

ΤΜΗΜΑ	ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΠΜΣ: ΈΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΕΠΩΝΥΜΟ ΟΝΟΜΑ, ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ:	ΣΚΟΤΣΙΜΑΡΑ ΜΑΡΙΑ ΜΙΧΑΗΛ
ΤΥΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: Πτυχιακή Εργασία ☐ Μεταπτυχιακή Εργασία ☒ X Διδακτορική Εργασία ☐	
ΤΙΤΛΟΣ:	Μελέτη της μικροχλωρίδας σε ελληνικά σαλάμια αέρος Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΩΝ:	ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ, ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ ΒΑΪΟΣ, ΠΡΑΜΑΤΕΥΤΑΚΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΑΣ:	26-6-2007

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ:	Η μικροβιακή ανάλυση σαλαμιών αέρος της ελληνικής αγοράς φανέρωσε μια πλούσια μικροχλωρίδα των προϊόντων αυτών. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 30 στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, 21 στελέχη εντερόκοκκων και 24 στελέχη σταφυλόκοκκων. Οι λακτοβάκιλλοι αποτέλεσαν την πλειοψηφία των οξυγαλακτικών βακτηρίων με επικρατέστερο τον <i>Lb. plantarum</i>, ενώ υψηλή ήταν και η παρουσία των πεδίοκοκκων. Ο <i>E. hirae</i> αποτέλεσε το κυρίαρχο είδος εντερόκοκκου, ενώ παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλία στα διαφορετικά είδη σταφυλόκοκκων, με επικρατέστερους τους <i>S. saprophyticus</i>, <i>S. xylosus</i> και <i>S. simulans</i>. Όλα τα οξυγαλακτικά στελέχη ήταν ευαίσθητα στην αμπικιλίνη και τη χλωραμφενικόλη, ενώ υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για τη βανκομυκίνη (90%), τη βασιτρακίνη (66.7%), την αμικασίνη (93.3%), την καναμυκίνη (86.7%), τη σιπροφλοξασίνη (90%) και την τετρακυκλίνη (36.7%). Σχετικά με τους εντερόκοκκους, υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας διαπιστώθηκαν για τη βανκομυκίνη (33.3%), την τετρακυκλίνη (81%), την ερυθρομυκίνη (52.4%), τη ριφαμικίνη (47.6%) και τις φθοριοκινολόνες (μέχρι 71.4% των στελεχών), ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στη γενταμυκίνη. Το 54.2% των στελεχών σταφυλόκοκκων εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, το 50% στη μεθικιλίνη, το 50% στη βανκομυκίνη, το 70.8% στην τετρακυκλίνη, το 25% στην ερυθρομυκίνη, το 20.8% στην κλινδαμυκίνη και το 20.8% στη νιτροφουραντοΐνη. Παρατηρήθηκαν πολλαπλές ανθεκτικότητες: το 47,6% των στελεχών εντερόκοκκων ήταν ανθεκτικά απέναντι σε 6 έως 9 αντιβιοτικά, το 33.3% των οξυγαλακτικών στελεχών σε 6 έως 8 αντιβιοτικά, και το 20.8% των στελεχών σταφυλόκοκκων σε 5 έως 7 αντιβιοτικά.
--------------------------------------	--

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΕ ΞΕΝΗ ΓΛΩΣΣΑ:	Eng <i>The microbiological analysis of Greek fermented sausages revealed a very rich microbiota of these products. 30 strains of lactic acid bacteria, 21 strains of enterococci and 24 strains of staphylococci were isolated and identified. Lactobacilli were the majority of lactic acid bacteria, with Lb. plantarum being the predominant species. The majority of enterococci were assigned to the species of E. hirae. There was a great biodiversity between staphylococci with S. saprophyticus, S. xylosus and S. simulans being the predominant species. All the lactic acid isolates were sensitive to ampicillin and chloramphenicol and 90% were resistant to vancomycin, 66.7% to bacitracin, 93.3% to amikacin, 86.7% to kanamycin, 90% to ciprofloxacin and 36.7% to tetracycline. About enterococci, high levels of resistance were observed for vancomycin (33.3%), tetracycline (81%), erythromycin (52.4%), rifampicin (47.6%) and fluoroquinolones (up to 71.4% of total strains), while all the strains were sensitive to gentamycin. 54.2% of the staphylococcal isolates were resistant to ampicillin, 50% to methicillin, 50% to vancomycin, 70.8% to tetracycline, 25% to erythromycin, 20.8% to clindamycin and 20.8% to nitrofurantoin. Multiple resistances were observed: 47.6% of the enterococcal isolates were resistant towards 6 to 9 antibiotics, 33.3% of the lactic acid isolates were resistant towards 6 to 8 antibiotics, and 20.8% of the staphylococcal isolates were resistant towards 5 to 7 antibiotics.</i>
ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΕ ΞΕΝΗ ΓΛΩΣΣΑ:	Eng <i>Study of the microbiota of Greek fermented sausages</i> <i>Antibiotic sensitivity testing</i>
ΣΕΛΙΔΕΣ :	134
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ (ΕΛΛΗΝΙΚΑ)	Σαλάμι αέρος, ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, εντερόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ (ΑΓΓΛΙΚΑ)→	Sausages, antibiotic resistance, staphylococci, enterococci

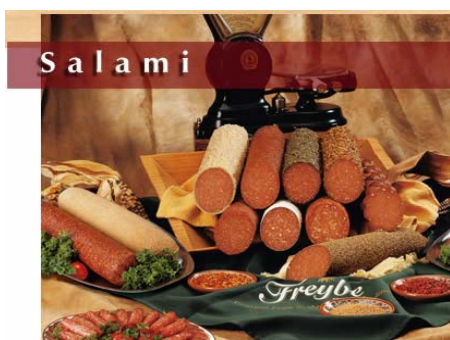
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
Π.Μ.Σ. «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

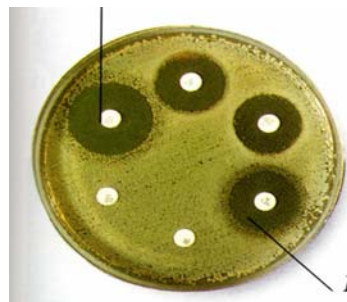
ΣΚΟΤΣΙΜΑΡΑ ΜΑΡΙΑ

ΘΕΜΑ

*Μελέτη της μικροχλωρίδας σε ελληνικά σαλάμια αέρος
Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά*



σε



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ, Λέκτορας

ΜΕΛΗ

ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ ΒΑΪΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητης

ΠΡΑΜΑΤΕΥΤΑΚΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ, Ph.D, Επιστημονική Συνεργάτιδα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες στην καθηγήτριά μου κυρία Αδαμαντίνη Κυριακού, που μετά από δική της πρόταση ξεκίνησε η υλοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου προσπάθειας η κυρία Κυριακού ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και να με καθοδηγήσει με την πολύτιμη γνώση και εμπειρία της. Θα ήθελα να τονίσω ότι πέρα από μια αξιόλογη καθηγήτρια είναι ένας καταπληκτικός άνθρωπος.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Ευδοκία Μήτσου για τη βοήθεια που μου προσέφερε σε ό,τι αφορά την υλοποίηση του πειραματικού μέρους και την κυρία Μαρία Κώτσου για τις παρατηρήσεις και τη βοήθειά της σχετικά με τους σταφυλόκοκκους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τη μανούλα μου και τον Κωστή μου για την κατανόηση, τη συμπαράσταση και την υπομονή που επέδειξαν όλο αυτό το διάστημα των 13 μηνών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ.....	10
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΣΑΛΑΜΙΩΝ ΑΕΡΟΣ.....	11
1.1. Γενικά για τα σαλάμια ωρίμανσης (σαλάμια αέρος).....	11
1.2. Ο ρόλος της μικροχλωρίδας στη διαδικασία ωρίμανσης των σαλαμιών αέρος.....	11-14
ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	15
1. Ο ρόλος των λακτοβάκιλλων στα ζυμωμένα τρόφιμα.....	15
1.1. Ταξινόμηση του γένους <i>Lactobacillus</i> spp.....	15
1.2. Η μακρά ιστορία της παρουσίας των λακτοβάκιλλων στα ζυμωμένα τρόφιμα.....	16-17
1.3. Βιοποικιλότητα των λακτοβάκιλλων.....	17-19
1.4. Οι λακτοβάκιλλοι ως προβιοτικά.....	20
2. Βακτήρια του γαλακτικού οξέος και σαλάμια αέρος.....	20-23
ΤΑ ΓΕΝΗ <i>Staphylococcus</i> & <i>Micrococcus</i>	24
1.1. Εισαγωγή.....	24-25
1.2. Τα γένη <i>Staphylococcus</i> & <i>Micrococcus</i> σε σχέση με τα σαλάμια αέρος.....	25-26
ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ.....	27
1.1. Εισαγωγή.....	27
1.2. Ταξινόμηση του γένους <i>Enterococcus</i> spp.....	27-28
1.3. Σημαντικότερα περιβάλλοντα των εντερόκοκκων.....	28-29
1.4. Οι εντερόκοκκοι ως προβιοτικά.....	29
1.5. Η παρουσία των εντερόκοκκων στα τρόφιμα.....	30
1.6. Η παρουσία των εντερόκοκκων στα σαλάμια αέρος.....	30-31
ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ.....	32
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	33
1.1. Εισαγωγή.....	33
1.2. Ταξινόμηση αντιμικροβιακών φαρμάκων.....	33-41
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	42
1.1. Εισαγωγή.....	42-43

1.2. Γενετική βάση και εξάπλωση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.....	43-46
1.3. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας, διασταυρούμενη ανθεκτικότητα (cross-resistance) και συν-επιλογή (co-selection).....	46-47
1.4. Επιδημιολογία της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.....	47-49
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	50
1.1. Εισαγωγή.....	50-51
1.2. Προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος-Εγγενής ανθεκτικότητα.....	52
1.3. Μεταφερόμενα γενετικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος-Επίκτητη ανθεκτικότητα.....	52-53
1.4. Ανθεκτικότητα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από σαλάμια αέρος.....	53-54
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	54
1.1. Μηχανισμοί επίκτητης ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων.....	54-58
1.2. Παρουσία ανθεκτικών σταφυλόκοκκων σε σαλάμια αέρος.....	58-60
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	60
1.1. Οι εντερόκοκκοι ως ευκαιριακά παθογόνα του ανθρώπου.....	60-61
1.2. Παρουσία μολυσματικών παραγόντων και μηχανισμοί ανταλλαγής γενετικού υλικού.....	61-62
1.3. Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.....	62-63
1.4. Παρουσία ανθεκτικών εντερόκοκκων σε σαλάμια αέρος....	63-64
ΣΚΟΠΟΣ.....	65

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	66
Διαδικασία δειγματοληψίας – Δείγματα.....	67
Μικροβιολογική ανάλυση των σαλαμιών αέρος.....	68-70
Απομόνωση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος.....	70-71
Απομόνωση των σταφυλόκοκκων.....	71-72
Απομόνωση των εντερόκοκκων.....	72
Φύλαξη των στελεχών που απομονώθηκαν στην υπερκατάψυξη (- 80 °C).....	72
Ταυτοποίηση των εντερόκοκκων.....	73-75
Ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος.....	75-76
Ταυτοποίηση των σταφυλόκοκκων.....	76-77
Δοκιμασία ευαισθησίας των εντερόκοκκων σε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	77-79
Δοκιμασία ευαισθησίας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος σε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	79-81
Δοκιμασία ευαισθησίας των σταφυλόκοκκων σε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	82-83
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	84
Αποτελέσματα μικροβιακής ανάλυσης –	
Μικροβιακοί πληθυσμοί	85-86
Ταυτοποίηση των εντερόκοκκων.....	87-88
Ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος.....	89-90
Ταυτοποίηση των σταφυλόκοκκων.....	91-92
Αποτελέσματα της δοκιμασίας ευαισθησίας των εντερόκοκκων.....	93-95
Αποτελέσματα της δοκιμασίας ευαισθησίας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος.....	96-98
Αποτελέσματα της δοκιμασίας ευαισθησίας των σταφυλόκοκκων.....	99-101
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	102
Μικροβιακοί πληθυσμοί.....	103-105
Ταυτοποίηση των εντερόκοκκων.....	105-107
Ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος.....	107-110
Ταυτοποίηση των σταφυλόκοκκων.....	110-112
Δοκιμασία ευαισθησίας των εντερόκοκκων σε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	112-116

Δοκιμασία ευαισθησίας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος σε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	116-119
Δοκιμασία ευαισθησίας των σταφυλόκοκκων σε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	119-123
Συμπέρασμα.....	124
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	125-134

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μικροβιακή ανάλυση σαλαμιών αέρος της ελληνικής αγοράς φανέρωσε μια πλούσια μικροχλωρίδα των προϊόντων αυτών. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 30 στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, 21 στελέχη εντερόκοκκων και 24 στελέχη σταφυλόκοκκων. Οι λακτοβάκιλλοι αποτέλεσαν την πλειοψηφία των οξυγαλακτικών βακτηρίων με επικρατέστερο τον *Lb. plantarum*, ενώ υψηλή ήταν και η παρουσία των πεδίοκοκκων. Ο *E. hirae* αποτέλεσε το κυρίαρχο είδος εντερόκοκκου, ενώ παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλία στα διαφορετικά είδη σταφυλόκοκκων, με επικρατέστερους τους *S. saprophyticus*, *S. xylosus* και *S. simulans*. Όλα τα οξυγαλακτικά στελέχη ήταν ευαίσθητα στην αμπικιλίνη και τη χλωραμφενικόλη, ενώ υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για τη βανκομυκίνη (90%), τη βασιτρακίνη (66.7%), την αμικασίνη (93.3%), την καναμυκίνη (86.7%), τη σιπροφλοξασίνη (90%) και την τετρακυκλίνη (36.7%). Σχετικά με τους εντερόκοκκους, υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας διαπιστώθηκαν για τη βανκομυκίνη (33.3%), την τετρακυκλίνη (81%), την ερυθρομυκίνη (52.4%), τη ριφαμικίνη (47.6%) και τις φθοριοκινολόνες (μέχρι 71.4% των στελεχών), ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στη γενταμυκίνη. Το 54.2% των στελεχών σταφυλόκοκκων εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, το 50% στη μεθικιλίνη, το 50% στη βανκομυκίνη, το 70.8% στην τετρακυκλίνη, το 25% στην ερυθρομυκίνη, το 20.8% στην κλινδαμυκίνη και το 20.8% στη νιτροφουραντοΐνη. Παρατηρήθηκαν πολλαπλές ανθεκτικότητες: το 47,6% των στελεχών εντερόκοκκων ήταν ανθεκτικά απέναντι σε 6 έως 9 αντιβιοτικά, το 33.3% των οξυγαλακτικών στελεχών σε 6 έως 8 αντιβιοτικά, και το 20.8% των στελεχών σταφυλόκοκκων σε 5 έως 7 αντιβιοτικά.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

*Μικροχλωρίδα των σαλαμιών αέρος :
Βακτήρια του γαλακτικού οξέος, εντερόκοκκοι,
σταφυλόκοκκοι*

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΣΑΛΑΜΙΩΝ ΑΕΡΟΣ

1.1 Γενικά για τα Σαλάμια ωρίμανσης (Σαλάμια αέρος)

Τα σαλάμια αέρος είναι κρεατοσκευάσματα που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία (θέρμανση, αλάτιση, αποξήρανση, κάπνισμα), η οποία να συμβάλλει στην εξυγιάνσή τους. Η υγιεινή τους κατάσταση βασίζεται αποκλειστικά και μόνο στην υγιεινή των πρώτων υλών, στις συνθήκες παρασκευής και στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες που σχετίζονται με την τεχνολογία παραγωγής τους. Παρασκευάζονται συνήθως από λεπτοτεμαχισμένο νωπό κρέας (κρεατόμαζα), λίπος και ορισμένες πρόσθετες ουσίες, όπως μαγειρικό αλάτι, νιτρικό άλας, νιτρώδες άλας, σάκχαρα και μπαχαρικά. Μετά από κατάλληλη κατεργασία η κρεατόμαζα τοποθετείται σε περιβλήματα από φυσικό ή τεχνητό έντερο και κατόπιν τα σαλάμια αέρος παραμένουν σε ειδικούς θαλάμους από 3 ημέρες μέχρι και 6 μήνες (ανάλογα με το είδος του σαλαμιού) προς ωρίμανση και μερική αφυδάτωση. Οι θάλαμοι αυτοί είναι κατασκευασμένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλίζουν τις καταλληλότερες συνθήκες για την ωρίμανση των σαλαμιών (θερμοκρασία 22-35°C, σχετική υγρασία 55-65%) [1,2].

1.2 Ο ρόλος της μικροχλωρίδας στη διαδικασία ωρίμανσης των σαλαμιών αέρος – Βιοχημικές διεργασίες

Τα σαλάμια αέρος είναι προϊόντα που παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις και ετερογένεια ανάμεσα σε διαφορετικές χώρες αλλά και σε διαφορετικές περιοχές της ίδιας χώρας. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των σαλαμιών αέρος, λαμβάνουν χώρα πολύπλοκες φυσικές και βιοχημικές διεργασίες, οι οποίες οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές των χαρακτηριστικών του αρχικού προϊόντος. Επίσης, η παραγωγή αρωματικών ουσιών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Είναι ευρέως γνωστό ότι η μικροχλωρίδα των σαλαμιών αέρος συμμετέχει στη διαδικασία της ωρίμανσης και καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τα οργανοληπτικά

χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (*Lactobacillus* spp.) και οι Gram-θετικοί, καταλάση-θετικοί κόκκοι (*Staphylococcus* spp.) αποτελούν τις 2 κυριότερες ομάδες μικροοργανισμών που θεωρούνται ιδιαίτερες σημαντικές για την ωρίμανση των σαλαμιών αέρος. Ακόμα, και άλλοι μικροοργανισμοί φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο, όπως οι εντερόκοκκοι και οι ζύμες [3].

