστρωση σε εκλεκτικά υποστρώματα (Sorbitol Mac Conkey agar+ cefixime +potassium tellurite, Sorbitol Mac Conkey agar+ cefixime + rhamnose) και επώαση για 24 ώρες στους 37 °C.
 4. Έλεγχος αποικιών και καθαρισμός των ύποπτων στελεχών σε κάποιο γενικό θρεπτικό υλικό. Επώαση για 24 ώρες στους 37 °C.
 5. Ταυτοποίηση των ύποπτων στελεχών με κάποια ανοσολογική τεχνική και πιθανόν προσδιορισμός του βιοχημικού προφίλ του στελέχους. Επώαση
Στα περισσότερα εργαστήρια που ασχολούνται με τον επιδημιολογικό έλεγχο γίνεται περαιτέρω ταυτοποίηση του στελέχους με ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων παλλόμενου πεδίου (PFGE) .
 6. Αποτελέσματα
- (Bell C. & Kyriakides A., 2002a)

Θεωρείται ότι οι κλασικές μέθοδοι δεν μπορούν να ανιχνεύσουν το παθογόνο όταν είναι σε πολύ μικρή ποσότητα κυττάρων και δεν ανιχνεύουν πάντα τα στελέχη του *E.coli* που παράγουν την τοξίνη, αλλά δεν είναι O157:H7



Εικόνα 9: Αρχή του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού των βακτηριακών κυττάρων (Πηγή: http://oh.water.usgs.gov/micro_ims_atp_method.htm)

Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης

Οι μέθοδοι που προτείνονται είναι μέθοδοι ELISA και στοχεύουν στον εντοπισμό των shiga τοξινών Stx1 και Stx2, και των αντιγόνων O157 που βρίσκονται στο στρώμα των λιπολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος του παθογόνου.

Οι μέθοδοι αυτοί είναι πιο σύντομες, αλλά δεν επιτρέπουν την απομόνωση του παθογόνου και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του (Bell C. & Kyriakides A., 2002a).

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης

Οι μέθοδοι αυτοί στηρίζονται στην χρήση PCR για την ενίσχυση και ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων του παθογόνου, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη σύνθεση των τοξινών shiga. Επίσης άλλες μέθοδοι προτείνουν την ταυτόχρονη ενίσχυση και ανίχνευση περισσότερων γονιδίων με τη βοήθεια

περισσότερων ζευγών εκκινήτων (multiplex-PCR). Με την τελευταία μεθοδολογία γίνεται συνδυασμός των θετικών σημάτων και πιθανή ανίχνευση στελεχών που παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες, όπως παραγωγή τοξίνης αλλά διαφορετικών αντιγονικών τύπων (Louie M., et al., 2000). Συχνά στις μεθόδους αυτές για να αυξηθεί η ευαισθησία τους, προτείνεται και κάποιο στάδιο εμπλουτισμού πριν από την απομόνωση του DNA από το δείγμα.

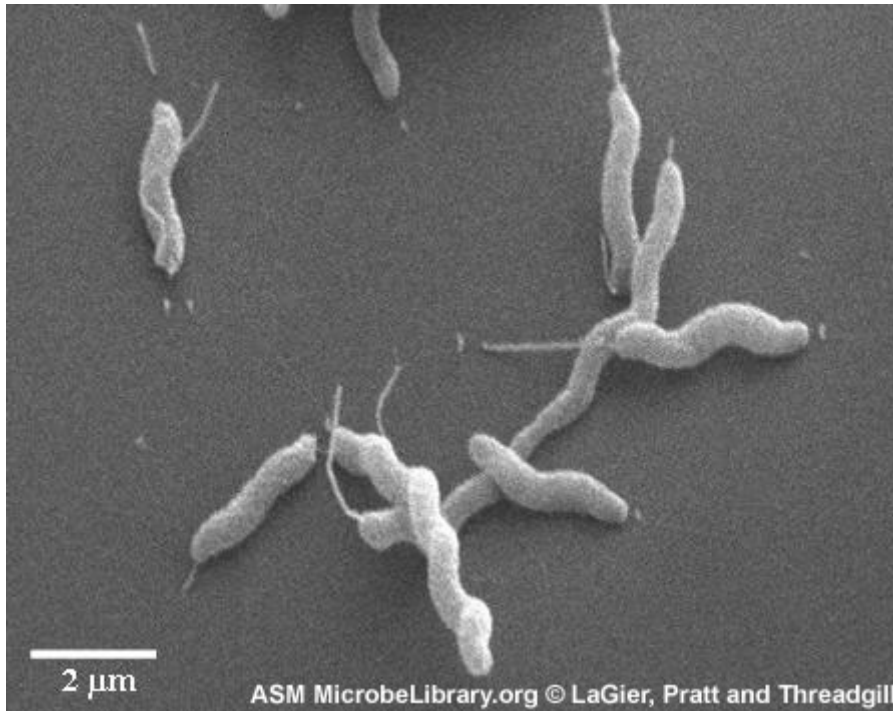
Campylobacter jejuni

Χαρακτηριστικά του παθογόνου

Το γένος *Campylobacter* περιλαμβάνει Gram αρνητικά σπειρίλλια, που δεν σχηματίζουν ενδοσπόριο. Το είδος *C.jejuni* είναι το πιο γνωστό από τα 20 είδη και υπο-είδη του γένους, έχει αυτόνομη κίνηση με ένα μαστίγιο στον ένα πόλο ή δύο μαστίγια, από ένα στον κάθε πόλο.

Είναι μικρο-αερόφιλα βακτήρια και θεωρείται θερμόφιλο (άριστη θερμοκρασία 37-42 °C), αφού δεν μεγαλώνει σε θερμοκρασία μικρότερη των 30°C (Montville T & Matthews K., 2010).

Διαθέτει μεγάλη ποικιλία στους φαινότυπους των στελεχών που απομονώνονται από διαφορετικά περιβαλλοντικά δείγματα, όπως ανθεκτικότητα ως προς την υψηλή θερμοκρασία, ποικιλία στην ικανότητα προσκόλλησης στο υπόστρωμα, στην παραγωγή τοξινών κλπ. Αυτό πιθανά να οφείλεται στην αυξημένη δυνατότητα για ανταλλαγή γενετικού υλικού που εμφανίζουν τα στελέχη του, ιδιαίτερα μέσα στο πυκνοκατοικημένο εντερικό περιβάλλον στα θηλαστικά και στα πτηνά. Το φαινόμενο αυτό διαπιστώνεται και από τους διαφορετικούς γονότυπους που ελέγχονται με μοριακές τεχνικές (PFGE, ribotyping).



Εικόνα 10. Κύτταρα *Campylobacter jejuni* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Πηγή: <http://bioquest.org/peer2011/2011/08/using-imagej>)

Είναι αρκετά ευαίσθητο στην ακτινοβολία και στις υψηλές θερμοκρασίες. Έχει την ικανότητα να μετατρέπεται σε μορφές ληθαργικές που ονομάζονται ζωντανές αλλά μη-καλλιεργήσιμες (viable but non-culturable). Τα κύτταρα σε αυτή την κατάσταση μετατρέπονται σε κοκκοειδές σχήμα. Στην μορφή αυτή μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στην ανίχνευσή του, ιδιαίτερα με κάποια κλασική καλλιεργητική τεχνική (McClure P. & Blackburn C., 2002).

Ασθένεια

Το βακτήριο αυτό συνδέεται με μολύνσεις του εντερικού συστήματος και με κύριο σύμπτωμα τη διάρροια (με ή χωρίς αίμα), τον πυρετό και κοιλιακούς σπασμούς. Τα συμπτώματα αρχίζουν 24-72 ώρες μετά την κατανάλωση της μολυσμένης τροφής ή νερού και μπορεί να διαρκέσουν 5-8 ημέρες.

Οι προσβεβλημένοι από το παθογόνο μπορεί να μην εμφανίσουν καθόλου συμπτώματα έως να είναι σοβαρά ασθενείς. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αυτό-ιάσιμη νόσος. Οι ασθενείς όμως μπορεί να εμφανίσουν στη συνέχεια βακτηραιμία, μόλυνση του ουροποιητικού, μηνιγγίτιδα κ.α. Η

μόλυνση από το παθογόνο έχει συσχετιστεί και με περιστατικά εμφάνισης του συνδρόμου Guillain Barré, μετά από κάποιο διάστημα (McClure P. & Blackburn C., 2002).

Το σύνδρομο Guillain Barré (GBS) είναι μία φλεγμονώδης πολυνευρίτιδα με πόνο, πυρετό και αδυναμία που προοδευτικά γίνεται παράλυση και συχνά καταλήγει σε μακρά παραλυσία. Αναφέρεται ότι 1/1000 προσβεβλημένους από το *C.jejuni* εκδηλώνει το GBS. (Acheson D. & Allos B., 2001)

Επιδημιολογία

Θεωρείται από τα πιο συχνά εμφανιζόμενες αιτίες διάρροιας στις ΗΠΑ. Συνήθως πρόκειται για σποραδικά κρούσματα και όχι επιδημίες. Σύμφωνα με το CDC, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι περίπου 14 κρούσματα κάθε χρόνο ανά 100.000 πληθυσμό στις ΗΠΑ, αλλά πολλά περιστατικά δεν καταγράφονται. Υπολογίζεται ότι προσβάλλονται 1,3 εκατομμύρια άνθρωποι κάθε χρόνο (<http://www.cdc.gov>).

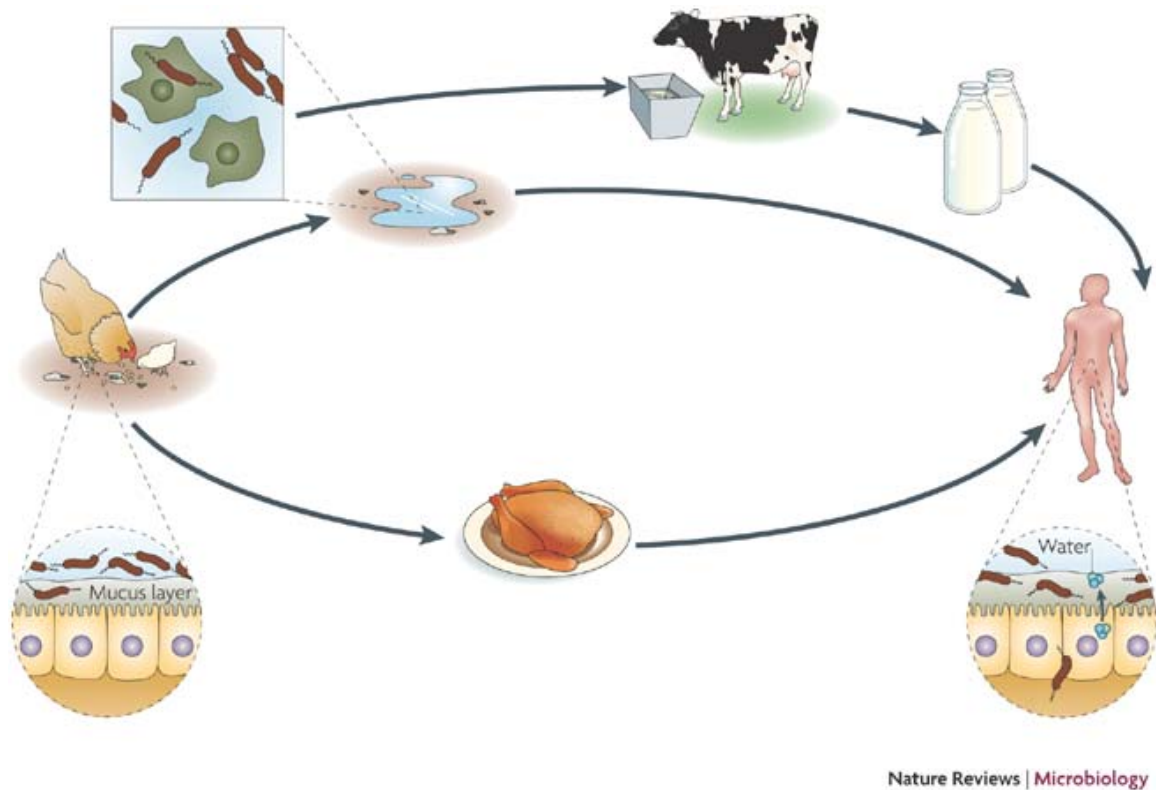
Σύμφωνα με την αντίστοιχη ευρωπαϊκή αρχή ελέγχου και πρόληψη των ασθενειών και την ετήσια έκθεση που δημοσιεύτηκε για τις ζωο-ανθρωπονόσους σε συνεργασία με την EFSA (European Food Safety Authority), προκύπτει ότι καμπυλοβακτηρίωση είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη ασθένεια για το 2012 (214.268 κρούσματα), αν και εμφάνισε μικρό ποσοστό κάμψης συγκρινόμενη με το 2011 (EFSA journal, 2014).