Σε ό,τι αφορά τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB), συνήθως βρίσκονται στο νωπό κρέας σε χαμηλούς πληθυσμούς (10^2 - 10^3 cfu/g), αλλά γρήγορα κυριαρχούν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, εξαιτίας του αναερόβιου περιβάλλοντος και της παρουσίας NaCl, νιτρικών και νιτρικών, συνθήκες οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξή τους. Ο κυριότερος ρόλος τους είναι η μείωση του pH του σαλαμιού εξαιτίας της κυριότερης μεταβολικής τους δραστηριότητας, η οποία είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος από σάκχαρα [4]. Εκτός από την παραγωγή γαλακτικού οξέος, τα LAB είναι υπεύθυνα για το ιδιαίτερο άρωμα των σαλαμιών αέρος, καθώς και για την παραγωγή μικρών ποσοτήτων ακετόνης, αιθανόλης, πυροσταφυλικού οξέος και διοξειδίου του άνθρακα [5]. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι το γένος *Lactobacillus* spp., το οποίο απομονώνεται συνήθως από τα σαλάμια αέρος, παρουσιάζει πρωτεολυτική δράση πάνω στις μυϊκές πρωτεΐνες του κρέατος [6].

Οι σταφυλόκοκκοι συμμετέχουν στην ανάπτυξη και στη σταθερότητα του χαρακτηριστικού ροδοκόκκινου χρώματος των σαλαμιών μέσω της διάσπασης των νιτρικών και νιτρικών αλάτων προς σχηματισμό της ερυθράς χρωστικής νιτροζομυογλοβίνης [7]. Με τη δράση των σταφυλόκοκκων, παράγονται επίσης διάφορες αρωματικές ουσίες και οργανικά οξέα. Συγκεκριμένα, η πρωτεόλυση και η λιπόλυση επηρεάζουν τόσο την υφή και το άρωμα εξαιτίας της παραγωγής ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως πεπτίδια, αμινοξέα, αλδεΐδες, αμίνες, εστέρες και ελεύθερα λιπαρά οξέα [8].

Οι βιοχημικές δράσεις των εντερόκοκκων κατά την ωρίμανση των σαλαμιών αέρος δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, σε αντίθεση με την περίπτωση των τυριών και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Ωστόσο, φαίνεται ότι συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του

αρώματος των σαλαμιών μέσω των γλυκολυτικών, πρωτεολυτικών και λιπολυτικών τους δράσεων [9].

Η σύνθεση της μικροχλωρίδας που αναπτύσσεται στα σαλάμια αέρος σχετίζεται άμεσα με την τεχνική ωρίμανσης που χρησιμοποιείται. Σαλάμια αέρος με μικρότερους χρόνους ωρίμανσης έχουν περισσότερους λακτοβάκιλλους από τα αρχικά στάδια της ωρίμανσης και ένα 'όξινο' άρωμα κυριαρχεί στο προϊόν. Σε αντίθεση, σαλάμια με μεγαλύτερους χρόνους ωρίμανσης περιέχουν Gram-θετικούς, καταλάση-θετικούς κόκκους σε υψηλότερους πληθυσμούς. Τα σαλάμια αέρος μεσογειακής προέλευσης χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερους χρόνους ωρίμανσης, σε αντίθεση με τα σαλάμια που προέρχονται από χώρες της Βόρειας Ευρώπης. Σε κάποια σαλάμια αέρος (ιδιαίτερα σε αυτά που παράγονται στη Γαλλία, την Ισπανία και την Ιταλία) τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων επηρεάζονται και από την επιφανειακή μικροχλωρίδα, η οποία αποτελείται κυρίως από ζύμες και μύκητες [10].

Το σαλάμι αέρος είναι ένα σημαντικό προϊόν της ελληνικής βιομηχανίας κρέατος με μια ετήσια παραγωγή περίπου 10.000 τόνων. Τα παραδοσιακά σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης παράγονται σε μικρότερη κλίμακα και η παρασκευή τους είναι περισσότερο μια μορφή τέχνης, η οποία εξαρτάται από τις ικανότητες και την εμπειρία του παρασκευαστή, και λιγότερο μια διαδικασία η οποία βασίζεται σε επιστημονικά και τεχνολογικά μέσα. Η ωρίμανση των σαλαμιών αυτών εξαρτάται αποκλειστικά από την ενδογενή μικροβιακή χλωρίδα και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Αυτή η ενδογενής μικροχλωρίδα αποτελείται από μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών η οποία προέρχεται από το νωπό κρέας, το οποίο μολύνεται κατά τη διάρκεια της σφαγής [11].

Σε αντίθεση με τα σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης, η παραγωγή σαλαμιών αέρος σε βιομηχανική κλίμακα γίνεται συνήθως με τη χρήση αρχικών καλλιιεργειών προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια και η σταθερότητα του τελικού προϊόντος σε ό,τι αφορά τη γεύση, το άρωμα, το χρώμα κ.τ.λ. και να αποφευχθεί η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Οι αρχικές καλλιιεργειες αποτελούνται συνήθως από στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος ή/και Gram-θετικούς, καταλάση-θετικούς

κόκκους. Παρόλα αυτά, τα σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης θεωρούνται ποιοτικά ανώτερα σε σχέση με τα σαλάμια που παρασκευάζονται με τη χρήση αρχικών καλλιεργειών, φαινόμενο το οποίο αποδίδεται στην ιδιαίτερη σύνθεση και μεταβολική δραστηριότητα της ενδογενούς μικροχλωρίδας [11,12].

ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ ΣΤΑ ΖΥΜΩΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

1.1 Ταξινόμηση του γένους *Lactobacillus* spp.

Μεταξύ των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, οι λακτοβάκιλλοι παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στην ωρίμανση των σαλαμιών αέρος. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος των λακτοβάκιλλων και σε άλλα ζυμωμένα τρόφιμα, ενώ έχουν διαπιστωθεί οι ευεργετικές επιδράσεις των μικροοργανισμών αυτών για τον άνθρωπο.

Σε ό,τι αφορά την ταξινόμησή τους, οι λακτοβάκιλλοι είναι Gram θετικοί, μη σποριογόνοι βάκιλλοι ή κοκκιοβάκιλλοι με μια αναλογία βάσεων G+C που κυμαίνεται από 33-55%. Είναι αυστηρώς ζυμωτικά βακτήρια, αεροανθεκτικά ή αναερόβια και έχουν διάφορες διατροφικές ανάγκες (υδατάνθρακες, αμινοξέα, πεπτίδια, εστέρες λιπαρών οξέων, παράγωγα νουκλεοτιδίων, βιταμίνες). Όταν η γλυκόζη αποτελεί πηγή υδατάνθρακα, οι λακτοβάκιλλοι μπορεί να είναι ομοζυμωτικοί (παράγοντας πάνω από 85% γαλακτικό οξύ) ή ετεροζυμωτικοί (παράγοντας γαλακτικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα, αιθανόλη και/ή οξικό οξύ σε ίσες ποσότητες) [13].

Οι λακτοβάκιλλοι, με βάση τον φαινότυπό τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες: I (υποχρεωτικά ομοζυμωτικά), II (προαιρετικά ομοζυμωτικά) και III (υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά) [14].

1.2 Η μακρά ιστορία της παρουσίας των λακτοβάκιλλων στα ζυμωμένα τρόφιμα

Η πρώτη απόδειξη της παρουσίας λακτοβάκιλλων σε ζυμωμένα τρόφιμα προέρχεται από την Αρχαία Αίγυπτο (2000 π.Χ.), όπου αναφέρεται η παραγωγή βουτύρου και τυριού από γάλα κατσίκας και αγελάδας. Από την Αρχαία Ελλάδα υπάρχουν περιγραφές για παρασκευή τυριού από συγγραφείς όπως ο Όμηρος και ο Αριστοτέλης. Στην εποχή της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας η τέχνη της παρασκευής τυριού εξαπλώθηκε σε όλη την Ευρώπη. Αυτήν την περίοδο αναπτύχθηκε περαιτέρω η διαδικασία της ζύμωσης, ως τεχνική για την ανάπτυξη αρωμάτων και ιδιαίτερων χαρακτηριστικών. Στα χρόνια του Μεσαίωνα η τεχνική παραγωγής τυριού βελτιώθηκε περαιτέρω στα μοναστήρια και στις φεουδαρχικές επαρχίες της Ευρώπης. Κατά την Αναγέννηση, το τυρί θεωρήθηκε μη υγιεινό προϊόν και έγινε μη δημοφιλές, αλλά τελικά ανέκτησε τη χαμένη αίγλη του στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, οπότε η παραγωγή του πέρασε σε βιομηχανικό επίπεδο [13].

Στις μέρες μας έχει αναπτυχθεί παγκοσμίως μια μεγάλη ποικιλία ζυμωμένων προϊόντων από το γάλα της αγελάδας, της κατσίκας, της καμήλας και άλλων ζώων, από τρόφιμα φυτικής προέλευσης, αλλά και από τη ζύμωση του κρέατος προς παραγωγή των διάφορων ειδών αλλαντικών. Στον Πίνακα 1 της επόμενης σελίδας παρουσιάζονται διάφορα παραδοσιακά εθνικά τρόφιμα που αποτελούν προϊόντα ζύμωσης των λακτοβάκιλλων.

Πίνακας 1. Παραδοσιακά εθνικά προϊόντα που βασίζονται στη ζύμωση από λακτοβάκιλλους. (Πηγή: FAO, 1998 & Saloff-Coste, 1995)

Όνομα	Χώρα Προέλευσης	Περιγραφή	<i>Lactobacillus</i> spp. και άλλοι μικροοργανισμοί
Gundruk	Νεπάλ	Προέρχεται από τη ζύμωση πράσινων λαχανικών. Σερβίρεται ως ορεκτικό ή συνοδευτικό των κυρίων γευμάτων	<i>Pediococcus</i> & <i>Lactobacillus</i> spp. (<i>Lb. cellobiosus</i> & <i>Lb. plantarum</i>)
Kefir	Καύκασος	Ξινό και ελαφρά αλκοολούχο ζυμωμένο γάλα	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. brevis</i>
Kishk	Αίγυπτος	Αποξηραμένο μίγμα ζυμωμένου γάλακτος με δημητριακά και μπαχαρικά. Χρησιμοποιείται στις σούπες.	<i>St. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i>
Koumiss	Καζακστάν	Παραδοσιακό ποτό των νομάδων κτηνοτρόφων από γάλα φοράδας. Προκύπτει από γαλακτική και αλκοολική ζύμωση.	<i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. acidophilus</i>
Laban zeer	Αίγυπτος	Συμπυκνωμένο όξινο αφρόγαλα που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του Kishk, σε σαλάτες ή σε ποτά	<i>Lc. lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i>
M'Bannick	Σενεγάλη	Αναψυκτικό που μοιάζει με το Kefir, με ευχάριστο άρωμα και δροσερή γεύση.	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , ζύμες
Zabaday	Αίγυπτος	Ζυμωμένο γάλα. Χαρακτηριστική γεύση και άρωμα. Ευχάριστη, ελαφρώς όξινη γεύση.	<i>St. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. viridescens</i> .
Zincika	Τσεχία	Αλατισμένο αναψυκτικό που μοιάζει με το Kefir, από πηγμένες πρωτεΐνες τυρόγαλου.	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Ln. dextranicum</i> .

1.3 Βιοποικιλότητα των λακτοβάκιλλων

Οι λακτοβάκιλλοι βρίσκονται παντού, οπουδήποτε υπάρχουν διαθέσιμα υποστρώματα πλούσια σε υδατάνθρακες. Ως εκ τούτου συνδέονται άμεσα με τα ζώα της στεριάς και της θάλασσας, το φυσικό περιβάλλον και τα τρόφιμα. Αποικίζουν διάφορα σημεία του σώματος των ανθρώπων και των ζώων, όπως τον βλεννογόνο της στοματικής κοιλότητας, το έντερο και τον κόλπο. Σε υγιή άτομα, φυσιολογικά βρίσκονται στη στοματική κοιλότητα (10^3 - 10^7 CFU g⁻¹), στον ειλέο (10^3 - 10^7 CFU g⁻¹) και στο κόλον (10^4 - 10^8 CFU g⁻¹), ενώ αποτελούν τον κυρίαρχο μικροοργανισμό στον κόλπο [13]. Από τη γαστρεντερική οδό των ανθρώπων έχουν απομονωθεί οι εξής

λακτοβάκιλλοι: *Lb. acidophilus*, *Lb. murinus*, *Lb. intestinalis*, *Lb. salivarius*, *Lb. agilis*, *Lb. ruminis*, *Lb. vitulinus*, *Lb. aviaries*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. brevis* [15].

Τα ζυμωμένα τρόφιμα που περιέχουν λακτοβάκιλλους περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων το ζυμωμένο γάλα, το γιαούρτι, το τυρί, το κρασί, τις ελιές, τις πίκλες, το sauerkraut, το ψωμί sourdough, τα ζυμωμένα αλλαντικά, τα σαλάμια αέρος και πιο πρόσφατα τα προβιοτικά γαλακτοκομικά προϊόντα. Ο πίνακας 2 της επόμενης σελίδας αναφέρει τα διάφορα είδη λακτοβάκιλλων που συναντώνται σε μια ευρεία ποικιλία τροφίμων. Να σημειώσουμε ότι οι λακτοβάκιλλοι που απαντώνται στα ζυμωμένα τρόφιμα είτε αποτελούν μέρος της φυσικής μικροβιακής χλωρίδας του τροφίμου, είτε προστίθενται σε αυτό ως αρχικές καλλιέργειες προκειμένου να εξασφαλιστεί η ασφάλεια και η σταθερότητα της ζύμωσης.

Πίνακας 2: Σύνοψη των διαφόρων ειδών λακτοβακίλλων που απαντώνται σε ζυμωμένα τρόφιμα.

Προϊόν	Είδος λακτοβάκιλλου	Αναφορές
Μη παστεριωμένο γάλα	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. pentosus</i>	Wouters <i>et al.</i> (2002)
Parmigiano Reggiano (ιταλικό τυρί)	<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> , <i>Lb. rhamnosus</i>	Coppola <i>et al.</i> (2000)
Fioro Sardo (ιταλικό τυρί)	<i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. graminis</i> , <i>Lb. curvatus</i>	Mannu <i>et al.</i> (2000)
Τυρί Emmental	<i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Gagnaire <i>et al.</i> (2001)
Τυρί Camembert	<i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. casei</i>	Henri-Dubernet <i>et al.</i> (2004)
Μπάντζος (παραδοσιακό Ελληνικό τυρί από μη παστεριωμένο γάλα κατσίκας)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. pentosus</i>	Psoni <i>et al.</i> (2003)
Τυρί Mozzarella	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Coppola <i>et al.</i> (2001)
Τυρί Ricotta	<i>Lb. acetotolerans</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. zeae</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paraplantarum</i>	Baruzzi <i>et al.</i> (2000)
Γιαούρτι	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Codex alimentarius (2003)
Ζυμωμένο γάλα	<i>Lb. kefir</i>	Garrote <i>et al.</i> (2004)
Κρασί	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. collinoides</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. mali</i>	Spano <i>et al.</i> (2005), Rodas <i>et al.</i> (2005)
Noodles	<i>Lb. plantarum</i>	Sawatari <i>et al.</i> (2005)
Αλλαντικά αέρος	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i>	Cocolin <i>et al.</i> (2004), Huerta <i>et al.</i> (2004), Fontana <i>et al.</i> (2005)
Πράσινες ελιές	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. pentosus</i>	Caggia <i>et al.</i> (2004), Campaniello <i>et al.</i> (2005)
Sourdough	<i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. pontis</i>	Vogel <i>et al.</i> (1999)
Sauerkraut	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i>	Plengvidhya <i>et al.</i> (2004)

1.4 Οι λακτοβάκιλλοι ως προβιοτικά

Μια σημαντική εφαρμογή των λακτοβάκιλλων είναι η προσθήκη προβιοτικών στελεχών σε διάφορα προϊόντα, προκειμένου να ενισχυθεί η υγεία ανθρώπων ή ζώων μέσω των ευεργετικών τους επιδράσεων στη γαστρεντερική οδό. Πολλοί ορισμοί για τα προβιοτικά έχουν προταθεί, αλλά αυτός που χρησιμοποιείται ευρέως προέρχεται από τον FAO (FAO/WHO, 2002): ‘Ζωντανοί μικροοργανισμοί, που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, επιφέρουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ξενιστή.’ Οι προβιοτικές επιδράσεις των λακτοβάκιλλων στον άνθρωπο έχουν πλήρως τεκμηριωθεί: ανακούφιση από τα συμπτώματα της δυσανοχής στη λακτόζη [16], θετικές επιδράσεις στη μικροχλωρίδα του εντέρου [17], αποτροπή μολύνσεων της εντερικής οδού [18], ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος [19], μείωση αλλεργικών αντιδράσεων [20], ρύθμιση της κινητικότητας του εντέρου [21] και προαγωγή της ευρωστίας του ατόμου [22]. Συγκεκριμένες επιδράσεις στην υγεία του ατόμου έχουν επίσης αναφερθεί: προστασία από τον καρκίνο του παχέος εντέρου [23], βελτίωση λιπιδαιμικού προφίλ [24], προστασία από λοιμώξεις του ουροποιητικού [25] και αντιδιαβητική δράση [26].

2. ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΣΑΛΑΜΙΑ ΑΕΡΟΣ

Τα σαλάμια αέρος έχουν μακρά παράδοση στις χώρες της Νότιας Ευρώπης, και εκτενείς έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση της μικροχλωρίδας των σαλαμιών που παράγονται στην Ελλάδα, την Ιταλία και την Ισπανία. Μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών έχουν απομονωθεί από σαλάμια αέρος είτε με τη χρήση βιοχημικών είτε με τη χρήση μοριακών μεθόδων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ανήκουν στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος και στα γένη *Staphylococcus* και *Kocuria* spp. Μεταξύ των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, ο *Lb. sakei*, ο *Lb. curvatus* και ο *Lb. plantarum* είναι τα στελέχη που απαντώνται συχνότερα στα σαλάμια αέρος είτε φυσικής ωρίμανσης είτε με τη χρήση αρχικών καλλιιεργειών [27].

Στη συνέχεια θα αναφερθούμε στις έρευνες που είχαν ως στόχο την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος από σαλάμια αέρος που προέρχονται από χώρες όπως η Ουγγαρία, η Ισπανία και η Ιταλία, με περισσότερη έμφαση στην Ελλάδα.

Ουγγαρία

Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2005 με διάφορα σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης προερχόμενα από την Ουγγαρία με χρήση μοριακών μεθόδων, βρέθηκε ότι ο *Lb.sakei* αντιπροσώπευε το 70,8% των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν, ενώ ακολουθούσε ο *Lb. curvatus* με 7,3% και ο *Leuconostoc mesenteroides* με 4% [28].

Ισπανία

Το 1993, ο Hugas M. και οι συνεργάτες του εξέτασαν 15 σαλάμια αέρος παρασκευασμένα από διαφορετικούς παραγωγούς, χωρίς τη χρήση αρχικών καλλιεργειών. Με χρήση βιοχημικών μεθόδων, έγινε η ταυτοποίηση των εξής βακτηρίων του γαλακτικού οξέος: *Lb.sakei* (55%), *Lb. curvatus* (26%), *Lb. bavaricus* (26%) και *Lb. plantarum* (8%) [29].

Το 'Chorizo' αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή ζυμωμένα αλλαντικά της Ισπανίας. Σκοπός του Santos EM. και των συνεργατών του, ήταν η απομόνωση και η ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος από Chorizos προερχόμενα από 3 διαφορετικές περιοχές της Ισπανίας. Ο *Lb.sakei* (68,8%) ήταν το κυρίαρχο στέλεχος, ενώ ακολουθούσε ο *Lb. curvatus* (16,5%) και ο *Pediococcus* sp. (8,5%) [30].

Με χρήση της μοριακής τεχνικής PCR, το 2003 ο Aymerich T. και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος από 10 διαφορετικά σαλάμια αέρος (είτε φυσικής ωρίμανσης είτε με τη χρήση αρχικών καλλιεργειών). Ο *Lb.sakei*, ο *Lb. curvatus* και ο *Lb. plantarum* αποτελούσαν τα κυρίαρχα στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν [31].

Οι ίδιοι ερευνητές το 2006 ταυτοποίησαν με μοριακές μεθόδους τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος από 21 παραδοσιακά ζυμωμένα αλλαντικά της Ισπανίας (chorizo, fuet και salchichon). Ο *Lb.sakei* ήταν το κυρίαρχο στέλεχος (74%). Ακολουθούσε ο *Lb. curvatus* (21,2%) και ο *Leuconostoc mesenteroides* (4,8%) [32].

Ιταλία

Το 1998, ο Rebecchi A. και οι συνεργάτες του με μοριακές τεχνικές μελέτησαν ένα γνωστό σαλάμι αέρος της Ιταλίας (Salame Milano). Ο *Lb.sakei* και ο *Lb. plantarum* ήταν τα δύο κυρίαρχα στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που ταυτοποιήθηκαν [33].

Το 2001, ο Parente E. και οι συνεργάτες του μελέτησαν διάφορα σαλάμια αέρος προερχόμενα από τη Νότια Ιταλία (salsiccia, soppressata, salame Milano, salame Napoli). Από το σύνολο των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν, το 50% χαρακτηρίστηκε ως *Lb.sakei*, το 22% ως *Pediococcus* spp. (κυρίως *Ped. pentosaceus*), το 7% ως *Leuconostoc* spp. (*Leuc. carnosum*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. pseudomesenteroides*), το 6% ως *Lb. plantarum* και το 1% ως *Lb. curvatus* [34].

Άλλες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τα επόμενα χρόνια με σαλάμια αέρος από διάφορες περιοχές της Ιταλίας κατέληξαν σε παρόμοια αποτελέσματα: ο *Lb.sakei*, ο *Lb. plantarum* και ο *Lb. curvatus* αποτελούν τα κυρίαρχα στελέχη ανάμεσα στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν [28,35,36].

Ελλάδα

Ο Samelis J. και οι συνεργάτες του ήταν από τους πρώτους ερευνητές που μελέτησαν τη μικροχλωρίδα των σαλαμιών αέρος στην Ελλάδα. Το 1994, προχώρησαν στην ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος από 5 σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης προερχόμενα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Το 25% των στελεχών χαρακτηρίστηκε ως *Lb. curvatus*, το 24% ως *Leuconostoc* spp., το 22% ως *Lb.sakei*, το 10% ως *Lb. plantarum* και το 5% ως *Lb. farciminis* [37].

Το 2003, η Paramanolι E. και οι συνεργάτες της εξέτασαν 2 σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης προερχόμενα από την περιοχή της Ξάνθης. Η πλειοψηφία των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκε ως *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* και *Lb. plantarum*, ενώ απομονώθηκαν και μικρότεροι πληθυσμοί βακτηρίων που άνηκαν στα γένη *Leuconostoc* spp. και *Pediococcus* spp [38].

Το 2005, ο Drosinos EH. και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν 3 σαλάμια αέρος χωρίς προσθήκη αρχικών καλλιεργειών για την ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που περιέχονταν σε αυτά. Η πλειοψηφία των στελεχών χαρακτηρίστηκε ως *Lb. plantarum* και *Lb. plantarum/pentosus* [39].

Έρευνες που ακολούθησαν τα επόμενα 2 χρόνια επιβεβαίωσαν ότι ο *Lb. curvatus*, ο *Lb. sakei* και ο *Lb. plantarum* αποτελούν τα κυρίαρχα στελέχη ανάμεσα στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος που συμμετέχουν στη ζύμωση των σαλαμιών αέρος. Στελέχη όπως ο *Lb. alimentarius*, ο *Lb. paraplantarum* και ο *Lb. rhamnosus* απομονώθηκαν από κάποια σαλάμια αέρος, αλλά σε μικρότερους πληθυσμούς [27,28,40].

ΤΑ ΓΕΝΗ *Staphylococcus* & *Micrococcus*

1.1 Εισαγωγή

Τα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Staphylococcus* και *Micrococcus* είναι αερόβιοι, Gram θετικοί κόκκοι και διαθέτουν το ένζυμο καταλάση, γεγονός που τα διαφοροποιεί από το γένος *Streptococcus* και από άλλους Gram θετικούς κόκκους. Είναι ανθεκτικά στην ξηρασία και στην υψηλή αλατότητα, και για τον λόγο αυτό τα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωσή τους περιέχουν άλατα σε υψηλή συγκέντρωση (7,5% NaCl) [41].

Τα δύο αυτά γένη μπορούν να διαχωριστούν με κριτήριο τις μεταβολικές τους διαφορές: τα βακτήρια του γένους *Micrococcus* είναι υποχρεωτικά αερόβια και παράγουν οξύ από τη γλυκόζη μόνο αερόβια, ενώ τα βακτήρια του γένους *Staphylococcus* είναι προαιρετικά αναερόβια και παράγουν οξύ τόσο αερόβια όσο και αναερόβια. Ακόμα, η αναλογία των βάσεων GC στο μόριο του DNA είναι μικρή για το γένος *Micrococcus*, ενώ για το γένος *Staphylococcus* είναι σχετικά υψηλή [41].

Η ταξινόμηση του γένους *Staphylococcus* έχει υποστεί αρκετές τροποποιήσεις. Ο Baird-Parker το 1974 διαχώρισε το γένος *Staphylococcus* σε τρία είδη: *S. aureus*, *S. epidermidis* και *S. saprophyticus*. Ο *S. aureus* χαρακτηρίστηκε από την παραγωγή της αγλουτινάσης (coagulase), ενός ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή του ινωδογόνου του πλάσματος σε ινώδες. Σήμερα, έχουν αναγνωριστεί πάνω από 26 είδη σταφυλόκοκκων. Τρία από αυτά περιέχουν το ένζυμο αγλουτινάση: *S. aureus*, *S. entermedius* και *S. hyicus*, και είναι τα περισσότερο μολυσματικά [87].

Οι σταφυλόκοκκοι είναι κοινά παράσιτα των ανθρώπων και των ζώων (δέρμα, βλεννογόνοι), ενώ απομονώνονται επίσης και από μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων όπως το κρέας, το τυρί και το γάλα, αλλά και από πηγές του περιβάλλοντος, όπως το χώμα, η άμμος, η σκόνη, ο ατμοσφαιρικός αέρας και το νερό [42]. Μεταξύ των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus*, ο *S. xylosus* και ο *S. saprophyticus* απομονώνονται συχνά από διάφορα είδη τροφίμων, ενώ ο *S. epidermidis* και ο *S.*

aureus απομονώνονται περιστασιακά [42]. Ο *S. xylosus* έχει απομονωθεί από το γάλα κατσίκας και το πρόβειο τυρί, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των σαλαμιών αέρος [42]. Οι *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* και *S. aureus* έχουν απομονωθεί από τρόφιμα όπως τα σαλάμια αέρος και το γάλα κατσίκας, ωστόσο, τα είδη αυτά θεωρούνται παθογόνα ή ευκαιριακά παθογόνα και συχνά ευθύνονται για την πρόκληση λοιμώξεων του ουροποιητικού, πυογενών λοιμώξεων, βακτηραιμίας, ενδοκαρδίτιδας, οστεομυελίτιδας και περιτονίτιδας [42]. Κάποια στελέχη του *S. aureus* θεωρούνται υπεύθυνα για το σύνδρομο του τοξικού σοκ, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό, εξάνθημα, εμετούς και διάρροια [41,42]. Ακόμα, κάποια στελέχη του *S. aureus* μπορούν να προκαλέσουν σταφυλοκοκκική δηλητηρίαση, μία από τις πιο συχνές τροφογενείς δηλητηριάσεις, η οποία προκαλείται από την εντεροτοξίνη που εκκρίνεται από τον μικροοργανισμό, όταν αυτός αναπτύσσεται σε τρόφιμο. Η δηλητηρίαση αυτή χαρακτηρίζεται από γαστρεντερίτιδα ή φλεγμονή στον πεπτικό σωλήνα, έντονους εμετούς και διάρροια [41].

1.2 Τα γένη *Staphylococcus* και *Micrococcus* σε σχέση με τα σαλάμια αέρος

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα γένη *Staphylococcus*, *Micrococcus* και *Kocuria* συμμετέχουν στις επιθυμητές δράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση των σαλαμιών αέρος. Ο Berdague και οι συνεργάτες του (1993) πρότειναν ότι το γένος *Staphylococcus* έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του αρώματος των σαλαμιών αέρος, ενώ ο ρόλος των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος είναι μάλλον δευτερευόν στο θέμα της ανάπτυξης του αρώματος [43].

Ο *S. xylosus* είναι το κυρίαρχο είδος σταφυλόκοκκου σε πολλά σαλάμια αέρος της Ιταλίας [44-48], και στο Ισπανικό ‘chorizo’ [49,50]. Ο *S. saprophyticus* και ο *S. carnosus* είναι τα κυρίαρχα είδη σταφυλόκοκκων στα ελληνικά σαλάμια αέρος [12,39,40], ενώ ο *S. saprophyticus* επίσης κυριαρχεί στα γαλλικά σαλάμια αέρος [42,51]. Και άλλα είδη σταφυλόκοκκων έχουν απομονωθεί από διάφορα σαλάμια αέρος, συνήθως σε μικρότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα προαναφερθέντα: *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. equorum*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S.*

intermedius, *S. pasteurii*. Στον πίνακα 3 συνοψίζονται οι έρευνες στις οποίες έγινε απομόνωση και ταυτοποίηση των διάφορων ειδών σταφυλόκοκκων από σαλάμια αέρος σε χώρες όπως η Ιταλία, η Γαλλία, η Ισπανία και η Ελλάδα.

Πίνακας 3: Είδη σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν από σαλάμια αέρος προερχόμενα από διάφορες χώρες της Ευρώπης.

Χώρα	Είδος σταφυλόκοκκου	Αναφορά
Ιταλία	<i>S. xylosus</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. cohnii</i>	Mauriello <i>et al.</i> (2000) [44]
Ιταλία	<i>S. xylosus</i> , <i>S. condimentii</i>	Rossi <i>et al.</i> (2001) [45]
Ιταλία	<i>S. xylosus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. condimentii</i> , <i>S. kloosi</i> , <i>S. vitulus</i> , <i>S. sucinus</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. caseolyticus</i>	Blaiotta <i>et al.</i> (2003) [46]
Ιταλία	<i>S. xylosus</i> , <i>S. pulvereri/vitulus</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sucinus</i> , <i>S. pasteurii</i>	Blaiotta <i>et al.</i> (2004) [47]
Ιταλία	<i>S. xylosus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. caseolyticus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. cohnii</i>	Iacumin <i>et al.</i> (2006) [48]
Ισπανία	<i>S. xylosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	Garcia-Varona <i>et al.</i> (2000) [49]
Ισπανία	<i>S. xylosus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>Kocuria varians</i>	Martinin <i>et al.</i> (2005) [50]
Γαλλία	<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	Morot-Bizot <i>et al.</i> (2004) [42]
Γαλλία	<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. warneri</i>	Morot-Bizot <i>et al.</i> (2006) [51]
Ελλάδα	<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>Kocuria varians</i>	Papamanoli <i>et al.</i> (2002) [12]
Ελλάδα	<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i>	Drosinos <i>et al.</i> (2005) [39]
Ελλάδα	<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. cohnii cohnii</i>	Drosinos <i>et al.</i> (2007) [40]

ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ

1.1 Εισαγωγή

Οι εντερόκοκκοι ανήκουν στην ομάδα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και είναι Gram θετικοί, μη σποριογόνοι, καταλάση-αρνητικοί, οξειδάση-αρνητικοί, προαιρετικά αναερόβιοι κόκκοι, οι οποίοι εμφανίζονται στο μικροσκόπιο είτε μονοί, είτε σε δυάδες, είτε σε αλυσίδες [52]. Το κυριότερο περιβάλλον τους είναι η γαστρεντερική οδός των ανθρώπων και των ζώων, και για τον λόγο αυτό χρησιμεύουν ως δείκτης περιττωματικής μόλυνσης [52]. Ως εκ τούτου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μικροβιολογία τροφίμων και τη δημόσια υγεία.

Οι εντερόκοκκοι παίζουν ιδιαίτερα ευεργετικό ρόλο στην παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων, όπως τυριά, σαλάμια αέρος και ελιές, ενώ αρκετά στελέχη χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως προβιοτικά [53]. Οι αρνητικές επιδράσεις των εντερόκοκκων σχετίζονται με την αλλοίωση ορισμένων τροφίμων, κυρίως νωπών ή/και επεξεργασμένων κρεάτων, ενώ ορισμένα στελέχη εντερόκοκκων μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, κυρίως σε ευαίσθητα ή ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Αυτός ο διττός ρόλος των εντερόκοκκων προκαλεί ανησυχία σχετικά με τη χρήση τους ως προβιοτικά ή ως αρχικές καλλιέργειες στη βιομηχανία τροφίμων [54].

1.2 Ταξινόμηση του γένους *Enterococcus* spp.

Το 1984 τα μέλη του γένους *Streptococcus* διαχωρίστηκαν σε 3 διαφορετικά γένη: *Streptococcus*, *Lactococcus* και *Enterococcus* σύμφωνα με πιο σύγχρονες τεχνικές ταξινόμησης. Τα τυπικά παθογόνα είδη παρέμειναν στο γένος *Streptococcus* και, με εξαίρεση τον *Streptococcus thermophilus*, διαχωρίστηκαν από τα μη παθογόνα και ευεργετικά είδη του νέου γένους *Lactococcus*. Οι ‘κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι’ που σχετίζονται με τη γαστρεντερική οδό ανθρώπων και ζώων, με κάποια ζυμωμένα τρόφιμα και με αρκετά άλλα περιβάλλοντα, αποτέλεσαν το νέο γένος *Enterococcus* [54]. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 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* [52].

Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασία 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 στους 60 °C για 30 λεπτά. Τα περισσότερα είδη εντερόκοκκων υδrolύουν το aesculin παρουσία χολικών αλάτων 40% [52].

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 και σε λοιμώξεις που σχετίζονται με εντερόκοκκους [54].

1.3 Σημαντικότερα περιβάλλοντα των εντερόκοκκων

Ο *E. faecalis* είναι συχνά ο κυρίαρχος εντερόκοκκος στο ανθρώπινο έντερο, αν και σε κάποια άτομα ο *E. faecium* υπερισχύει αριθμητικά έναντι του *E. faecalis*. Οι πληθυσμοί του *E. faecalis* στα ανθρώπινα κόπρανα κυμαίνονται από 10⁵ μέχρι 10⁷ CFU/gr, σε σύγκριση με 10⁴ έως 10⁵ CFU/gr για τον *E. faecium*. Ο *E. faecalis*, αλλά όχι ο *E. faecium*, έχει απομονωθεί από κόπρανα νεογνών [53].

Παρόλο που ο *E. faecalis*, ο *E. faecium* και ο *E. durans* απομονώνονται συχνά από ανθρώπινα κόπρανα, συναντώνται λιγότερο σε ζώα όπως τα γουρούνια, τα βοοειδή και τα πρόβατα [55]. Οι εντερόκοκκοι δε σχετίζονται μόνο με τα θερμόαιμα ζώα, αλλά απομονώνονται επίσης από το χώμα, τα επιφανειακά ύδατα και από διάφορα φυτά και λαχανικά. Ο *E. faecium* αποτελεί έναν από τους κυριότερους μικροοργανισμούς στο νωπό γάλα, πράγμα το οποίο έχει σημαντικές εφαρμογές στη βιομηχανία των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων [53].