Η μολυσματική δόση του παθογόνου δεν είναι υψηλή, με λιγότερα από 1000 κύτταρα να προκαλούν την ασθένεια.

Επικίνδυνα τρόφιμα

Η καμπυλοβακτηρίωση συνδέεται στενά με την κατανάλωση μολυσμένου κοτόπουλου, όμως αρκετά άλλα κρέατα αποτελούν πηγές του παθογόνου για τον άνθρωπο. Επίσης, πολύ συχνά απομονώνεται από νερό πόσιμο μη-χλωριωμένο, όπου εκεί παραμένει σε μορφή βιώσιμη αλλά μη-καλλιεργήσιμη. Άλλα τρόφιμα που έχουν εμπλακεί σε ξεσπάσματα καμπυλοβακτηρίωσης είναι τα λαχανικά – σαλάτες, όπου η πηγή μόλυνσης είναι ή το κακής μικροβιολογικής ποιότητας νερό άρδευσης, ή το μέσο λίπανσης (κοπριά). Σε αυτά τα τρόφιμα παίζει πολύ σημαντικό ρόλο ότι δεν επεξεργάζονται θερμικά πριν από την κατανάλωσή τους. Πολύ σημαντικό ρόλο ιδιαίτερα σε πιο παλιές

επιδημίες έχει παίξει η κατανάλωση μη-παστεριωμένου γάλατος (McClure P. & Blackburn C., 2002; Montville T & Matthews K., 2010).



Εικόνα 11. Πηγές μόλυνσης του *Campylobacter jejuni* (Πηγή: Young et al., 2007)

Μέθοδοι ανίχνευσης του *Campylobacter jejuni*

Οι μέθοδοι ανίχνευσης του παθογόνου χωρίζονται σε καλλιεργητικές, όπου είναι δυνατή η απομόνωση του στελέχους και μετά η ταυτοποίησή του σε συνδυασμό με κάποια ανοσολογική ή μοριακή μέθοδο, σε ανοσολογικές και σε μοριακές.

Μέθοδοι ανίχνευσης του *Campylobacter jejuni* στηριζόμενες σε καλλιεργητικές τεχνικές

Το *Campylobacter jejuni* παρουσιάζει δυσκολίες στην καλλιέργειά του και στην διατήρησή του στο εργαστήριο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προτείνονται πολλές μέθοδοι και τροποποιήσεις μεθόδων για την απομόνωσή του και την καλλιέργειά του. Οι περισσότερες από αυτές χρησιμοποιούν

συστατικά που προφυλάσσουν τα κύτταρα του παθογόνου από τα τοξικά προϊόντα του οξυγόνου (αιμίνη, αίμα επεξεργασμένο, κάρβουνο κ.α.). Επίσης γίνεται προσπάθεια να αποφύγουν την τοξική δράση κάποιων εκλεκτικών υποστρωμάτων στα βιώσιμα αλλά μη-καλλιεργήσιμα κύτταρα (VBNC) που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα, έτσι ώστε να ανιχνευτούν και να καταμετρηθούν. Για τον λόγο αυτό συνήθως εφαρμόζεται ένα στάδιο προ-εμπλουτισμού που διαρκεί 4 ώρες και το οποίο επιτρέπει την ανασύσταση αυτών των ταλαιπωρημένων κυττάρων, πριν από την μεταφορά τους σε εκλεκτικά υποστρώματα.

Η γενική αρχή που ακολουθείται στη διεθνή standard μέθοδο είναι η ακόλουθη (McClure P. & Blackburn C., 2002):

1. Εμπλουτισμός σε υγρά υποστρώματα σε μικρο-αερόφιλες συνθήκες (Preston broth με επώαση στους 42°C για 18 ώρες ή στο Park και στο Sanders broth όπου προηγείται επώαση τους 32 °C για 4 ώρες πριν από την προσθήκη των αντιβιοτικών και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 2 ώρες και μεταφορά στους 42 °C για 40-42 ώρες)
2. Ακολουθεί γραμμική διασπορά σε 2 ή περισσότερα διαφορετικά εκλεκτικά υποστρώματα και επώαση στους 42 °C για πέντε ημέρες σε μικρο-αερόφιλες συνθήκες.
3. Ακολουθούν δοκιμές επιβεβαιωτικές στις ύποπτες αποικίες

Έχουν κατά καιρούς προταθεί αρκετές τροποποιήσεις στην μεθοδολογία αυτή, οι οποίες βελτιώνουν την ευαισθησία της μεθόδου, στοχεύοντας στην ανάκτηση των ευαίσθητων κυττάρων του παθογόνου. Η μεθοδολογία αυτή έχει το μειονέκτημα ότι απαιτεί αρκετό χρόνο για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και αρκετή εργαστηριακή δουλειά. Θεωρείται όμως ευαίσθητη και έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να απομονωθεί το παθογόνο στέλεχος.

Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης του *Campylobacter jejuni*

Υπάρχουν αρκετά διαγνωστικά τεστ στην αγορά που βασίζονται στην εξειδικευμένη αντίδραση του αντιγόνου – αντισώματος, που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση (επιβεβαιωτικά) κυρίως ύποπτων στελεχών που έχουν απομονωθεί από δείγματα.

Συνήθως τα εμπορικά kits περιέχουν εξειδικευμένες ανοσοσφαιρίνες συνδεδεμένες με latex για συγκεκριμένες πρωτεΐνες του είδους, για το αντιγόνο του μαστιγίου κλπ. Απαιτούνται 10^6 - 10^8 κυτ/μl για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Αρκετές φορές για να βελτιωθεί η αντίδραση, προηγείται στάδιο εμπλουτισμού.

Τα kits αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί και στην ανίχνευση του παθογόνου κατευθείαν στα δείγματα (τρόφιμα, κόπρανα), παρόλο που θεωρείται ότι δεν είναι αρκετά ευαίσθητη μεθοδολογία και υπάρχει κίνδυνος λανθασμένων αρνητικών δειγμάτων. Επίσης έχουν σημειωθεί και λανθασμένα θετικά δείγματα που οφείλονται άλλες φορές στη μη-εξειδικευμένη αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος, αλλά και στην πιθανή αντίδραση με βιώσιμα αλλά μη-καλλιεργούμενα κύτταρα (On, 1996).

Πιο πολύπλοκες ανοσολογικές μέθοδοι έχουν προταθεί, που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία. Στις μεθόδους αυτές συνδέεται η ανοσοσφαιρίνη με κάποιο ένζυμο (ELISA) και αφού γίνει η ενζυμική αντίδραση, στο τέλος γίνεται η καταμέτρηση φασματοφωτομετρικά κάποιου χρωμογόνου παράγοντα που παράγεται, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να γίνει και ποσοτικός υπολογισμός. Σε άλλες περιπτώσεις η ανοσοσφαιρίνη είναι σημασμένη με ανοσοφθορισμό και γίνεται καταμέτρηση μέσω της ακτινοβολίας.

Οι μέθοδοι αυτές έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να δώσουν γρήγορα απαντήσεις, είναι εύκολες στους εργαστηριακούς χειρισμούς και η παρουσίαση των αποτελεσμάτων δεν παρουσιάζει δυσκολίες (On, 1996).

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του *Campylobacter jejuni*

Αρκετές μέθοδοι ανίχνευσης του παθογόνου έχουν δημοσιευτεί τις τελευταίες δεκαετίες που βασίζονται στον εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, χαρακτηριστικών του μικροοργανισμού.

Μία κατηγορία μεθόδων χρησιμοποιεί τμήματα DNA ειδικά σχεδιασμένα για το είδος ως μόρια ανιχνευτές (probes). Η αρχή της μεθόδου αυτής είναι ότι και η ελάχιστη παρουσία των αντίστοιχων τμημάτων DNA στο δείγμα, θα οδηγήσει στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ομόλογων τμημάτων. Η αντίδραση αυτή του υβριδισμού ανιχνεύεται με διάφορους τρόπους στα διαφορετικά kits. Τα probes που συνήθως κυκλοφορούν είναι από την

περιοχή του 16SrRNA, αλλά αφορούν και άλλα γονίδια όπως της φλαγγελίνης, το *mapA* γονίδιο κ.α.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση στελεχών που μπορεί να έχουν απομονωθεί με κλασσική μεθοδολογία, ή ακόμη και με τις αντίστοιχες τροποποιήσεις να χρησιμοποιείται κατευθείαν για την ανίχνευση του μικροοργανισμού σε δείγματα. Στις περιπτώσεις αυτές, υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι η ευαισθησία της μεθόδου είναι κατώτερη της κλασσικής τεχνικής, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στον σχεδιασμό του probe ή και στην λανθασμένη αντίδραση του ανιχνευτή με οργανικά μόρια του δείγματος. Αντίθετα σε κάποιες περιπτώσεις η θετική αντίδραση που δεν εξακριβώθηκε με αντίστοιχο αποτέλεσμα με την καλλιεργητική τεχνική, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπήρχαν κύτταρα του παθογόνου βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα (On, 1996).

Μία δεύτερη πολύ πιο διαδεδομένη κατηγορία μεθόδων χρησιμοποιεί την τεχνική της PCR (αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης). Το πλεονέκτημα εδώ είναι ότι με τον σχεδιασμό σωστών μορίων εκκινητών μπορεί να γίνει ενίσχυση κάποιας ακολουθίας DNA, χαρακτηριστικής για το παθογόνο και στη συνέχεια να γίνει η ανίχνευσή της. Τα μόρια εκκινητές προέρχονται κυρίως από την περιοχή 16S rRNA και λιγότερο συχνά από την 23S rRNA, το *mapA*, το *flaA* γονίδιο του μικροοργανισμού.

Η μεθοδολογία αυτή προσφέρει μεγάλη εξειδίκευση και ταχύτητα στην λήψη των αποτελεσμάτων. Επίσης είναι πολύ ευαίσθητη μέθοδος, αλλά χρειάζεται πολλές φορές να γίνεται πολύ καλός καθαρισμός του DNA για να έχει αποτελεσματικότητα. Ένα από τα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν είναι ότι συχνά στα δείγματα υπάρχουν αναστολείς της διαδικασίας, οι οποίοι με κάποια επεξεργασία του δείγματος πρέπει να εξουδετερώνονται. Ο καθαρισμός του DNA είναι από τα σημαντικότερα βήματα για την επιτυχία της μεθόδου και εξαρτάται από το δείγμα στο οποίο ανιχνεύονται οι μικροοργανισμοί.

Επίσης η ευαισθησία της μεθόδου κάποιες φορές μπορεί να γίνει και μειονέκτημα διότι εάν υπάρχει κάποια μόλυνση DNA από λάθος χειρισμούς, τότε θα δώσει λανθασμένη θετικά απάντηση.

Μετά το πέρας της διαδικασίας ενίσχυσης της ακολουθίας του DNA, ακολουθεί είτε ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος, είτε σύνδεση με κάποια ανοσολογική μέθοδο για τον εντοπισμό του.

Ποσοτική καταμέτρηση των παθογόνων γίνεται με την εφαρμογή της real-time PCR, όπου η αντίστοιχη διαδικασία γίνεται με ειδικά μόρια εκκινητές και στην συνέχεια γίνεται σύγκριση με πρότυπη καμπύλη συγκεντρώσεων του DNA του παθογόνου.

Ένα άλλο μειονέκτημα όλων αυτών των μοριακών τεχνικών είναι ότι έχουν υψηλό κόστος και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και κατάλληλο εξοπλισμό. Το πλεονεκτήματα τους όμως έναντι των καλλιεργητικών τεχνικών είναι πολύ σημαντικά και είναι: ταχύτητα στην απάντηση, ευαισθησία, αποτελεσματικότητα απέναντι σε κύτταρα του παθογόνου που δεν είναι καλλιεργήσιμα αλλά είναι βιώσιμα (Oh, 1996).