1.4 Οι εντερόκοκκοι ως προβιοτικά

Τα προβιοτικά είναι μόνο- ή μικτές καλλιέργειες ζωντανών μικροοργανισμών οι οποίες, όταν καταναλώνονται από ανθρώπους ή ζώα, επιδρούν ευεργετικά στον ξενιστή, βελτιώνοντας τις ιδιότητες της ενδογενούς μικροχλωρίδας. Οι περισσότερες προβιοτικές καλλιέργειες είναι εντερικής προέλευσης και ανήκουν συνήθως στα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Ωστόσο, στελέχη του γένους *Enterococcus* χρησιμοποιούνται κάποιες φορές ως προβιοτικά [54].

Ένα καλά μελετημένο στέλεχος των εντερόκοκκων που χρησιμοποιείται ως προβιοτικό είναι το *E. faecium* SF 68, και παράγεται στην Ελβετία. Έχει προταθεί ότι το προβιοτικό αυτό είναι κλινικά αποτελεσματικό για τη μείωση της διάρκειας των διαρροϊκών συμπτωμάτων σε ενήλικες και σε παιδιά, και ότι συμβάλλει στην ομαλοποίηση των κοπράνων ασθενών που πάσχουν από εντερίτιδα [56]. Στη Δανία, κυκλοφορεί στην αγορά ένα ζυμωμένο γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο περιέχει *E. faecium* SF 68 και πωλείται για αρκετά χρόνια λόγω της υποχολεστερολαιμικής του δράσης σε ενήλικα άτομα [57].

Παρόλα αυτά, η χρήση των εντερόκοκκων ως προβιοτικά παραμένει ένα αμφιλεγόμενο θέμα. Αν και τα προβιοτικά οφέλη ορισμένων στελεχών εντερόκοκκων είναι καλά τεκμηριωμένα, η εμφάνιση αυξημένης συσχέτισης των εντερόκοκκων με ανθρώπινες ασθένειες και η πολλαπλή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (βλ. παρακάτω), έχουν προκαλέσει ανησυχία σχετικά με τη χρήση τους ως προβιοτικά. Το ενδεχόμενο της μεταφοράς γονιδίων, που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, και σε άλλα βακτήρια της γαστρεντερικής οδού ενισχύει περαιτέρω την υπάρχουσα ανησυχία [52].

1.5 Η παρουσία των εντερόκοκκων στα τρόφιμα

Οι εντερόκοκκοι απομονώνονται εύκολα από διάφορα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων και παραδοσιακών ζυμωμένων τροφίμων. Από τη στιγμή που αποβάλλονται στο περιβάλλον μέσω των ανθρώπινων 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. Μπορούν να αποικίσουν νωπά τρόφιμα (π.χ. γάλα και κρέας) και να πολλαπλασιαστούν σε αυτές τις ύλες κατά τη διάρκεια της ζύμωσής τους. Ως εκ τούτου, πολλά ζυμωμένα προϊόντα που προέρχονται από το γάλα και το κρέας (κυρίως τυριά και ζυμωμένα αλλαντικά) περιέχουν εντερόκοκκους σε μεγάλους πληθυσμούς. Οι πληθυσμοί αυτοί συνεισφέρουν στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων αυτών [9].

Σε πολλές περιπτώσεις, ωστόσο, οι εντερόκοκκοι αποτελούν παράγοντα αλλοίωσης σε μαγειρεμένα ή/και επεξεργασμένα κρέατα επειδή είναι ικανοί να επιζούν κατά τη διαδικασία της θέρμανσης, ειδικά όταν είναι παρόντες αρχικά σε αυξημένους πληθυσμούς. Με βάση τα παραπάνω, τόσο ο *E. faecalis* όσο και ο *E. faecium* έχουν ενοχοποιηθεί για την αλλοίωση παστεριωμένου χοιρινού σε κονσέρβα, ενώ ο *E. faecium* μπορεί να επιζήσει της θέρμανσης στους 68 °C για 30 λεπτά κατά τη διάρκεια της παρασκευής των λουκάνικων 'Φρανκφούρτης'. Επομένως, η παρουσία των εντερόκοκκων σε ζυμωμένα ή μη ζυμωμένα προϊόντα κρέατος μοιάζει μάλλον αναπόφευκτη, σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα τεχνολογικά δεδομένα [9].

1.6 Η παρουσία των εντερόκοκκων στα σαλάμια αέρος

Εντερόκοκκοι έχουν απομονωθεί από διάφορους τύπους σαλαμιών αέρος. Σε γερμανικά και ιταλικά σαλάμια αέρος, είτε φυσικής ωρίμανσης είτε παρασκευασμένα με τη χρήση αρχικών καλλιιεργειών, έχουν αναφερθεί πληθυσμοί εντερόκοκκων από 10^3 έως 10^5 CFU/gr [58]. Σε μια έρευνα με 31 αλλαντικά φυσικής ωρίμανσης, προερχόμενα από διάφορες περιοχές της βορειοανατολικής Ισπανίας, ο αριθμός των εντερόκοκκων κυμαινόταν από 1,3 έως 4,48 log CFU/gr [59].

Σε ό,τι αφορά τα είδη των εντερόκοκκων που απομονώνονται συνήθως από τα σαλάμια αέρος, ο *E. faecalis* και ο *E. faecium* αποτελούν τα κυρίαρχα είδη (ειδικά ο *E. faecalis*), ενώ ακολουθούν οι *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* και *E. avium* [60,61].

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

*Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά των βακτηρίων
του γαλακτικού οξέος, εντερόκοκκων
και σταφυλόκοκκων που απομονώνονται
από τρόφιμα, με έμφαση στα σαλάμια αέρος*

ANTIBIOTIKA ΦΑΡΜΑΚΑ [62]

1.1 Εισαγωγή

Τα αντιβιοτικά (αντιμικροβιακά) φάρμακα βρίσκουν εφαρμογή στη θεραπεία των λοιμώξεων από βακτήρια. Λόγω της επιλεκτικής τοξικότητάς τους είναι ικανά να εξουδετερώνουν τον εισβάλλοντα μικροοργανισμό, χωρίς να βλάπτουν τα κύτταρα του ξενιστή. Τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε *βακτηριοστατικά* και *βακτηριοκτόνα*. Τα βακτηριοστατικά φάρμακα διακόπτουν την ανάπτυξη και τον αναδιπλασιασμό των βακτηρίων, κι έτσι περιορίζουν την εξάπλωση της λοίμωξης, ενώ το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού επιτίθεται, ακινητοποιεί και εξολοθρεύει τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά θανατώνουν τα βακτήρια και ο συνολικός αριθμός των βιώσιμων μικροοργανισμών μειώνεται. Είναι δυνατόν ένα αντιβιοτικό να είναι βακτηριοστατικό για έναν μικροοργανισμό και βακτηριοκτόνο για έναν άλλο (π.χ. η χλωραμφενικόλη έχει βακτηριοστατική δράση εναντίον Gram-αρνητικών βακίλλων και βακτηριοκτόνο έναντι των πνευμονιόκοκκων).

Ανάλογα με το χημειοθεραπευτικό τους φάσμα, τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε αντιβιοτικά *στενού φάσματος* (δρουν μόνο εναντίον ενός μικροοργανισμού ή μιας μικρής ομάδας μικροοργανισμών), *εκτεταμένου φάσματος* (είναι αποτελεσματικά για Gram-θετικά βακτήρια και σημαντικό αριθμό Gram-αρνητικών βακτηρίων) και *ευρέως φάσματος* (δρουν εναντίον μεγάλης ποικιλίας βακτηρίων).

1.2 Ταξινόμηση αντιμικροβιακών φαρμάκων

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους, π.χ. ανάλογα με τη χημική τους δομή (β-λακτάμες, αμινογλυκοσίδες), το μηχανισμό δράσης (αναστολείς σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος) ή τη δράση εναντίον συγκεκριμένης κατηγορίας μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες, ιοί). Στο επόμενο τμήμα η περιγραφή θα γίνει με βάση τον μηχανισμό δράσης του αντιβιοτικού.

Ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος

A. ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ:

Οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν τη σύνθεση του βακτηριακού φυλλικού οξέος λόγω της δομικής τους αναλογίας με το π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA), ουσία η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του φυλλικού από βακτήρια. Οι σουλφοναμίδες συναγωνίζονται με το PABA για το ένζυμο διυδροπτεροϊκή συνθετάση, εμποδίζοντας έτσι τη σύνθεση του βακτηριακού φυλλικού οξέος, και κατ' επέκταση πουρινών, πυριμιδινών και αμινοξέων. Οι σουλφοναμίδες είναι βακτηριοστατικά αντιβιοτικά και είναι αποτελεσματικές για συγκεκριμένα είδη εντεροβακτηρίων, χλαμύδια, *Pneumocystis* και *Nocardia*.

<u>ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ</u>	
<i>Μαφενίδη</i>	<i>Σουλφαδιαζίνη</i>
<i>Αργυρούχος σουλφαδιαζίνη</i>	<i>Σουλφαμεθοξαζόλη</i>
<i>Σουκκινυλοσουλφαδιαζόλη</i>	<i>Σουλφασαζίνη</i>
<i>Σουλφακεταμίδη</i>	<i>Σουλφισοξαζόλη</i>

B. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ:

Τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας αναστέλλουν τη βακτηριακή αναγωγή του διυδροφυλλικού, η οποία μετατρέπει το φυλλικό οξύ σε τετραϋδροφυλλικό, δηλαδή στη δραστική του μορφή. Το αντιβακτηριακό φάσμα των αντιβιοτικών αυτών είναι παρόμοιο με αυτό των σουλφοναμίδων, αν και οι αναστολείς της αναγωγής του φυλλικού είναι 20 έως 50 φορές ισχυρότερα αντιβιοτικά από τις σουλφοναμίδες.

<u>ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ</u>	
<i>Τριμεθοπρίμη</i>	<i>Πυριμεθαμίνη</i>

Γ. ΚΟ-ΤΡΙΜΟΞΑΖΟΛΗ:

Το αντιβιοτικό αυτό δρα αναστέλλοντας δύο διαδοχικά στάδια στη σύνθεση του τετραϋδροφυλλικού οξέος και παρουσιάζει ευρύτερο φάσμα δράσης από τις σουλφοναμίδες, αλλά και ισχυρότερη δράση.

Αναστολείς της σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος

Α. β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ:

Είναι τα αντιβιοτικά με την ευρύτερη αποτελεσματικότητα και ανήκουν στα λιγότερο τοξικά από τα γνωστά φάρμακα. Οι β-λακτάμες παρεμβαίνουν στο τελικό στάδιο της σύνθεσης βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, αφήνοντας έτσι εκτεθειμένη την λιγότερο σταθερή ωσμωτικά κυτταρική μεμβράνη. Μπορεί τότε να λάβει χώρα η λύση του κυττάρου και επομένως τα αντιβιοτικά αυτά είναι βακτηριοκτόνα. Οι β-λακτάμες αποτελούν πολλές φορές τον ακρογωνιαίο λίθο για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από αρκετούς Gram-θετικούς και Gram-αρνητικούς κόκκους, Gram-θετικούς βάκιλλους και σπειροχαίτες. Οι β-λακταμάσες αποτελούν μια ομάδα βακτηριακών ενζύμων, οι οποίες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τον β-λακταμικό δακτύλιο των αντιβιοτικών, με αποτέλεσμα την απώλεια της αντιμικροβιακής τους δράσης.

<i>β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ</i>		
<i>Πενικιλίνη G</i>	<i>Κλοξακιλλίνη</i>	<i>Τικαρκιλλίνη</i>
<i>Πενικιλίνη B</i>	<i>Δικλοξακιλλίνη</i>	<i>Πιπερακιλλίνη</i>
<i>Μεθικιλίνη</i>	<i>Αμπικιλίνη</i>	<i>Μεζλοκιλλίνη</i>
<i>Ναφκιλλίνη</i>	<i>Αμοξικιλίνη</i>	<i>Αζλοκιλλίνη</i>
<i>Οξακιλλίνη</i>	<i>Καρβενικιλίνη</i>	

B. ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ :

Είναι β-λακταμικά αντιβιοτικά που συγγενεύουν στενά με τις πενικιλλίνες, τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Παρουσιάζουν ίδιο μηχανισμό δράσης με τις πενικιλλίνες και ταξινομούνται σε πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς με σημαντικότερο κριτήριο την ευαισθησία των βακτηρίων και την αντοχή στις β-λακταμάσες.

ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ		
1^{ης} γενιάς	2^{ης} γενιάς	3^{ης} γενιάς
<i>Κεφαζολίνη</i>	<i>Κεφακλόρη</i>	<i>Κεφιζίμη</i>
<i>Κεφαδροξίλη</i>	<i>Κεφαμανδόλη</i>	<i>Κεφοπεραζόνη</i>
<i>Κεφαλεξίνη</i>	<i>Κεφονισίδη</i>	<i>Κεφοταξίμη</i>
<i>Κεφαλοθίνη</i>	<i>Κεφμεταζόλη</i>	<i>Κεφταξιμίδη</i>
<i>Κεφαπρίνη</i>	<i>Κεφοτετάνη</i>	<i>Κεφτιζοξίμη</i>
<i>Κεφραδίνη</i>	<i>Κεφοξιτίνη</i>	<i>Κεφτριαζόνη</i>
	<i>Κεφουροξίμη</i>	<i>Μοξαλακτάμη</i>

Γ. ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ :

Είναι συνθετικά β-λακταμικά αντιβιοτικά και η *ιμιπενέμη* είναι το μοναδικό φάρμακο της οικογένειας αυτής που κυκλοφορεί στο εμπόριο. Έχει ευρύτατο αντιμικροβιακό φάσμα, είναι ανθεκτική στις περισσότερες β-λακταμάσες, και χρησιμοποιείται ως εμπειρική θεραπεία επειδή είναι δραστική εναντίον Gram-θετικών και Gram-αρνητικών μικροοργανισμών, αερόβιων και αναερόβιων και εναντίον της *Pseudomonas aeruginosa*.

Δ. ΜΟΝΟΒΑΚΤΑΜΕΣ :

Από τις μονοβακτάμες, η *αζτρεονάμη* είναι ο μοναδικός εκπρόσωπος που κυκλοφορεί στο εμπόριο. Το στενό αντιμικροβιακό φάσμα του αντιβιοτικού αυτού (δραστικό εναντίον εντεροβακτηρίων και Gram-αρνητικών αερόβιων κόκκων) αποκλείει τη χρησιμοποίησή του μόνου του, ως εμπειρική θεραπεία.

Ε. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΗΣ :

Η υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου με ενζυματική διάσπαση από β-λακταμάσες εξαφανίζει την αντιμικροβιακή δράση. Οι αναστολείς της β-λακταμάσης, όπως το κλαβουλανικό οξύ, δεν παρουσιάζουν σημαντική αντιβακτηριδιακή δράση. Αντίθετα, συνδέονται με τις β-λακταμάσες και τις αδρανοποιούν, προστατεύοντας έτσι τα αντιβιοτικά που αποτελούν υποστρώματα για τα ένζυμα αυτά (π.χ. πενικιλίνες και παράγωγά τους).

<i>ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΗΣ</i>		
<i>Κλαβουλανικό οξύ</i>	<i>Σουλβακτάμη</i>	<i>Ταζοβακτάμη</i>

ΣΤ. ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ

ΤΟΙΧΩΜΑ:

I. Βανκομυκίνη: Είναι ένα τρικυκλικό γλυκοπεπτιδίο που έχει αποκτήσει μεγάλη σημασία επειδή είναι δραστικό εναντίον μικροοργανισμών ανθεκτικών σε μεγάλο αριθμό φαρμάκων, όπως οι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκοι. Η εμφάνιση εντερόκοκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη (βλ. παρακάτω) απασχολεί έντονα τον ιατρικό χώρο. Η βανκομυκίνη αναστέλλει τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων του κυτταρικού τοιχώματος, καθώς και τον πολυμερισμό των πεπτιδογλυκανών. Για να περιοριστεί η αύξηση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη μικροοργανισμών η χρήση της περιορίζεται στη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων από Gram-θετικούς μικροοργανισμούς ανθεκτικούς στις β-λακτάμες ή σε περιπτώσεις λοιμώξεων με Gram-θετικούς μικροοργανισμούς σε άτομα που εμφανίζουν σοβαρή αλλεργία στις β-λακτάμες. Στην κατηγορία των γλυκοπεπτιδίων ανήκει και η τεϊχοπλανίνη, με λιγότερο ισχυρή δράση από τη βανκομυκίνη.

II. Βασιτρακίνη: Είναι ένα μίγμα πολυπεπτιδίων που αναστέλλει τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Είναι δραστική εναντίον μιας μεγάλης ποικιλίας Gram-θετικών οργανισμών.

Αναστολείς της σύνθεσης πρωτεϊνών

A. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ:

Οι τετρακυκλίνες εισέρχονται στους ευαίσθητους μικροοργανισμούς μέσω μεταφορικών πρωτεϊνών που βρίσκονται στην εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων. Η σύνδεση του αντιβιοτικού με την υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης από το βακτήριο. Οι τετρακυκλίνες, καθώς είναι ευρέως φάσματος αντιβιοτικά, είναι αποτελεσματικές και για άλλους μικροοργανισμούς εκτός από τα βακτήρια. Πρόκειται για βακτηριοστατικά αντιβιοτικά.

<i>ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ</i>			
<i>Δεμεκλοκυκλίνη</i>	<i>Δοξυκυκλίνη</i>	<i>Μινοκυκλίνη</i>	<i>Τετρακυκλίνη</i>

B. ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ:

Οι αμινογλυκοσίδες αποτελούσαν τη βάση της θεραπείας σοβαρών λοιμώξεων από αερόβιους Gram-αρνητικούς βάκιλλους. Όμως, λόγω σοβαρών τοξικών παρενεργειών, έχουν αντικατασταθεί σε κάποιο βαθμό από ασφαλέστερα αντιβιοτικά, όπως οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς, οι φθοριοκινολόνες και η ιμιπενέμη. Όλες οι αμινογλυκοσίδες είναι βακτηριοκτόνα φάρμακα και είναι αποτελεσματικές μόνο για αερόβιους μικροοργανισμούς. Η στρεπτομυκίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της φυματίωσης, της πανώλης, της τουλαραιμίας και σε συνδυασμό με πενικιλίνη, για την ενδοκαρδίτιδα που προκαλείται από τον *Streptococcus viridans*.