Gram θετικά τροφογενή παθογόνα

Listeria monocytogenes

Χαρακτηριστικά του παθογόνου

Το γένος *Listeria* ανήκει στα Gram θετικά βακτήρια και έχει έξι είδη, εκ των οποίων παθογόνο του ανθρώπου είναι κυρίως το *Listeria monocytogenes*. Διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα μη-παθογόνα στελέχη γιατί προκαλεί λύση των ερυθροκυττάρων του αίματος.

Τα στελέχη του είδους ομαδοποιούνται σε περαιτέρω κατηγορίες με βάση τον αντιγονικό τους τύπο (1,2,4: σωματικά αντιγόνα, a, b, c: αντιγόνα μαστιγίου) ή το γενετικό τους προφίλ. Υπάρχουν 13 διαφορετικοί ορότυποι, ενώ τρεις από αυτούς (1/2a, 1/2β, 4b) απομονώνονται από τα περισσότερα περιστατικά λιστεριώσεων. Η άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ομαδοποίηση των στελεχών είναι το προφίλ του γενετικού τους υλικού με ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE), μέθοδος που χρησιμοποιείται από τα εργαστήρια που ασχολούνται με την επιδημιολογία της νόσου ιδιαίτερα στις ΗΠΑ (PulseNet).

Το παθογόνο εντοπίζεται στο περιβάλλον σχεδόν παντού, σε χερσαία και υδάτινα δείγματα και φαίνεται ότι υπάρχει σε αρκετές πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης, αλλά και στα περιπτώματα ζώων.

Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 0-45°C και η ψύξη δεν μειώνει το μέγεθος του βακτηριακού φορτίου, γεγονός που επιδεινώνει την κατάσταση ενός μολυσμένου τροφίμου (Montville T & Matthews K., 2010).

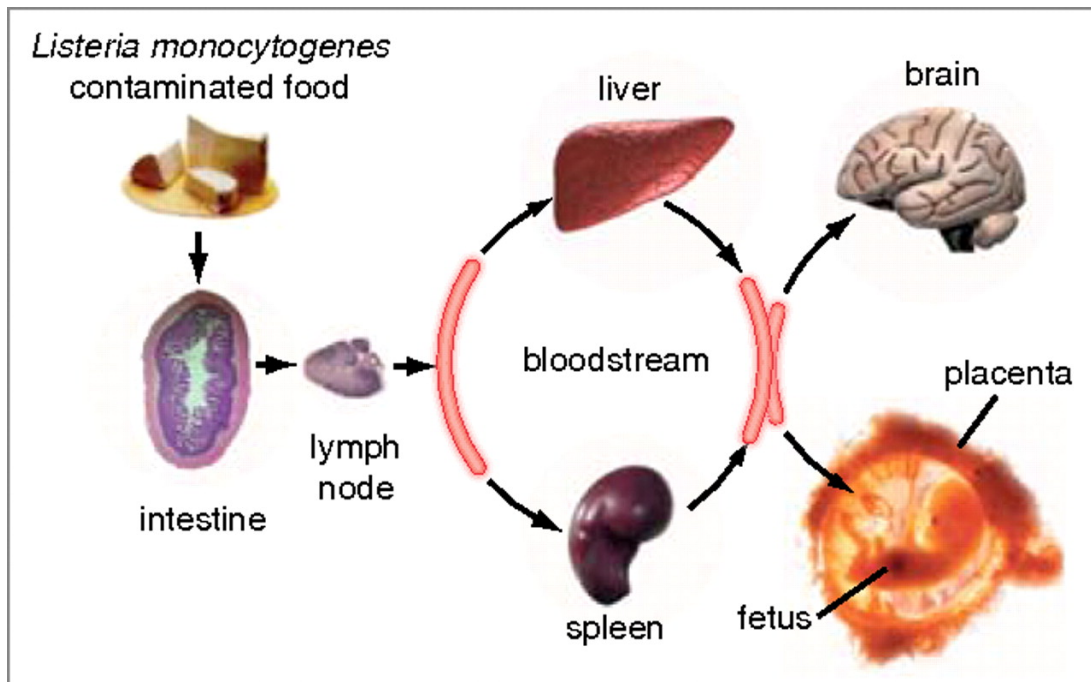
Ασθένεια

Η *L.monocytogenes* προσβάλλει κυρίως ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού, όπως ασθενείς που έχουν υποστεί κάποια μεταμόσχευση, ανοσοκατασταλμένους, ασθενείς με AIDS, εγκυμονούσες γυναίκες, καρκινοπαθείς, ηλικιωμένους, παιδιά.

Το παθογόνο μεταδίδεται μέσω τριών οδών: επαφή με ζώα, μόλυνση νεογνών στο νοσοκομείο και μέσω μολυσμένων τροφίμων (Montville T & Matthews K., 2010).

Μόλυνση μη-εγκυμονούντων ενηλίκων από μολυσμένη τροφή μπορεί να προκαλέσει ασυμπτωματική ή μέτριας βαρύτητας ασθένεια, μπορεί να μολύνει το κεντρικό νευρικό σύστημα (μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, σηψαιμία). Κίνδυνος για ανοσοκατασταλμένους και ηλικιωμένους. Χρόνος επώασης: 1ημέρα- 5 εβδομάδες. Κατά τη μόλυνση εγκυμονούσας μητέρας από μολυσμένη τροφή, εκδηλώνεται στη μητέρα μέτρια μορφή γρίπης, ή μπορεί να μην υπάρχουν συμπτώματα. Εμφανίζονται όμως σοβαρές επιπλοκές στο έμβρυο (αποβολή, γέννηση νεκρού βρέφους, μηνιγγίτιδα). Χρόνος επώασης: 1ημέρα-μήνες για την μητέρα, ενώ για το βρέφος 1-2 ημέρες. Πιο σπάνια μπορεί να προκαλέσει και μία διαφορετική ασθένεια, την εμπύρετη γαστρεντερίτιδα. Η ασθένεια αυτή εκδηλώνεται και σε ανθρώπους που δεν ανήκουν σε κάποια ομάδα υψηλού κινδύνου και ο χρόνος επώασης είναι πολύ πιο σύντομος (18-27 ώρες).

Το παθογόνο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή και να περνά απευθείας στο διπλανό κύτταρο. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η έκθεσή του στα αντισώματα και στις αντιμικροβιακές ουσίες που μπορεί να υπάρχουν στο αίμα. Σημαντικό όπλο του παθογόνου είναι η αιμολυσίνη (λιστεριολυσίνη O). Ο ρόλος της είναι διττός: επιτρέπει στα βακτήρια να ξεφύγουν από το φαγόσωμα και να εισχωρήσουν στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή.