<i>ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ</i>		
<i>Αμικασίνη</i>	<i>Νεομυκίνη</i>	<i>Στρεπτομυκίνη</i>
<i>Γενταμυκίνη</i>	<i>Νετιλμικίνη</i>	<i>Τομπραμυκίνη</i>
<i>Καναμυκίνη</i>	<i>Λινκομυκίνη</i>	

Γ. ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ:

Η ερυθρομυκίνη ήταν η πρώτη από τις μακρολίδες που χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική πράξη, τόσο ως φάρμακο εκλογής, όσο και ως εναλλακτική λύση στη θέση της πενικιλίνης σε ασθενείς με αλλεργία στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Οι μακρολίδες συνδέονται μη αντιστρεπτά σε μια θέση της 50S υπομονάδας του βακτηριακού ριβοσώματος, αναστέλλοντας έτσι τα στάδια μετατόπισης της πρωτεϊνικής σύνθεσης.

<i>ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ</i>		
<i>Αζιθρομυκίνη</i>	<i>Κλαριθρομυκίνη</i>	<i>Ερυθρομυκίνη</i>

Δ. ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗ:

Είναι δραστική για ένα ευρύ φάσμα Gram-θετικών και Gram-αρνητικών μικροοργανισμών, εξαιτίας όμως της τοξικότητάς της, η χρήση της περιορίζεται σε λοιμώξεις που απειλούν τη ζωή του ασθενή και στις οποίες δεν υπάρχουν άλλες εναλλακτικές λύσεις. Το αντιβιοτικό συνδέεται με την υπομονάδα 50S του βακτηριακού ριβοσώματος και αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση. Η χλωραμφενικόλη είναι δραστική εναντίον διαφόρων τύπων βακτηρίων όπως είναι οι ρικέτσιες, ενώ έχει εξαιρετική αποτελεσματικότητα εναντίον των αναερόβιων μικροοργανισμών. Ανάλογα με τον μικροοργανισμό, το αντιβιοτικό μπορεί να έχει βακτηριοκτόνο ή (συχνότερα) βακτηριοστατική δράση.

Ε. ΚΛΙΝΔΑΜΥΚΙΝΗ:

Ο μηχανισμός δράσης της κλινδαμυκίνης είναι όμοιος με εκείνον της ερυθρομυκίνης. Η κλινδαμυκίνη χρησιμοποιείται κυρίως στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από αναερόβια βακτήρια, όπως το *Bacteroides fragilis*, το οποίο συχνά ευθύνεται για ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις που συνοδεύουν τραυματισμούς.

Κινολόνες και αντισηπτικά των ουροφόρων οδών

A. ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ:

Οι φθοριοκινολόνες εισέρχονται στο κύτταρο με παθητική διάχυση, μέσω υδρόφιλων πρωτεϊνικών διαύλων γεμάτων με νερό (πορίνες), που εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Ενδοκυττάρια αναστέλλουν με μοναδικό τρόπο τον αναδιπλασιασμό του βακτηριακού DNA, παρεμβαίνοντας στη δράση της γυράσης του DNA (τοποϊσομεράση II). Όλες οι φθοριοκινολόνες έχουν βακτηριοκτόνο δράση. Είναι γενικά δραστικές εναντίον Gram-αρνητικών μικροοργανισμών, όπως εντεροβακτήρια, ψευδομονάδες, *Haemophilus influenzae*, *Moxarella catarrhalis*, *Legionella*, *Chlamydia* και *Mycobacterium* Av και είναι δραστικές εναντίον ορισμένων Gram-θετικών μικροοργανισμών, θα πρέπει να αποφεύγονται για τη θεραπεία λοιμώξεων από πνευμονιόκοκκο ή εντερόκοκκο. Η σιπροφλοξασίνη είναι η πιο ισχυρή φθοριοκινολόνη.

ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ		
<i>Ενοξασίνη</i>	<i>Νορφλοξασίνη</i>	<i>Σιπροφλοξασίνη</i>
<i>Λομεφλοξασίνη</i>	<i>Οφλοξασίνη</i>	

B. ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ:

Το ναλιδιξικό οξύ είναι μια μη φθοριωμένη κινολόνη, που έχει τον ίδιο μηχανισμό δράσης με τις φθοριοκινολόνες. Είναι αποτελεσματική για τους περισσότερους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς που προκαλούν συχνά ουρολοιμώξεις, ενώ οι Gram-θετικοί μικροοργανισμοί είναι ανθεκτικοί. Η χρησιμότητά του στην κλινική πράξη είναι περιορισμένη εξαιτίας της ταχείας εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών.

ΣΤ. ΑΝΤΙΣΗΠΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΥΡΟΦΟΡΩΝ ΟΔΩΝ:

I. Μεθεναμίνη: Για να δράσει η μεθεναμίνη πρέπει να διασπαστεί στο όξινο pH των ούρων (5,5 ή λιγότερο), παράγοντας έτσι φορμαλδεΐδη η οποία είναι τοξική για τα περισσότερα βακτήρια. Η μεθεναμίνη χρησιμοποιείται κυρίως για χρόνια κατασταλτική θεραπεία. Τα βακτήρια που κάνουν τα ούρα αλκαλικά, όπως στελέχη του γένους *Proteus*, εμφανίζουν συνήθως ανθεκτικότητα στη δράση της.

II. Νιτροφουραντοΐνη: Χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά για τη θεραπεία των ουρολοιμώξεων, λόγω της τοξικότητας και του στενού αντιμικροβιακού της φάσματος. Σε ό,τι αφορά τον μηχανισμό δράσης της, τα ευαίσθητα βακτήρια ανάγουν το αντιβιοτικό προς έναν ενεργό παράγοντα που αναστέλλει διάφορα βακτηριακά ένζυμα και καταστρέφει το DNA. Το αντιβιοτικό είναι βακτηριοστατικό. Είναι χρήσιμο κατά της *Escherichia coli*, ενώ άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια των ουροφόρων οδών μπορεί να είναι ανθεκτικά. Οι Gram-θετικοί κόκκοι είναι ευαίσθητοι.

ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ

Η ριφαμπικίνη ανήκει στα αντιμυκοβακτηριακά φάρμακα, ωστόσο παρουσιάζει ευρεία αντιμικροβιακή δράση και βρίσκει εφαρμογή στη θεραπεία και άλλων βακτηριακών λοιμώξεων. Η ριφαμπικίνη αναστέλλει τη μεταγραφή αντιδρώντας με τη β-υποομάδα της βακτηριακής DNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, παρεμποδίζοντας έτσι τη σύνθεση του RNA. Η ριφαμπικίνη είναι βακτηριοκτόνος και για τα ενδοκυττάρια και για τα εξωκυττάρια στελέχη του γένους *Mycobacterium*, συμπεριλαμβανομένου του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης και του μυκοβακτηρίου της λέπρας. Είναι αποτελεσματική εναντίον πολλών Gram-θετικών και Gram-αρνητικών μικροοργανισμών.

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ANTIBIOTIKA

1.1 Εισαγωγή

Η εκτεταμένη και αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών στη θεραπευτική ιατρική και στην κτηνοτροφία για περισσότερο από μισό αιώνα ευθύνεται σημαντικά για την ολοένα και αυξανόμενη εμφάνιση ανθεκτικών βακτηρίων. Τα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά όταν η ανάπτυξή τους δεν αναστέλλεται από τη μέγιστη συγκέντρωση ενός αντιβιοτικού που είναι ανεκτή από τον ξενιστή. Διάφοροι αντιμικροβιακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία για θεραπευτικούς λόγους και για την αποφυγή ασθενειών, αλλά και σαν παράγοντες ανάπτυξης των ζώων, επιταχύνοντας τον ρυθμό αύξησης του βάρους τους [63].

Στη Σουηδία, η χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων ως παράγοντες ανάπτυξης των ζώων έχει απαγορευτεί από το 1986 [64]. Η απόσυρση όλων των αντιμικροβιακών παραγόντων ανάπτυξης από τη Δανία, που ξεκίνησε τον Φεβρουάριο του 1998, είχε ως αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση της ανθεκτικότητας στην αβιλαμυκίνη (avilamycin), στην ερυθρομυκίνη και στην βανκομυκίνη. Το 1997, απαγορεύτηκε η χρήση της αβοπαρκίνης (avoparcin), της τυλοσίνης (tylosin), της σπιραμυκίνης (spiramycin) και της βιργινιαμυκίνης (virginiamycin) στην εκτροφή των ζώων σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση, εξαιτίας της δομικής αναλογίας των αντιμικροβιακών αυτών παραγόντων με αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική ιατρική και στην κλινική πράξη [65].

Παρόλα αυτά, σε αρκετές χώρες εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης οι παραπάνω οδηγίες δεν έχουν εφαρμοστεί, και ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων της πενικιλίνης και της τετρακυκλίνης, εξακολουθούν και χρησιμοποιούνται ως παράγοντες ανάπτυξης [66]. Σε χώρες εκτός της Ευρωπαϊκής Ένωσης η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία είναι μάλλον ανεξέλεγκτη [66], ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες 6,8 τόνοι αντιβιοτικών χορηγούνται ετησίως στα ζώα, συμπεριλαμβανομένων της χλωροτετρακυκλίνης, της αβοπαρκίνης (avoparcin) και της πενικιλίνης [67].

Η παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων σε ζώα και σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης προκαλεί ακόμα μεγαλύτερη ανησυχία, καθώς γονίδια ανθεκτικότητας από τα βακτήρια αυτά μπορούν να μεταφερθούν μέσω πλασμιδίων και άλλων μεταφερόμενων γενετικών στοιχείων σε παθογόνα ή ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια, καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο δύσκολη ή αδύνατη τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τους παθογόνους αυτούς μικροοργανισμούς [68]. Επίσης, φαίνεται ότι τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας των ζώων και του ανθρώπου μπορούν να αποτελέσουν ‘δεξαμενές’ γονιδίων ανθεκτικότητας. Τα ‘βακτήρια-δεξαμενές’ της εντερικής μικροχλωρίδας μπορούν να μολύνουν το νωπό κρέας και τα παράγωγά του, ακόμα και όταν εφαρμόζονται οι πιο αυστηροί κανόνες υγιεινής, και με αυτόν τον τρόπο τα γονίδια ανθεκτικότητας μπορούν να μεταφερθούν σε όλο το μήκος της τροφικής αλυσίδας [65].

Μη παθογόνα, αλλά ανθεκτικά σε αντιβιοτικά βακτήρια, όπως οι λακτοβάκιλλοι και οι εντερόκοκκοι, απομονώνονται συνεχώς από ζώα (πουλερικά, μοσχάρια) και από κόπρανα υγιών ατόμων [65]. Βακτήρια που συμμετέχουν στη ζύμωση του κρέατος και αυτά που χρησιμοποιούνται ως αρχικές καλλιέργειες μπορούν επίσης να αποτελέσουν ‘δεξαμενές’ γονιδίων ανθεκτικότητας [9]. Όπως θα δούμε παρακάτω, ανθεκτικά βακτήρια και γονίδια ανθεκτικότητας έχουν απομονωθεί κατά καιρούς από διάφορους τύπους σαλαμιών αέρος και άλλα ζυμωμένα αλλαντικά.

1.2 Γενετική βάση και εξάπλωση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Η ανθεκτικότητα ενός βακτηρίου στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι *εγγενής (intrinsic)* ή *επίκτητη (acquired)*. Η εγγενής (φυσική) ανθεκτικότητα ελέγχεται από γονίδια εντοπισμένα στα χρωμοσώματα του μικροοργανισμού [3]. Η επίκτητη (μεταφερόμενη) ανθεκτικότητα σε έναν αντιμικροβιακό παράγοντα είναι αποτέλεσμα μιας αλλαγής του γονιδιώματος του μικροοργανισμού. Η *πρωτογενής οδός* μέσω της οποίας μπορεί να προκύψει η αλλαγή του γονιδιώματος συνίσταται στην αυτόματη μετάλλαξη ενός φυσιολογικού γονιδίου σε γονίδιο ανθεκτικότητας (*de novo* ανθεκτικότητα). Η *δευτερογενής οδός* περιλαμβάνει την απόκτηση γονιδίων ανθεκτικότητας προερχόμενα από βακτήρια ‘δωρητές’ μέσω βακτηριακής σύζευξης

(conjugation), μετασχηματισμού (transformation) ή μεταγωγής μέσω βακτηριοφάγων (transduction) [69]. Αυτές οι τρεις διαδικασίες αποτελούν τις τρεις διαφορετικές μορφές της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων [69]. Ο πίνακας 4 συνοψίζει τις οδούς για την ανάπτυξη επίκτητης ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Πίνακας 4: Οδοί για την εμφάνιση επίκτητης ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.
(Πηγή: B. Catry et al., 2003).

ΟΔΟΣ	ΟΡΙΣΜΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ
Πρωτογενής			
Μετάλλαξη	Αυτόματη αλλαγή στο γονιδίωμα	Αρκετά χαμηλή	Κινολόνες (<i>Salmonella</i> spp) ΡΙφαμπικίνη (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
Δευτερογενής (απόκτηση DNA)			
Μετασχηματισμός	Πρόσληψη γυμνού DNA από το περιβάλλον από βακτήρια ‘δωρητές’	Πιθανόν έχει υποεκτιμηθεί	Streptococci (PBPs)*, <i>Bacillus</i> spp.
Σύζευξη	Μεταφορά γονιδίων από βακτήρια ‘δωρητές’ σε βακτήρια δέκτες μέσω πρωτεϊνικού διαύλου. Ελέγχεται από πλασμίδια ή μεταθετά στοιχεία (transposons)	Συχνή	Enterobacteriaceae (ACSSuT) [§]
Μεταγωγή	Γονίδια ανθεκτικότητας μεταφέρονται μέσω βακτηριοφάγων.	Σπάνια	Staphylococci, <i>Pseudomonas</i> spp.

* PBPs: ανθεκτικότητα μέσω μετάλλαξης στις πρωτεΐνες πρόσδεσης της πενικιλίνης (Penicillin Binding Proteins)

[§] ACSSuT: ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, χλωραμφενικόλη, στρεπτομυκίνη, σουλφοναμίδες και τετρακυκλίνη

Η βακτηριακή σύζευξη μέσω πρωτεϊνικών διαύλων (conjugation) αποτελεί τον πιο σημαντικό μηχανισμό μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας. Έχει υπολογιστεί ότι το 85% των αποτυχημένων θεραπειών κατά των σταφυλόκοκκων (β-λακτάμες), των εντεροβακτηρίων (αμπικιλίνη, σουλφα/τριμεθοπρίμη, γενταμυκίνη, χλωραμφενικόλη) και των εντερόκοκκων (βανκομυκίνη) μπορεί να αποδοθεί σε ανθεκτικότητα που προκλήθηκε μέσω σύζευξης (conjugation) [70]. Η ταχύτατη οριζόντια μεταφορά γονιδίων που πραγματοποιείται κατά τη σύζευξη συνίσταται στη διάδοση μεταφερόμενων γενετικών στοιχείων όπως τα πλασμίδια (ικανά να πολλαπλασιάζονται αυτόνομα) και τα μεταθετά στοιχεία (μη ικανά να πολλαπλασιάζονται αυτόνομα, κίνηση μέσω ειδικών ενζύμων), πάνω στα οποία βρίσκονται εντοπισμένα τα γονίδια ανθεκτικότητας [69].

Η κλινική επίπτωση της επίκτητης ανθεκτικότητας μπορεί να διαχωριστεί σε δύο διαφορετικούς τύπους ανάλογα με την αλλαγή στο βακτηριακό γονιδίωμα. Ο *πρώτος* τύπος είναι σταδιακός και είναι συνήθως αποτέλεσμα διαδοχικών μεταλλάξεων. Σε αυτόν τον τύπο, χαμηλότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού δεν έχουν καμία επίδραση στον μικροοργανισμό, ενώ χρειάζονται συνεχώς υψηλότερες συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού παράγοντα προκειμένου να ανασταλεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού, λόγω των διαδοχικών μεταλλάξεων [69]. Ο *δεύτερος* τύπος είναι υπεύθυνος για την πλήρη ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στον αντιμικροβιακό παράγοντα. Ακόμα και υψηλότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού. Αυτός είναι ο κυριότερος τύπος αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας και συνήθως είναι αποτέλεσμα της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων [69].

Ο εντοπισμός των γονιδίων ανθεκτικότητας στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού είναι σημαντικός. Τα γονίδια ανθεκτικότητας που βρίσκονται στα χρωμοσώματα μεταφέρονται κάθετα (clonal spread), ενώ τα γονίδια ανθεκτικότητας που εντοπίζονται στα πλασμίδια ή στα μεταθετά στοιχεία μπορούν να μεταφερθούν είτε οριζόντια είτε κάθετα. Ως εκ τούτου, ο τελευταίος μηχανισμός μεταφοράς (είτε οριζόντια είτε κάθετα) είναι περισσότερο αποδοτικός και αποτελεσματικός [71].

1.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας, διασταυρούμενη ανθεκτικότητα (cross-resistance) και συν-επιλογή (co-selection)

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας μπορεί να είναι είτε μόνιμοι είτε προκλητοί, ανάλογα με το αν τα γονίδια ανθεκτικότητας εκφράζονται πάντα ή αν εκφράζονται μόνο παρουσία του αντιμικροβιακού παράγοντα. Οι περισσότεροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας είναι μόνιμοι. Επαγόμενη ανθεκτικότητα έχει περιγραφεί στους Gram θετικούς κόκκους για τις μακρολίδες και στους Gram αρνητικούς βάκιλλους για τις β-λακτάμες [69].