Εικόνα 12 In vivo μόλυνση του ξενιστή από το παθογόνο (Πηγή: <http://www.pnas.org/content/108/49/19484/F1.expansion.html>)

Τα βακτήρια προσβάλλουν τα εντεροκύτταρα ή κύτταρα M (πλάκες Payer) και μεταφέρονται από τα φαγοκύτταρα μέσω του αίματος στους λεμφικούς αδένες και στα όργανα στόχους: ήπαρ και σπλήνα. Εάν δεν καταστραφούν από τα μακροφάγα, έστω και ελάχιστα κύτταρα μολύνουν τα ηπατοκύτταρα και οδηγούν σε γενικευμένη λοίμωξη των δευτερογενών οργάνων στόχων (ΚΝΣ, πλακούντα, έμβρυο)

Σημαντικό σημείο: η ικανότητα του παθογόνου να πολλαπλασιάζεται μέσα στα μακροφάγα.

Τα κύτταρα της λιστέριας έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τα μόρια ακτίνης του ξενιστή για να κινούνται μέσα στα κύτταρα (Montville T & Matthews K., 2010). Στην εικόνα που ακολουθεί περιγράφεται ακριβώς αυτό το μοντέλο της κίνησης των κυττάρων του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή.

Επιδημιολογία

Θεωρείται ότι η λιστερίωση δεν είναι συχνά εμφανιζόμενη ασθένεια (περίπου 7,4 περιστατικά ανά ένα εκατομμύριο ανθρώπων).

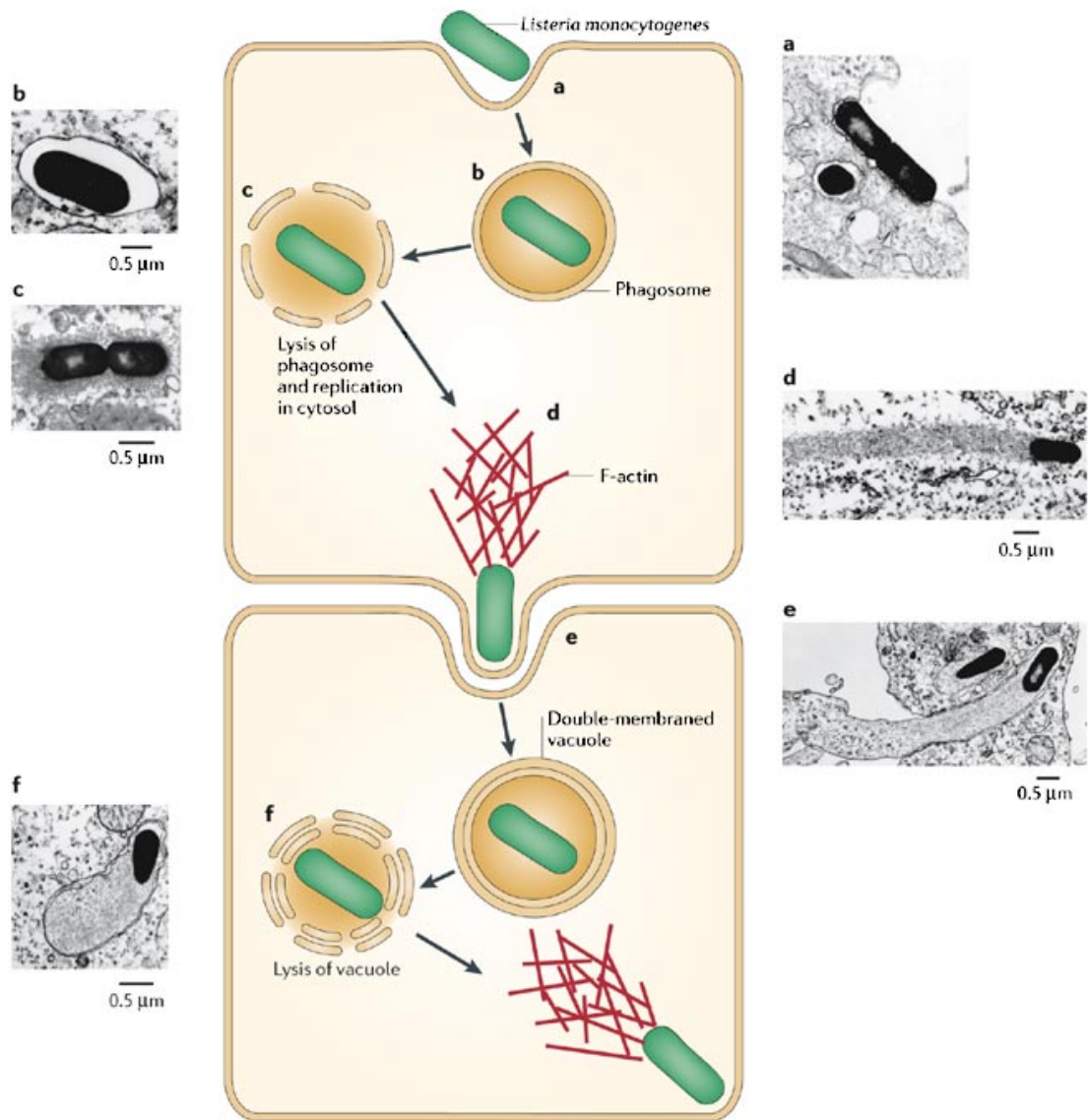
Στην Ευρώπη 1642 κρούσματα λιστερίωσης καταγράφηκαν το 2012, και είναι ελαφρά αυξημένα σε σχέση με το 2011. Το ποσοστό θνησιμότητας ήταν αρκετά υψηλό (17.8%) και μάλιστα το υψηλότερο που σημειώθηκε από το 2006. Την ίδια χρονιά στην Ελλάδα καταγράφηκαν 11 κρούσματα (EFSA Journal, 2014).

Στις ΗΠΑ, όπου υπάρχει σύστημα παρακολούθησης και καταγραφής πολύ οργανωμένο για τη λιστερίωση μέσω του CDC από το 2001, καταγράφηκαν 621 περιστατικά για το έτος 2011. Από αυτά, τα 57 περιστατικά συνδέονταν με εγκυμοσύνη (CDC).