Περισσότεροι από ένας μηχανισμοί ανθεκτικότητας μπορεί να είναι παρόντες σε ένα δεδομένο βακτήριο. Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας είναι η τροποποίηση/αδρανοποίηση του αντιβιοτικού, η μειωμένη ενδοκυττάρια συσσώρευση του και η αλλαγή του σημείου-στόχου. Η τροποποίηση του αντιμικροβιακού παράγοντα συνίσταται στην ενζυμική τροποποίηση ή αδρανοποίηση του αντιβιοτικού, η οποία εμποδίζει το μόριο να φτάσει στο σημείο στόχο (π.χ. αδρανοποίηση της πενικιλίνης και των κεφαλοσπορινών από β-λακταμάσες). Ο δεύτερος μηχανισμός προκύπτει από μια μεταβολή στις πορίνες του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα είτε τη μειωμένη πρόσληψη είτε την αυξημένη απομάκρυνση του αντιμικροβιακού παράγοντα από το κύτταρο. Η μειωμένη ενδοκυττάρια συσσώρευση του αντιβιοτικού αναστέλλει τις φυσιολογικές ενδοκυτταρικές του δράσεις. Για παράδειγμα, αυξημένη απομάκρυνση της τετρακυκλίνης μπορεί να προκληθεί από γονίδια εκροής της τετρακυκλίνης (*efflux genes: tet* {A-E}), τα οποία εντοπίζονται σε ποικιλία βακτηρίων. Ο τρίτος μηχανισμός ανθεκτικότητας προκαλείται από χημική μετατροπή του σημείου-στόχου. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στα γονίδια της DNA γυράσης και τοποϊσομεράσης μπορούν να προκαλέσουν δομικές αλλαγές οι οποίες αναστέλλουν την πρόσδεση των φθοριοκινολονών στα σημεία στόχους [69].

Η διασταυρούμενη ανθεκτικότητα προκύπτει από έναν μηχανισμό ανθεκτικότητας, ο οποίος κάνει τα βακτήρια μη ευαίσθητα σε περισσότερους από έναν

αντιμικροβιακούς παράγοντες. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται συχνά για διαφορετικά μόρια μιας δεδομένης κατηγορίας αντιβιοτικών, τα οποία αποτελούν δομικά ανάλογα (π.χ. τετρακυκλίνες). Για παράδειγμα, τα γονίδια *tet (M)* προκαλούν ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη, στη δοξυκυκλίνη, στη χλωροτετρακυκλίνη και στη μινocyκλίνη. Διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει επίσης εάν διαφορετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες δρουν στο ίδιο σημείο-στόχο του μικροοργανισμού. Η παρουσία του γονιδίου *erm (X)* προκαλεί ανθεκτικότητα στις μακρολίδες, στις λινκοσαμίδες και στις Β-στρεπτογγραμίνες [69].

Με τη συνεπιλογή, προκαλείται ανθεκτικότητα σε αρκετά διαφορετικά αντιβιοτικά, παρόλο που χρησιμοποιείται ένας μόνο αντιμικροβιακός παράγοντας. Ως εκ τούτου, η συνεπιλογή αποκτά εξαιρετική σημασία [72]. Οι Levy et al. παρατήρησαν το φαινόμενο της συνεπιλογής σε κολίμορφα που απομονώθηκαν από την εντερική μικροχλωρίδα κοτόπουλων. Η χορήγηση τετρακυκλίνης *per os* είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας των κολίμορφων όχι μόνο στην τετρακυκλίνη, αλλά και στην αμπικιλίνη, τη στρεπτομυκίνη και τις σουλφοναμίδες [92].

1.4 Επιδημιολογία της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Η εξελικτική πίεση (*selection pressure*) καθορίζει τον ρυθμό και την έκταση της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, καθώς μπορεί και προκαλεί μεταβολή του βακτηριακού πληθυσμού, μέσω της εξαφάνισης των ευαίσθητων βακτηρίων και της επιβίωσης των ανθεκτικών. Ο επιπολασμός της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά είναι αποτέλεσμα της περίπλοκης αλληλεπίδρασης ανάμεσα στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, τους μικροοργανισμούς, τον ξενιστή και το περιβάλλον [69]. Ως εκ τούτου, η επιδημιολογία της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά θα περιγραφεί με βάση: (1) τους παράγοντες που σχετίζονται με το αντιβιοτικό, (2) τους παράγοντες που σχετίζονται με τον μικροβιακό πληθυσμό, (3) τους παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή και (4) τους παράγοντες που σχετίζονται με το περιβάλλον.

1. Παράγοντες που σχετίζονται με το αντιβιοτικό. Ο πρώτος σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με τον αντιμικροβιακό παράγοντα είναι το *θεραπευτικό σχήμα*. Το θεραπευτικό σχήμα περιλαμβάνει τη δόση, το διάστημα μεταξύ των δόσεων, καθώς και τη διάρκεια της συνολικής θεραπείας. Όλα αυτά επηρεάζουν την εξελικτική πίεση που ασκείται σε έναν βακτηριακό πληθυσμό. Η δόση, ως παράγοντας κινδύνου, ερμηνεύεται ως η συνολική ποσότητα δραστικής ουσίας που χρησιμοποιείται για έναν βακτηριακό πληθυσμό κατά τη διάρκεια μιας συγκεκριμένης χρονικής περιόδου. Μελέτες έχουν δείξει ότι το επίπεδο ανθεκτικότητας σε έναν πληθυσμό σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αντιβιοτικού που χρησιμοποιείται [73].

*Η οδός χορήγησης, ο ρυθμός απορρόφησης, η δέσμευση με πρωτεΐνες, ο μεταβολισμός και η οδός απέκκρισης του αντιβιοτικού είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση και την έκταση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, ωστόσο τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρονται στη σχέση των παραγόντων αυτών με την αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα είναι αρκετά περιορισμένα [69]. Σε ό,τι αφορά την οδό χορήγησης, φαίνεται ότι τα αντιβιοτικά που χορηγούνται *per os* προκαλούν υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας σε σχέση με τη χορήγηση αντιβιοτικών μέσω της παρεντερικής οδού. Η παρεντερική χορήγηση ενός αντιβιοτικού θα ασκήσει εξελικτική πίεση στους βακτηριακούς πληθυσμούς που εντοπίζονται στο σημείο της λοίμωξης, ενώ η επίδραση του στη γαστρεντερική οδό θα εξαρτηθεί από την έκταση της απέκκρισης ενεργών μεταβολιτών του αντιβιοτικού μέσω του εντεροηπατικού κύκλου [69].*

Ένα αντιβιοτικό μπορεί να επηρεάσει τον βακτηριακό πληθυσμό, ανάλογα με το *φάσμα δράσης* του. Τα αντιμικροβιακά φάρμακα ευρέως φάσματος επηρεάζουν σημαντικά και την εντερική μικροχλωρίδα. Επειδή μια ισορροπημένη και υγιής εντερική μικροχλωρίδα εμποδίζει την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών, η χρήση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος θεωρείται παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ανθεκτικότητας [74].

2. Παράγοντες που σχετίζονται με τον μικροβιακό πληθυσμό. Δε διατηρούνται όλοι οι τύποι ανθεκτικότητας για ίδιες χρονικές περιόδους σε ένα δεδομένο περιβάλλον μετά την απομάκρυνση ενός συγκεκριμένου αντιμικροβιακού παράγοντα [69]. Επίσης, φαίνεται ότι τα διάφορα βακτηριακά είδη δεν είναι το ίδιο δεκτικά σε χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας και σε γονίδια ανθεκτικότητας [69]. Σε ό,τι αφορά το μέγεθος του βακτηριακού πληθυσμού, μεγάλοι πληθυσμοί ευαίσθητων μικροοργανισμών αποτελούν ασπίδα προστασίας απέναντι στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών [74]. Η σχέση ανάμεσα στην ανθεκτικότητα και τη μολυσματικότητα ενός μικροοργανισμού είναι ένα σημαντικό θέμα. Φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα σε ένα αντιβιοτικό συνδέεται άμεσα με τη μολυσματικότητα, καθώς γονίδια ανθεκτικότητας και γονίδια που κωδικοποιούν μολυσματικούς παράγοντες πολλές φορές εντοπίζονται πάνω στο ίδιο πλασμίδιο [75].

3. Παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή. Η ηλικία είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει τον επιπολασμό της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Νεαρότερα άτομα ή ζώα εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας σε σχέση με ενήλικα άτομα ή ζώα. Ο εντοπισμός των βακτηριακών στελεχών στον οργανισμό του ξενιστή σχετίζεται με την εμφάνιση ανθεκτικότητας. Για παράδειγμα, η εντερική οδός αποτελεί τη μεγαλύτερη ‘δεξαμενή’ γονιδίων ανθεκτικότητας. Αυτό έχει αποδοθεί στο γεγονός ότι η τεράστια εντερική μικροχλωρίδα αποτελεί ένα ιδανικό περιβάλλον για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Το έντονο στρες και η λοίμωξη σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση ανθεκτικότητας, ενώ οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς διατρέχουν σημαντικό κίνδυνο λοίμωξης από ανθεκτικά βακτήρια [69].

4. Παράγοντες που σχετίζονται με το περιβάλλον. Οι ακραίες θερμοκρασίες και οι κακές συνθήκες υγιεινής είναι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση ανθεκτικότητας [69].

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΡΟΦΙΜΑ

1.1 Εισαγωγή

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιούνται είτε ως προβιοτικά είτε ως αρχικές καλλιέργειες είτε αποτελούν μέρος της ενδογενούς μικροχλωρίδας που συμμετέχει στη ζύμωση αλλαντικών και γαλακτοκομικών προϊόντων μπορούν να αποτελέσουν ‘δεξαμενές’ γονιδίων ανθεκτικότητας, και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα μεταφοράς των γονιδίων αυτών σε ευκαιριακά παθογόνα ή παθογόνα βακτήρια. Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται συνεχώς το ερευνητικό ενδιαφέρον σε ό,τι αφορά τα τρόφιμα, ως μέσα μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας. Ωστόσο, είναι πολύ λίγες οι συστηματικές έρευνες που εξετάζουν την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώνονται από τρόφιμα. Τα περισσότερα ερευνητικά δεδομένα αναφέρονται στους εντερόκοκκους, ενώ ο αριθμός των εργασιών πάνω στους λακτοβάκιλλους και στους λακτόκοκκους είναι περιορισμένος [76]. Στον *πίνακα 5* της επόμενης σελίδας παρουσιάζεται μια σύνοψη των μελετών σχετικά με την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά διάφορων βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από τρόφιμα, νωπά και ζυμωμένα.

Πίνακας 5: Σύνοψη της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά βακτηρίων του γαλακτικού οξέος από διάφορα τρόφιμα. (Πηγή: S. Marthur et al., 2005).

ΤΡΟΦΙΜΑ	ΣΤΕΛΕΧΗ LAB	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
Νωπά κρέατα			
Κοτόπουλο	<i>L. reuteri</i> G4	Χλωραμφενικόλη	Lin et al. 1996
Νωπό χοιρινό	<i>L. reuteri</i> 100-63, <i>L. plantarum</i> caTC2R	Ερυθρομυκίνη Χλωραμφενικόλη	Tannock et al. 1994 Ahn et al. 1992
Νωπό χοιρινό και μοςχάρι	<i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i>	Τετρακυκλίνη (69%) Χλωραμφενικόλη (3%) Μεθικιλίνη (85%)	Vidal and Collins- Thompson, 1987
Ζυμωμένα τρόφιμα			
Τυρί κρέμας	<i>Lc. lactis strain K214</i>	Στρεπτομυκίνη, Τετρακυκλίνη, Χλωραμφενικόλη	Perreten et al. 1997b
Ελληνικό τυρί	<i>L. acidophilus</i>	Πενικιλίνη	Charteris et al. 1998
Γιαούρτι	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbruekii spp. bulgaricus</i>	Νεομυκίνη, Πολυμυξίνη B	Sozzi and Smiley, 1980
Ζυμωμένα ποτά και τρόφιμα από Νιγηρία	<i>L. pentosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. jensenii</i>	Τετρακυκλίνη (42,5%) Ερυθρομυκίνη (17,5%) Αμπικιλίνη (47,5%) Κλοξακιλλίνη (80%) Πενικιλίνη (77,5%)	Olukoya et al. 1993
Σαλάμια αέρος	<i>Lactobacillus species</i>	Τετρακυκλίνη Γενταμυκίνη (79%) Πενικιλίνη G (64%) Καναμυκίνη (79%)	Gevers et al. 2003
Τούρκικα γιαούρτια	<i>S. thermophilus</i>	Βανκομυκίνη (65%)	Aslim and Beyatli, 2004
Ευρωπαϊκά προβιοτικά προϊόντα	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. ramnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. delbreukii spp. bulgaricus</i>	Τετρακυκλίνη (26%) Πενικιλίνη G (23%) Ερυθρομυκίνη (16%) Χλωραμφενικόλη (11%)	Temmerman et al. 2002
Άλλα			
Αραβόσιτος	<i>L. plantarum</i> 5057	Τετρακυκλίνη (<i>tet M</i>)	Danielsen, 2002

1.2 Προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος – Εγγενής ανθεκτικότητα

Έχει αναφερθεί ότι τα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc* παρουσιάζουν μια εγγενή (φυσική) ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, ιδιότητα η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των βακτηρίων αυτών από άλλους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς [77]. Κάποιοι λακτοβάκιλλοι εμφανίζουν υψηλή εγγενή ανθεκτικότητα στη βακιτρακίνη, στη σιπροφλοξασίνη, στο φουσιδικό οξύ, στην καναμυκίνη, στη γενταμυκίνη, στη μετρονιδαζόλη, στη νιτροφουραντοΐνη, στη νορφλοξασίνη, στη στρεπτομυκίνη, στη σουλφαδιαζίνη, στην τριμεθοπρίμη και στη βανκομυκίνη [78]. Για αρκετούς λακτοβάκιλλους έχει βρεθεί υψηλή συχνότητα εμφάνισης αυτόματων μεταλλάξεων στη νιτροφουραζόνη, στην καναμυκίνη και στη στρεπτομυκίνη [79]. Για τους λακτοβάκιλλους δεν έχει αναφερθεί ποτέ στη βιβλιογραφία εγγενής ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και στην ερυθρομυκίνη, ωστόσο έχει βρεθεί επίκτητη ανθεκτικότητα των λακτοβάκιλλων στα αντιβιοτικά αυτά, όπως θα δούμε παρακάτω.

1.3 Μεταφερόμενα γενετικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος – Επίκτητη ανθεκτικότητα

Τα πλασμίδια είναι συνήθη γενετικά στοιχεία των εντερόκοκκων, των λακτόκοκκων, των *Leuconostoc* και των πεδιοκοκκών, ενώ συναντώνται και σε κάποια στελέχη λακτοβάκιλλων και μπιφιδοβακτηρίων. Οι λειτουργίες που εντοπίζονται πάνω στα γονίδια των πλασμιδίων περιλαμβάνουν την υδρόλυση πρωτεϊνών, τον μεταβολισμό υδατανθράκων, αμινοξέων και κιτρικού οξέος, την παραγωγή βακτηριοκινών, καθώς και την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, βαρέα μέταλλα και φάγους [80]. Τουλάχιστον 25 είδη λακτοβάκιλλων περιέχουν από 1 έως 6 διαφορετικά πλασμίδια (ανάλογα με το στέλεχος) [80]. R-πλασμίδια που κωδικοποιούν γονίδια ανθεκτικότητας για την τετρακυκλίνη (*tet genes*), την ερυθρομυκίνη (*erm genes*) και τη χλωραμφενικόλη (*cat genes*) έχουν αναφερθεί για τον *L. reuteri*, τον *L. fermentum*, τον *L. acidophilus* και τον *L. plantarum* (οι απομονώσεις των λακτοβάκιλλων αυτών έγιναν από νωπό κρέας και κόπρανα) [76].

1.4 Ανθεκτικότητα βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από σαλάμια αέρος

Το 2002, ο Gevers και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη {*tet* (M) genes} σε αρκετά είδη λακτοβάκιλλων που απομονώθηκαν από διαφορετικούς τύπους σαλαμιών αέρος του Βελγίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα γονίδια ανθεκτικότητας βρίσκονταν επάνω σε πλασμίδια μεγέθους από 7 έως 30 kb, και εμφάνιζαν πολύ υψηλή ομολογία βάσεων με τα γονίδια ανθεκτικότητας *tet* (M) που έχουν αναφερθεί στο παρελθόν για παθογόνα είδη, όπως ο *Staphylococcus aureus* και ο *Neisseria meningitides* [81].

Οι ίδιοι ερευνητές, έναν χρόνο αργότερα, εξέτασαν την ικανότητα 14 στελεχών λακτοβάκιλλων, που είχαν απομονωθεί από σαλάμια αέρος, να μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη σε άλλους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς μέσω βακτηριακής σύζευξης. Εφτά από τα 14 ανθεκτικά στελέχη λακτοβάκιλλων ήταν ικανά να μεταφέρουν την ανθεκτικότητά τους σε στελέχη του *E. faecalis* με αρκετά υψηλή συχνότητα. Δύο από τα 14 στελέχη των λακτοβάκιλλων μπορούσαν επίσης να μεταφέρουν την ανθεκτικότητά τους σε στελέχη του *Lc. lactis* subsp. *lactis*, ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταφορά γονιδίων μέσω βακτηριακής σύζευξης στον *S. aureus* [82].

Το 2006, ο Aymerich και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν με μοριακές μεθόδους τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος από 21 παραδοσιακά ζυμωμένα αλλαντικά της Ισπανίας (chorizo, fuet και salchichon). Ο *Lb. sakei* ήταν το κυρίαρχο στέλεχος (74%). Ακολουθούσε ο *Lb. curvatus* (21,2%) και ο *Leuconostoc mesenteroides* (4,8%). Παράλληλα, εξέτασαν την ανθεκτικότητα των στελεχών αυτών σε διάφορα αντιβιοτικά (συνολικά απομονώθηκαν 250 στελέχη). Το 100% των στελεχών που απομονώθηκαν ήταν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη, το 98,4% στη γενταμυκίνη, το 43,6% στην αμπικιλίνη, το 29,2% στην πενικιλίνη G, το 12% στην τετρακυκλίνη, ενώ μόλις το 1,2% των στελεχών παρουσίαζε ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη. Κανένα από τα στελέχη δεν εμφάνιζε ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη [32].

Τα παραπάνω ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος που απομονώνονται από σαλάμια αέρος και άλλα ζυμωμένα αλλαντικά μπορούν να αποτελέσουν ‘δεξαμενές’ γονιδίων ανθεκτικότητας. Τα γονίδια αυτά μπορούν εύκολα να μεταφερθούν και σε άλλα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, αλλά και σε παθογόνα βακτήρια.

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΡΟΦΙΜΑ

1.1 Μηχανισμοί επίκτητης ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων

Στους σταφυλόκοκκους, τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα διάφορα αντιβιοτικά εντοπίζονται κυρίως πάνω σε πλασμίδια. Αυτό σημαίνει ότι τα γονίδια αυτά μπορούν να μεταφερθούν εύκολα ανάμεσα στα διαφορετικά είδη σταφυλόκοκκων. Για τον λόγο αυτό, οι σταφυλόκοκκοι θεωρούνται ‘δεξαμενές’ γονιδίων ανθεκτικότητας, τα οποία μπορούν να μεταφερθούν στον *S. aureus* και σε άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς [44]. Στο τμήμα που ακολουθεί θα παρουσιάσουμε τους διαφορετικούς μηχανισμούς επίκτητης ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων για την κάθε κατηγορία αντιβιοτικών.

A. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ:

Οι β-λακτάμες αποτελούν την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία αντιβιοτικών. Η μεθικιλίνη χρησιμοποιήθηκε αρχικά στις αρχές της δεκαετίας του 1960 για την αντιμετώπιση των ενδονοσοκομειακών στελεχών του *S. aureus*, που παρήγαγαν β-λακταμάση. Σύντομα, όμως, αναπτύχθηκε ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη. Σήμερα, η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στη μεθικιλίνη (*S. aureus* & coagulase-negative staphylococci, CoNS) αποτελεί σύνθετο φαινόμενο στην κλινική πράξη [83]. Στη Μεγάλη Βρετανία, πάνω από το 70% των σταφυλόκοκκων που απομονώνονται από βακτηραιμίες είναι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη [84].

Φυσιολογικά, οι β-λακτάμες δρουν μέσω πρόσδεσής τους σε ειδικές πρωτεΐνες-υποδοχείς των βακτηριακών κυττάρων, οι οποίες είναι γνωστές ως πρωτεΐνες πρόσδεσης της πενικιλίνης (Penicillin Binding Proteins, PBPs). Η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στη μεθικιλίνη και στις υπόλοιπες β-λακτάμες προκύπτει από την απόκτηση νέου γενετικού υλικού, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την κωδικοποίηση μιας τροποποιημένης πρωτεΐνης πρόσδεσης της πενικιλίνης, η οποία παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια για τη μεθικιλίνη και τις υπόλοιπες β-λακτάμες. Η νέα αυτή τροποποιημένη πρωτεΐνη είναι γνωστή ως PBP2' ή PBP2a και κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA*. Η προέλευση του γονιδίου *mecA* παραμένει αμφίβολη, ωστόσο ένα ομόλογο γονίδιο έχει εντοπιστεί στον *S. sciuri* [85].

B. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ (Βανκομυκίνη-Τείχοπλανίνη):

Οι περισσότεροι σταφυλόκοκκοι είναι ευαίσθητοι στη βανκομυκίνη (*S. aureus* & coagulase-negative staphylococci, CoNS). Ο επιπολασμός της ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη των CoNS στην Ευρώπη είναι χαμηλότερος από 0,5%. Ο *S. aureus* και κάποια στελέχη των CoNS, ειδικά ο *S. epidermidis* και ο *S. haemolyticus*, συχνά παρουσιάζουν σημαντική ανθεκτικότητα στην τείχοπλανίνη, ωστόσο παραμένουν ευαίσθητοι στη βανκομυκίνη. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην τείχοπλανίνη δεν έχουν καθοριστεί γενετικά, φαίνεται, όμως, ότι η πάχυνση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και η υπερπαραγωγή D-αλανυλ-D-αλανίνης σχετίζονται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας [85].

Γ. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ:

Η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στις αμινογλυκοσίδες διαμεσολαβείται από βακτηριακά ένζυμα που τροποποιούν τη δομή των αντιβιοτικών αυτών (Aminoglycoside Modifying Enzymes, AMEs). Τα ένζυμα αυτά ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με τη βιοχημική δράση που ασκούν στις αμινογλυκοσίδες: ακετυλοτρανσφεράσες, φωσφοτρανσφεράσες και νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσες. Στους σταφυλόκοκκους έχουν αναφερθεί πολλά διαφορετικά τροποποιητικά ένζυμα, τα οποία κωδικοποιούνται από διάφορα γονίδια (*aph* genes, *aac* genes, *ant* genes) [85].

Δ. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ:

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στις μακρολίδες. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει τις μεθυλάσες του βακτηριακού 23S rRNA, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *erm*. Τα ένζυμα αυτά μεθυλιώνουν το νουκλεοτίδιο A2058, το οποίο είναι απαραίτητο για τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο βακτηριακό 23S rRNA και τις μακρολίδες. Το νουκλεοτίδιο A2058 στη μεθυλιωμένη του μορφή είναι ανενεργό, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επίδραση των μακρολιδών πάνω στο βακτηριακό 23S rRNA. Με τον τρόπο αυτό, οι σταφυλόκοκκοι που αποκτούν το γονίδιο *erm* γίνονται ανθεκτικοί στις μακρολίδες [85]. Ένας άλλος συνήθης μηχανισμός ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων στις μακρολίδες περιλαμβάνει κάποιες πρωτεϊνικές αντλίες (efflux pumps), οι οποίες συντελούν στην αυξημένη απομάκρυνση του αντιβιοτικού από το βακτηριακό κύτταρο. Οι αντλίες αυτές κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mef*, τα οποία εντοπίζονται κυρίως πάνω σε πλασμίδια [85]. Τέλος, οι μακρολίδες μπορούν να αδρανοποιηθούν από τους σταφυλόκοκκους που παράγουν το ένζυμο φωσφοτρανσφεράση. Το ένζυμο αυτό παράγεται από το γονίδιο *mph*, το οποίο εντοπίζεται κυρίως πάνω σε πλασμίδια [85].

E. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ:

Οι φθοριοκινολόνες στοχεύουν στην DNA γυράση (τοποϊσομεράση II) και στην τοποϊσομεράση IV, ένζυμα που είναι απαραίτητα για την αντιγραφή και μεταγραφή του βακτηριακού DNA. Η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στις φθοριοκινολόνες προκύπτει είτε από τροποποίηση των ενζύμων της DNA γυράσης και τοποϊσομεράσης IV λόγω μετάλλαξης, είτε από αυξημένη απομάκρυνση του αντιβιοτικού μέσω πρωτεϊνικών αντλιών. Η ανθεκτικότητα που σχετίζεται με την τροποποίηση της DNA γυράσης και τοποϊσομεράσης IV λόγω μετάλλαξης είναι μια σταδιακή και συσσωρευτική διαδικασία. Αυτό σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μεταλλάξεων, τόσο μεγαλύτερο γίνεται και το επίπεδο της ανθεκτικότητας. Τόσο η DNA γυράση όσο και η τοποϊσομεράση IV αποτελούνται από υπομονάδες. Αυτές κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gyrA* και *gyrB* (για την DNA γυράση), και από τα *parC* και *parE* (για την τοποϊσομεράση IV). Χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας προκύπτουν από μεταλλάξεις είτε στο γονίδιο *gyrA* είτε στο γονίδιο *parC*, ενώ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας εμφανίζονται από μεταλλάξεις και στα δύο αυτά γονίδια [85]. Σε ό,τι αφορά την ανθεκτικότητα στις φθοριοκινολόνες λόγω αυξημένης απομάκρυνσης του αντιβιοτικού μέσω πρωτεϊνικών αντλιών, στον *S.aureus* οι αντλίες αυτές κωδικοποιούνται από τα γονίδια *norA* [85].

ΣΤ. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΧΛΩΡΑΜΦΕΝΙΚΟΛΗ:

Η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στη χλωραμφενικόλη προκαλείται λόγω της αδρανοποίησης του αντιβιοτικού από βακτηριακά ένζυμα που ονομάζονται ακετυλοτρανσφεράσες. Τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται από τα γονίδια *cat*, τα οποία εντοπίζονται είτε σε πλασμίδια είτε σε βακτηριακά χρωμοσώματα [85].

Z. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ:

Στους σταφυλόκοκκους (αλλά και στους εντερόκοκκους και στρεπτόκοκκους), η ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο χρωμοσωμικό γονίδιο *rpoB*, το οποίο κωδικοποιεί τη β-υπομονάδα της βακτηριακής RNA-πολυμεράσης [85].

Η. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ:

Στους σταφυλόκοκκους η ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες προκαλείται μέσω δύο βασικών μηχανισμών: πρωτεϊνικές αντλίες απομάκρυνσης του αντιβιοτικού και συστήματα προστασίας των βακτηριακών ριβοσωμάτων. Οι πρωτεϊνικές αντλίες (κωδικοποιούνται από τα γονίδια *tetK* και *tetL*) προσδίδουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και στη δοξυκυκλίνη, αλλά όχι στη μινοκυκλίνη, ενώ τα συστήματα προστασίας των βακτηριακών ριβοσωμάτων (κωδικοποιούνται από τα γονίδια *tetM* και *tetO*) προσδίδουν ανθεκτικότητα και στη μινοκυκλίνη [85].

Θ. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ:

Η τριμεθοπρίμη ανήκει στους αναστολείς της αναγωγής του βακτηριακού φυλλικού οξέος. Η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στο αντιβιοτικό αυτό είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο χρωμοσωμικό γονίδιο *dfr*, από το οποίο παράγεται η αναγωγή του διυδροφυλλικού οξέος, η οποία μετατρέπει το φυλλικό οξύ στη δραστική του μορφή [85].

1.2 Παρουσία ανθεκτικών σταφυλόκοκκων σε σαλάμια αέρος

Το 2000, ο Mauriello G και οι συνεργάτες του, αφού ταυτοποίησαν τους σταφυλόκοκκους που απομονώθηκαν από διάφορα σαλάμια αέρος της Ιταλίας, στη συνέχεια μελέτησαν 42 στελέχη των σταφυλόκοκκων αυτών ως προς την ανθεκτικότητά τους σε διάφορα αντιβιοτικά. Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στη μεθικυλίνη, κεφαλοθίνη, αμικασίνη, βανκομυκίνη, χλωραμφενικόλη, ριφαμπικίνη και μινοκυκλίνη. Πάνω από το 64% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη G, αμοξικιλίνη και λινκομυκίνη. Χαμηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για την τετρακυκλίνη (21.4%), κλαριθρομυκίνη (19.1%), καρβενικιλίνη (16.7%), καναμυκίνη (11.9%), νεομυκίνη (9.5%), στρεπτομυκίνη (9.5%), τεϊχοπλανίνη (7.1%), οξακυλίνη (4.8%) και γενταμυκίνη (2.4%). Το 50% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη, το 38.1% στην κλινδαμυκίνη και το 30.9% στη μεζλοκυλίνη. Όλα τα στελέχη ήταν πολυανθεκτικά εμφανίζοντας

τουλάχιστον 3 ανθεκτικότητες. Συγκεκριμένα, ένα στέλεχος του *S. simulans* εμφάνιζε 12 ανθεκτικότητες [44].

Το 2005, ο Martin B και οι συνεργάτες του απομόνωσαν 240 στελέχη σταφυλόκοκκων από σαλάμια αέρος της Ισπανίας και προχώρησαν στην ταυτοποίησή τους. Κατόπιν, εξέτασαν την ανθεκτικότητα των στελεχών αυτών απέναντι σε διάφορα αντιβιοτικά. Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στη βανκομυκίνη και ιμιπενέμη. Το 80% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη G, το 73.8% στην αμπικιλίνη, το 70% στις σουλφοναμίδες, το 40.8% στην ερυθρομυκίνη και το 33.8% στην τετρακυκλίνη. Χαμηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για την κλινδαμυκίνη (15%), μεθικιλίνη (4.6%), νιτροφουραντοϊνη (4.6%), ριφαμπικίνη (3.8%), χλωραμφενικόλη (3.3%), αμοξικιλίνη (2.5%), γενταμυκίνη (2.5%) και σιπροφλοξασίνη (1.3%). Η ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση του γονιδίου *mecA* με τη μέθοδο PCR. Το 75.8% των στελεχών ήταν ανθεκτικά σε 2 έως 5 αντιβιοτικά, ενώ το 10.8% των στελεχών εμφάνιζε ανθεκτικότητα σε περισσότερα από 5 αντιβιοτικά. Μεταξύ αυτών, τα στελέχη που έφεραν το γονίδιο *mecA* ήταν ανθεκτικά απέναντι σε 8 έως 11 αντιβιοτικά [50].

Από τις παραπάνω έρευνες γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι τα σαλάμια αέρος μπορούν να αποτελέσουν ένα ιδανικό περιβάλλον για τη μεταφορά πλασμιδίων και μεταθετών στοιχείων που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας, μεταξύ των διαφόρων ειδών σταφυλόκοκκων. Η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στη βανκομυκίνη είναι ιδιαίτερα ανησυχητική, καθώς το γλυκοπεπτίδιο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων από ανθεκτικούς σταφυλόκοκκους στη μεθικιλίνη [85]. Στις δύο παραπάνω έρευνες είδαμε ότι δεν απομονώθηκαν σταφυλόκοκκοι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη από τα σαλάμια αέρος, και γενικότερα η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στη βανκομυκίνη παραμένει σε χαμηλά επίπεδα παγκοσμίως. Ωστόσο, ο Gardini και οι συνεργάτες του, το 2003, απομόνωσαν από Ιταλικά σαλάμια αέρος σταφυλόκοκκους ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη, αλλά και στη βανκομυκίνη [86].

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΡΟΦΙΜΑ

1.1 Οι εντερόκοκκοι ως ευκαιριακά παθογόνα του ανθρώπου

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι εντερόκοκκοι έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία ως ενδονοσοκομειακά παθογόνα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Οι εντερόκοκκοι δε διαθέτουν τους συνήθεις μολυσματικούς παράγοντες που συναντάμε σε άλλα βακτήρια, αλλά εμφανίζουν μια σειρά από άλλα χαρακτηριστικά (π.χ. την ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά, η οποία συνεισφέρει στη μολυσματικότητά τους) [9]. Στο νοσοκομειακό περιβάλλον, οι εντερόκοκκοι προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις, όπως ενδοκαρδίτιδα, βακτηριαιμία, καθώς και λοιμώξεις του ουροποιητικού, του κεντρικού νευρικού συστήματος, της ενδοκοιλιακής χώρας και της πύελου [53]. Ο επιπολασμός των εντεροκοκκικών λοιμώξεων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, και στις Ηνωμένες Πολιτείες οι εντερόκοκκοι ευθύνονται για το 10% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων [9]. Επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι ο *E. faecalis* αποτελεί το κυρίαρχο είδος μεταξύ των εντερόκοκκων που απομονώνονται από λοιμώξεις του ανθρώπου, ενώ ο *E. faecium* σχετίζεται με την πλειοψηφία των υπόλοιπων εντεροκοκκικών λοιμώξεων, και φαίνεται ότι αποτελεί μεγαλύτερη απειλή σε ό,τι αφορά την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά [9].

Η βακτηριαιμία είναι η πιο συνήθης μορφή εντεροκοκκικής λοίμωξης. Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εμφάνιση εντεροκοκκικής βακτηριαιμίας περιλαμβάνουν: υποκείμενη ασθένεια, παρουσία ουρο- ή φλεβοκαθετήρων, χειρουργική επέμβαση, εγκαύματα, πολλαπλά τραύματα ή προηγούμενη θεραπεία με αντιβιοτικά. Οι εντερόκοκκοι που προκαλούν βακτηριαιμίες συνήθως προέρχονται από την ουροποιητική οδό, αλλά και από τη γαστρεντερική. Η θνησιμότητα από εντεροκοκκική λοίμωξη είναι συνήθως υψηλή, κυρίως λόγω της εμφάνισης επιπλοκών [53].

Οι εντερόκοκκοι ευθύνονται για το 5-15% των περιπτώσεων ενδοκαρδίτιδας, με τον *E. faecalis* να αποτελεί το κυρίαρχο είδος. Οι εντερόκοκκοι που προκαλούν ενδοκαρδίτιδες προέρχονται συνήθως από την ουροποιητική οδό.

1.2 Παρουσία μολυσματικών παραγόντων και μηχανισμοί ανταλλαγής γενετικού υλικού

Τα μολυσματικά χαρακτηριστικά των εντερόκοκκων περιλαμβάνουν προσκόλληση στους ιστούς του ξενιστή και δημιουργία αποστήματος, ανθεκτικότητα στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή, καθώς και τροποποίησή τους, και έκκριση αιμολυσινών-κυτολυσινών και άλλων τοξικών προϊόντων [88]. Αρκετά από τα γονίδια που κωδικοποιούν μολυσματικούς παράγοντες (ιδιαίτερα στον *E. faecalis*) έχουν αναλυθεί και έχουν χαρακτηριστεί, και οι επιδράσεις τους έχουν μελετηθεί σε έρευνες. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα από μοριακές αναλύσεις της μολυσματικότητας των εντερόκοκκων έδειξαν ότι κλινικά στελέχη του *E. faecalis* είχαν περισσότερα χαρακτηριστικά μολυσματικότητας σε σχέση με στελέχη που απομονώνονται από τρόφιμα, τα οποία, με τη σειρά τους, ήταν περισσότερα μολυσματικά σε σχέση με στελέχη που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης [89].