Η μολυσματική δόση του παθογόνου που είναι απαραίτητη για να νοσήσει κάποιος, είναι δύσκολο να υπολογιστεί γιατί εξαρτάται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, το τρόφιμο, το στέλεχος κ.α. Έχει παρατηρηθεί ότι σε ξεσπάσματα κρουσμάτων λιστερίωσης η ποσότητα του παθογόνου είναι μεγαλύτερη συνήθως από 100κυτ./γραμμάριο τροφίμου. Υπήρξαν όμως περιπτώσεις (λουκάνικα Φρανκφούρτης το 1998) που η αντίστοιχη δόση ήταν μικρότερη από 0,3 κυτ./γραμμάριο τροφίμου (Montville T & Matthews K., 2010).

Επικίνδυνα τρόφιμα

Παραδοσιακά επικίνδυνα τρόφιμα για την μετάδοση της λιστερίωσης θεωρούνται τα μαλακά τυριά, πατέ, λουκάνικα. Ο έλεγχος όμως που γίνεται δείχνει ότι σχεδόν σε όλα τα είδη των ωμών κρεάτων, θαλασσινών και ψαριών έχει ανιχνευτεί. Επίσης σε μη-παστεριωμένο γάλα εντοπίζεται πολύ συχνά. Η μη-αποτελεσματική παστερίωση του γάλατος είναι ο σημαντικότερος λόγος που μπορεί να μεταδοθεί η λιστέρια στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι έτοιμες για κατανάλωση τροφές είναι πολύ επικίνδυνες για την μετάδοση της νόσου, ειδικά εάν δεν επεξεργαστούν περαιτέρω θερμικά. Επίσης σε σαλάτες και λαχανικά είναι συχνή η παρουσία του παθογόνου (Montville T & Matthews K., 2010)



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
 Nature Reviews | Microbiology

Εικόνα 13. Σχηματική περιγραφή της δράσης των κυττάρων του παθογόνου στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή (Πηγή: Hamon et al., 2006)
 Μέθοδοι ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes*

Οι μέθοδοι ανίχνευσης και καταμέτρησης της *Listeria monocytogenes* είναι οι κλασικές καλλιεργητικές τεχνικές, που αποτελούν και την standard μεθοδολογία που ακολουθείται από τους επίσημους φορείς, ανοσοβιολογικές και μοριακές. Συχνά γίνεται συνδυασμός αυτών των κατηγοριών, όπου μετά την απομόνωση του ύποπτου στελέχους λιστέριας από το δείγμα και την

καταμέτρησή του, ακολουθεί η ταυτοποίησή του με κάποια ανοσολογική ή μοριακή μέθοδο.

Μέθοδοι ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes* στηριζόμενες σε καλλιεργητικές τεχνικές

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε 25g τροφίμου και ακολουθεί την εξής διαδικασία:

1. Προ-εμπλουτισμός. Μεταφέρεται το δείγμα στο υλικό προ-εμπλουτισμού (Buffered Listeria enrichment broth) για 4ώρες στους 30°C
2. Εμπλουτισμός. Μετά την 4^η ώρα προστίθενται διάφοροι εκλεκτικοί παράγοντες, όπως acriflavin, sodium nalidixate και πιθανόν και κάποιος αντιμυκητιστακός παράγοντας και συνεχίζεται η επώαση στις ίδιες συνθήκες για 48 ώρες συνολικά. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί το Fraser broth ½ σε δύο στάδια επώασης (ISO 11290-1)
3. Μεταφορά σε εκλεκτικά υποστρώματα. Γραμμική διασπορά από το υλικό εμπλουτισμού μετά από 24 ώρες και μετά από 48 ώρες, σε ένα εκλεκτικό υπόστρωμα (προτείνεται το Oxford agar) και επώαση στους 30°C για 48 ώρες. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν δύο υποστρώματα (Oxford & Palcam agar) (ISO 11290-1)
4. Παρατήρηση αποικιών και απομόνωση, καθαρισμός των ύποπτων στελεχών
5. Δοκιμές για την ταυτοποίηση (Gram χρώση, Δοκιμή καταλάσης, Κατανάλωση υδατανθράκων, δοκιμή αιμόλυσης κλπ) (FDA, BAM)

Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes*

Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στη δημιουργία αντισωμάτων για τον εκλεκτικό προσδιορισμό κάποιου μορίου του παθογόνου (π.χ. η P60 πρωτεΐνη). Τις περισσότερες φορές στη μεθοδολογία αυτή προηγείται κάποιο στάδιο εμπλουτισμού με τη βοήθεια των γνωστών υποστρωμάτων εμπλουτισμού ή εκλεκτικών υποστρωμάτων (Fraser broth ½, Palcam broth).

Το αντίσωμα που έχει κατασκευαστεί είναι συνδεδεμένο με κάποιο ένζυμο (υπεροξειδάση συνήθως) και ακολουθεί η τελική αντίδραση με την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος που μετρίεται φωτομετρικά (Sorin et al., 2000).

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του *Listeria monocytogenes*

Οι περισσότερες μέθοδοι στηρίζονται στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, είτε απλής PCR ή multiplex-PCR για τον ποιοτικό προσδιορισμό του παθογόνου, είτε real-time PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Εδώ, γίνεται εστιασμένα ενίσχυση κάποιας αλληλουχίας τυπικής για το παθογόνο, έτσι ώστε στην πορεία να είναι δυνατός ο εντοπισμός της με κάποια μέθοδο (π.χ. ηλεκτροφόρηση).

Αρκετοί ερευνητές προτείνουν και ένα στάδιο εμπλουτισμού ολίγων ωρών, πριν από την PCR για την ενίσχυση του σήματος του παθογόνου (Rossmannith P. & Wagner M., 2010).

Στις μεθόδους αυτές, οι οποίες δεν έχουν υποκαταστήσει τις standard τεχνικές, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο η προετοιμασία του δείγματος στο οποίο πιθανόν υπάρχει το παθογόνο και η μέθοδος απομόνωσης του DNA από το δείγμα.

Τα αδύνατα σημεία των μεθόδων αυτών είναι ακριβώς το περιβάλλον του δείγματος (τρόφιμο), το οποίο περιέχει ανασταλτικούς παράγοντες και πιθανόν να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στη PCR. Η διαδικασία απομόνωσης του DNA είναι επίσης πολύ σημαντική για την ποιότητα και την ποσότητα του που παραλαμβάνεται από το δείγμα. Ιδιαίτερα σε μία ποσοτική μέθοδο παίζει σημαντικό ρόλο (Rossmannith P. & Wagner M., 2010).

Επίσης πολύ συχνά η τεχνική PCR χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την κλασσική μέθοδο για την ταυτοποίηση των ύποπτων στελεχών.

Στη λογική αυτή πιο πολύ χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης παλλόμενου πεδίου (PFGE) και μάλιστα από τα εργαστήρια αναφοράς, έτσι ώστε για επιδημιολογικούς λόγους να είναι καταγεγραμμένος ο γονότυπος του στελέχους, μαζί με τον ορότυπο.

Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει και η μεθοδολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays) να προτείνεται από διάφορους ερευνητές για την ταυτοποίηση των τροφογενών παθογόνων.

Η αρχή της μεθόδου αυτής είναι ότι χαρακτηριστικές αλληλουχίες - ιχνηθέτες που παρουσιάζουν κάποια μοναδικότητα στο συγκεκριμένο παθογόνο (probes) προσδένονται σε ένα υλικό – μήτρα.

Στη συνέχεια το δείγμα, το οποίο μπορεί να είναι είτε DNA που απομονώθηκε από τρόφιμο, είτε προϊόν PCR, σημαίνεται με κάποιο τρόπο π.χ. με κάποια χρωστική φθορισμού και στη συνέχεια προστίθεται στη μήτρα με τα probes.

Γίνεται αντίδραση μεταξύ των μορίων που εμφανίζουν ομολογία, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου (υβριδισμός)

Η αντίδραση αυτή συνδέεται με την παραγωγή σήματος, εύκολα αναγνωρίσιμου από κάποια συσκευή ανάγνωσης (Call et al., 2003).

Με αυτή τη μεθοδολογία έχει διαμορφωθεί μία συστοιχία (microarray) για το *L.monocytogenes* που αναγνωρίζει τις αλληλουχίες DNA που διαφοροποιούν τους διαφορετικούς ορότυπους του παθογόνου (Call et al., 2003).

Βιβλιογραφία

- Acheson D. & Allos B. (2001) *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Diseases* 32: 1201-1206
- Bakthavathsalam P., Rajendram V., Saram U., Chatterjee S., Ali B. (2013) Immunomagnetic nanoparticle based quantitative PCR for rapid detection of *Salmonella*. *Microchimica Acta* 180: 1241-1248
- Barrow P.A. (1994) Serological diagnosis of *Salmonella* serotype enteritidis infections in poultry by ELISA and other tests. *International Journal of Food Microbiology* 21: 55-68
- Bell C. & Kyriakides A. (2002) *Salmonella* In Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. Ed. Blackburn C. & McClure P., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England
- Bell C. & Kyriakides A. (2002a) Pathogenic *Escherichia coli* In Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. Ed. Blackburn C. & McClure P., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England
- Call D., Borucki M., Loge F. (2003). Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *Journal of Microbiological methods* 53: 235-243
- CDC, *Listeria* Surveillance, *Listeria* Annual Summary 2011 : <http://www.cdc.gov/listeria/surveillance.html>
- EFSA Journal (2014) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12(2): 3547
- FDA, Bacteriological Analytical Manual. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* (April 2011): <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071400.htm>
- Gupte A., de Rezende C., Joseph S. (2003) Induction and resuscitation of viable but non-culturable *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6669-66675
- Halatsi K., Oikonomou I., Lampiri M.P, Mandilara G.D, Vatopoulos A.K., Kyriacou A. 2006. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. *FEMS Microbiology Letters*, 259: 201-207
- Hamon M., Bierne H., Cossart P. (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model *Nature Reviews Microbiology* 4: 423-434
- Hoffmann S. & Anekwe T. (2013) Making sense of recent cost of foodborne illness estimates. *Economic Information Bulletin*, 18 <http://www.ers.usda.gov/amber-waves/2013-november>
- Louie M., Read S., Simor A., Holland J., Ziebell K., Brunton J., Hii J. (1998) Application of multiplex-PCR for detection of non O157verotoxin producing *Escherichia coli* in blood stools: identification of serogroups O26 and O111. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3375-3377
- Mather A.E. et al. (2013), Distinguishable epidemics within different hosts of the multidrug resistant zoonotic pathogen *Salmonella* Typhimurium DT 104 *Science*: 341(6153) 1514-1517
- McClure P. & Blackburn C. (2002) *Campylobacter* and *Arcobacter* In Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. Ed. Blackburn C. & McClure P., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England
- Montville T.J. & Matthews K.R. (2010), Μικροβιολογία Τροφίμων Εκδ. Ιων, Αθήνα

- Oliveira S.D., Rodenbusch C.R., Ce M.C., Rocha SLS., Canal C.W. (2003) Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. Letters in Applied Microbiology 36(4): 217-221
- On S. (1996) Identification methods for Campylobacters, Helicobacters and related organisms. Clinical Microbiology Reviews 9(3): 405-422
- Pennington H. (2010) *Escherichia coli* O157. Lancet 376: 1428-1435
- Rangel J., Sparling P., Crowe C., Griffin P., Swerdlow D. (2005) Epidemiology of *E.coli* O157:H7 Outbreaks United States 1982-2002. Emerging Infectious Diseases 11(4)
- Rossmann P. & Wagner M. (2010) The challenge to quantify *Listeria monocytogenes* – a model leading to new aspects in molecular biological food pathogen detection. Journal of Applied Microbiology 110: 605-617
- Scallan E., Hoekstra R., ...Giffin P. (2011) Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. Emerging Infectious Diseases 17(1): 7-15
- Sorin M.L. , Faure S., Poumerol S., Arbault P. (2000) *Listeria monocytogenes* in food using an ELISA –based method. 87th Annual meeting of the International Association of Food Protection, Atlanta, USA 6-9 September 2000
- Threlfall J. (2000), Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104 – a truly international multiresistant clone; J. of Antimicrobial Chemotherapy 46: 7-10
- Young K., Davis L., Dirita V. (2007) *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis Nature Reviews Microbiology 5: 665-679
- Vellusamy V., Arshak K., Korostynska O., Oliwa K., Adley C. (2010) Overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. Biotechnology Advances 28: 232-254