Πολλά από τα χαρακτηριστικά μολυσματικότητας των εντερόκοκκων, όπως η παραγωγή αιμολυσινών-κυτολυσινών, η ικανότητα προσκόλλησης και η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (βλ. παρακάτω), είναι μεταβιβάσιμα από βακτήριο σε βακτήριο, μέσω των μεταφερόμενων γενετικών χαρακτηριστικών (πλασμίδια, μεταθετά στοιχεία) [9].

1.3 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Οι εντερόκοκκοι έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία στο νοσοκομειακό περιβάλλον εξαιτίας της αυξανόμενης ανθεκτικότητάς τους στα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι τόσο εγγενής όσο και επίκτητη. Παραδείγματα εγγενούς ανθεκτικότητας αποτελούν οι κεφαλοσπορίνες, οι β-λακτάμες, οι σουλφοναμίδες και τα χαμηλά επίπεδα κλινδαμυκίνης και αμινογλυκοσιδών. Η εγγενής ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων σε πολλά αντιβιοτικά καθιστά εξαιρετικά δύσκολη τη θεραπεία της λοίμωξης [9,53]. Η επίκτητη ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων συνίσταται στην απόκτηση πλασμιδίων και μεταθετών στοιχείων από βακτήρια ‘δωρητές’. Οι εντερόκοκκοι εμφανίζουν επίκτητη ανθεκτικότητα στη χλωραμφενικόλη, στην ερυθρομυκίνη, σε υψηλά επίπεδα κλινδαμυκίνης και αμινογλυκοσιδών, στην τετρακυκλίνη, στις β-λακτάμες, στις φθοριοκινολόνες και στα γλυκοπεπτίδια.

Σε ό,τι αφορά την ανθεκτικότητα στα γλυκοπεπτίδια, η εμφάνιση εντερόκοκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη είναι ιδιαίτερα ανησυχητική, καθώς το αντιβιοτικό αυτό αποτελεί τη μοναδική λύση για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από πολλαπλά ανθεκτικούς εντερόκοκκους [54]. Η ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1987, οπότε και απομονώθηκαν εντερόκοκκοι που έφεραν το γονίδιο *VanA*. Από τότε, έχουν ανιχνευτεί 6 διαφορετικά γονίδια ανθεκτικότητας στους εντερόκοκκους: πέντε από αυτά μεταφέρονται μέσω πλασμιδίων (*VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanE* και *VanG*), ενώ το έκτο είναι εγγενές (*VanC*) και έχει εντοπιστεί στον *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* και *E. flavescens* [85]. Το γονίδιο *VanA* προσδίδει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας τόσο στη βανκομυκίνη όσο και στην τείχοπλανίνη (διασταυρούμενη ανθεκτικότητα), ενώ οι εντερόκοκκοι που φέρουν το γονίδιο *VanB* εμφανίζουν διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας μόνο στη βανκομυκίνη. Το εγγενές γονίδιο *VanC* προσδίδει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη. Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται επειδή τα γονίδια *Van* κωδικοποιούν τροποποιημένες πρωτεΐνες πρόσδεσης, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα πρόσδεσης των γλυκοπεπτιδίων στις πρωτεΐνες αυτές [53].

1.4 Παρουσία ανθεκτικών εντερόκοκκων σε σαλάμια αέρος

Εντερόκοκκοι ανθεκτικοί σε αντιβιοτικά, και ειδικότερα εντερόκοκκοι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη, έχουν απομονωθεί από ζώα της κτηνοτροφίας, νωπό κρέας, επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος, γαλακτοκομικά προϊόντα (νωπό και ζυμωμένο γάλα-διάφορα είδη τυριών) και ζυμωμένα αλλαντικά (κυρίως σαλάμια αέρος). Επίσης, γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά έχουν απομονωθεί από στελέχη εντερόκοκκων που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά ή ως καλλιέργειες εκκίνησης [9,52]. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι οι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά εντερόκοκκοι είναι ιδιαίτερα διαδεδομένοι στην τροφική αλυσίδα, και η ανθεκτικότητα αυτή μπορεί να μεταδοθεί μέσω πλασμιδίων σε παθογόνα στελέχη, όπως ο *S. aureus* και η *L. monocytogenes*, αλλά και σε άλλα μη παθογόνα βακτήρια που συνδέονται άμεσα με τα τρόφιμα, όπως ο *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* και ο *Leuconostoc mesenteroides* [53].

Σε ό,τι αφορά τις έρευνες που μελέτησαν την ανθεκτικότητα εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από σαλάμια αέρος, τα αποτελέσματά τους είναι μάλλον ανησυχητικά. Το 2003 ο Peters J και οι συνεργάτες του εξέτασαν την ανθεκτικότητα 118 στελεχών εντερόκοκκων (*E. faecalis* και *E. faecium*) που απομόνωσαν από 27 σαλάμια αέρος. Όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν ήταν ευαίσθητα στην αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη, ενώ εντοπίστηκαν στελέχη ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη (38%), στην πενικιλίνη (3%), στην ερυθρομυκίνη (9%) και στη χλωραμφενικόλη (7%) [60].

Το 2005, ο Martin B και οι συνεργάτες του μελέτησαν 106 στελέχη εντερόκοκκων, που απομονώθηκαν από 12 ισπανικά αλλαντικά αέρος, ως προς την ανθεκτικότητά τους απέναντι σε 12 αντιβιοτικά. Το 80.2% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στη ριφαμικίνη, το 52.8% στη σιπροφλοξασίνη, το 50.9% στην ερυθρομυκίνη, το 50.9% στη νιτροφουραντοΐνη, το 47.2% στην τετρακυκλίνη, το 42.5% στην πενικιλίνη G, το 32.1% στη λινεζολίδη, το 27.4% στην αμπικιλίνη, το 27.4% στη βανκομυκίνη, το 26.4% στη χλωραμφενικόλη και το 10.4% στην τεϊκοπλανίνη. Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στη γενταμυκίνη. Να επισημάνουμε ότι ο *E. faecalis* εμφάνισε τα

υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη εντερόκοκκων που απομονώθηκαν [61].

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μικροχλωρίδας σαλαμιών αέρος της ελληνικής αγοράς (φυσικής ωρίμανσης και με χρήση καλλιεργειών εκκίνησης), με έμφαση στην απομόνωση και ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, των εντερόκοκκων και των σταφυλόκοκκων, μικροοργανισμοί οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ζύμωση και ωρίμανση των προϊόντων αυτών. Παράλληλα, θελήσαμε να ελέγξουμε την ευαισθησία των στελεχών που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν απέναντι σε επιλεγμένα αντιβιοτικά, καθώς, σύμφωνα με την άποψη πολλών ερευνητών, τα σαλάμια αέρος μπορούν να αποτελέσουν ένα κατάλληλο περιβάλλον για τη μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ των διαφόρων ειδών βακτηρίων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ – ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η προμήθεια των σαλαμιών αέρος έγινε από σούπερ-μάρκετ και καταστήματα ντελικάτέσεν της Πάτρας και των Αθηνών. Η δειγματοληψία έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε τα σαλάμια να είναι όσο το δυνατόν πιο φρέσκα, σύμφωνα με την ημερομηνία παρασκευής που αναγραφόταν πάνω στο προϊόν. Επίσης, επιλέχθηκαν ως επί το πλείστον σαλάμια αέρος τα οποία διατηρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου και όχι εντός ψυγείου, καθώς η ψύξη προκαλεί σταδιακή μείωση των μικροβιακών πληθυσμών, γεγονός το οποίο δε θα εξυπηρετούσε τους σκοπούς της μελέτης.

Η πειραματική διαδικασία διήρκησε 13 μήνες και μελετήθηκαν συνολικά 10 σαλάμια αέρος: τα 5 από αυτά ήταν σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης, χωρίς προσθήκη αρχικών καλλιεργειών, ενώ τα υπόλοιπα 5 ήταν σαλάμια αέρος με χρήση αρχικών καλλιεργειών, παραγόμενα από μεγάλες βιομηχανίες αλλαντικών. Αναλυτικά, τα σαλάμια αέρος που απασχόλησαν τη μελέτη ήταν τα εξής:

A. ΣΑΛΑΜΙΑ ΑΕΡΟΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

1. Σαλάμι αέρος Λευκάδος Ιώβ Μαλακάσης
2. Σαλάμι αέρος Λευκάδος Πολυχρονόπουλου
3. Σαλάμι αέρος Λευκάδος Ντελημάρη
4. Σαλάμι αέρος Ευρυτανίας Στρεμμένου
5. Παραδοσιακό σαλάμι αέρος Δαγρέ Τριπόλεως

B. ΣΑΛΑΜΙΑ ΑΕΡΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΡΧΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

6. Σαλάμι αέρος Θράκη τύπου Λευκάδος
7. Σαλάμι αέρος Ιφαντής τύπου Λευκάδος
8. Σαλάμι αέρος Νίκας τύπου Λευκάδος
9. Σαλάμι αέρος Βίκη τύπου Λευκάδος
10. Σαλάμι αέρος Κρέτα Φαρμ παραδοσιακό

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΑΛΑΜΙΩΝ

Για τη μικροβιακή ανάλυση το περίβλημα του κάθε σαλαμιού αφαιρέθηκε ασηπτικά. Είκοσι πέντε γραμμάρια από το κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher και στη συνέχεια προστέθηκαν 225 ml αποστειρωμένου 0.1% (w/v) saline/peptone νερού (0.1% peptone και 0.85% NaCl). Το περιεχόμενο της σακούλας ομογενοποιήθηκε σε συσκευή stomacher (Laboratory Blender Stomacher 400, Seward Medical, London, UK) για 2 λεπτά σε χαμηλή ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ομογενοποίηση στο stomacher, το διάλυμα που προέκυψε, αποτέλεσε την αραιώση 10^{-1} , οπότε περίπου 10 ml του διαλύματος αυτού μεταφέρθηκαν με πιπέτα των 5 ml σε άδειο αποστειρωμένο δοχείο Universal για τους περαιτέρω χειρισμούς. Για τις υπόλοιπες αραιώσεις είχαν προετοιμαστεί δοχεία Universal με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer's (9 ml διαλύματος Ringer's ανά δοχείο).

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής θρεπτικά υλικά για τη μικροβιακή ανάλυση και απομόνωση: peptone agar για την ολική αερόβια μικροχλωρίδα (8 g/lt βακτηριολογική πεπτόνη και 15 g/l άγαρ) και επώαση στους 30 °C για 72 ώρες, MRS άγαρ (Oxoid) για τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος και επώαση σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 72 ώρες, mannitol salt agar (MSA, LAB M) για τους Gram-θετικούς, καταλάση θετικούς κόκκους (κυρίως σταφυλόκοκκους-μικρόκοκκους) και επώαση στους 30 °C για 72 ώρες, chromocult για τα εντεροβακτήρια-*E. coli* (Merck) και επώαση στους 37 °C για 24 ώρες, Slanetz-Bartley (Merck) για τους εντερόκοκκους και επώαση στους 37 °C για 48 ώρες, Baird-Parker (BP, LAB M) για τον *S. aureus* και άλλους σταφυλόκοκκους και επώαση στους 37 °C για 48 ώρες, CASO άγαρ (Merck) για τα αερόβια σπορογόνα βακτήρια (κυρίως *Bacillus*) και επώαση στους 30 °C για 72 ώρες, OGY άγαρ (LAB M) για τις ζύμες και επώαση στους 25 °C για 5 ημέρες, Pseudomonas Agar Base (LAB M) για τις ψευδομονάδες και επώαση στους 25 °C για 48 ώρες, και Perfringens Agar Base (LAB M) για τα κλοστρίδια και επώαση σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 ώρες.

Επιστρέφοντας στο πειραματικό μέρος, οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε αναερόβιες συνθήκες ως εξής: από το δοχείο Universal της αραιώσης 10^{-1} που περιείχε το ομογενοποιημένο δείγμα του σαλαμιού, μεταφέρθηκε με πιπέτα ποσότητα 1 ml στο δοχείο της αραιώσης 10^{-2} , και από το δοχείο της αραιώσης 10^{-2} μεταφέρθηκε με πιπέτα ποσότητα 1 ml στο δοχείο της αραιώσης 10^{-3} κ.ο.κ. Για το κάθε θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν 2 ή 3 διαφορετικές αραιώσεις, ενώ σε κάθε αραιώση χρησιμοποιήθηκαν 3 τρυβλία. Αναλυτικά χρησιμοποιήθηκαν οι εξής αραιώσεις για κάθε υλικό:

1. Peptone agar $\rightarrow 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$
2. MRS άγαρ $\rightarrow 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$
3. Mannitol Salt agar $\rightarrow 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$
4. Baird-Parker $\rightarrow 10^{-1}, 10^{-2}$
5. Chromocult $\rightarrow 10^{-1}, 10^{-2}$
6. Slanetz-Bartley $\rightarrow 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$
7. CASO άγαρ $\rightarrow 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$
8. OGY άγαρ $\rightarrow 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$
9. Pseudomonas Agar Base $\rightarrow 10^{-1}, 10^{-2}$
10. Perfringens Agar Base $\rightarrow 10^{-1}, 10^{-2}$

Μετά την ολοκλήρωση των αραιώσεων, και παραμένοντας σε αναερόβιες συνθήκες, πραγματοποιήθηκε αρχικά η επίστρωση των τρυβλίων με το θρεπτικό υλικό για τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (MRS) και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε η επίστρωση των τρυβλίων για τα κλοστρίδια. Η μέθοδος της επίστρωσης έχει ως εξής: με την πιπέτα των 100 μl μεταφέρουμε από την κάθε αραιώση 100 μl σε κάθε ένα από τα 3 τρυβλία που αντιστοιχούν στην αραιώση αυτή. Εν συνεχεία, με την ειδικά τροποποιημένη γυάλινη ράβδο απλώνουμε το εμβόλιο σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, περιστρέφοντάς το διαρκώς, μέχρι να απορροφηθεί από το θρεπτικό υλικό ολόκληρη η ποσότητα του εμβολίου που μεταφέραμε στο τρυβλίο. Αρχικά πραγματοποιούνται οι επιστρώσεις από τις μεγαλύτερες αραιώσεις και στη συνέχεια προχωρούμε στις μικρότερες αραιώσεις.

Η επίστρωση των υπόλοιπων θρεπτικών υλικών πραγματοποιήθηκε σε αερόβιες συνθήκες στο θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow) με την ίδια περίπου διαδικασία που ακολουθήθηκε και στις αναερόβιες συνθήκες και με ασηπτική τεχνική.

Στην περίπτωση του CASO άγαρ, η επίστρωσή του γινόταν πάντα τελευταία, αφού είχαν ολοκληρωθεί όλες οι υπόλοιπες. Αυτό συνέβαινε διότι ήταν αναγκαία η θέρμανση του εμβολίου προκειμένου να σκοτωθούν-αδρανοποιηθούν οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί και να παραμείνουν μόνο τα αερόβια σπορογόνα βακτήρια, τα οποία και θα αναπτύσσονταν στο συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό. Η θέρμανση γινόταν σε υδατόλουτρο σε σταθερή θερμοκρασία 80 °C για 10 λεπτά.

Μετά την πραγματοποίηση όλων των επιστρώσεων τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους θαλάμους επώασης, προσέχοντας πάντα τη θερμοκρασία που αντιστοιχούσε στο κάθε θρεπτικό υλικό.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛ. ΟΞΕΟΣ

Σε πρώτη φάση αναγνωρίστηκαν οι διαφορετικοί τύποι αποικιών που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υλικό MRS μετά από μακροσκοπική εξέταση και παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών στο στερεοσκόπιο, οπότε και προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων αποικιών (χρώμα, σχήμα, ύψος, υφή και άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά). Για κάθε διαφορετικό τύπο αποικίας πραγματοποιήθηκε χρώση Gram και παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στο μικροσκόπιο, ενώ παράλληλα έγινε και το τεστ της καταλάσης με χρήση διαλύματος 3% H₂O₂. Τα Gram-θετικά και καταλάση αρνητικά στελέχη απομονώθηκαν σε MRS άγαρ με βακτηριολογικό κρίκο με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς (streaking). Συνολικά απομονώνονταν 5 στελέχη για κάθε διαφορετικό τύπο αποικίας (το ίδιο ισχύει τόσο για τους σταφυλόκοκκους όσο και για τους εντερόκοκκους, ενώ μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις απομονώθηκαν 2 ή 3 στελέχη για κάθε διαφορετικό τύπο αποικίας).

Τα στελέχη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν, επωάστηκαν σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 72 ώρες, οπότε και επιβεβαιώθηκε η καθαρότητα των καλλιιεργειών με χρώση Gram και μικροσκοπική παρατήρηση.

Ακολούθησε έλεγχος των οξυγαλακτικών στελεχών για τον τύπο της ζυμωτικής οδού που ακολουθούν (ομοζυμωτικά – ετεροζυμωτικά). Από κάθε τύπο αποικίας (στελέχος) επιλέγονταν 2-3 μεμονωμένες αποικίες με χρήση του βακτηριολογικού κρίκου, και μεταφέρονταν σε υγρές καλλιέργειες με MRS broth (LAB M) και στη συνέχεια ακολουθούσε επώση στους 37 °C για 48 ώρες σε αναερόβιες συνθήκες. Για τις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ψηλοί δοκιμαστικοί σωλήνες και τοποθετήθηκαν 7 ml MRS broth ανά δοκιμαστικό σωλήνα, καθώς και ανεστραμμένοι σωληνίσκοι durham, προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν παραγωγή αερίου.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ

Και στην περίπτωση των σταφυλόκοκκων αναγνωρίστηκαν οι διαφορετικοί τύποι αποικιών που αναπτύχθηκαν στα θρεπτικά υλικά MSA και Baird-Parker, μετά από μακροσκοπική εξέταση και παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών στο στερεοσκόπιο, ενώ παράλληλα σημειώθηκαν και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των διάφορων τύπων αποικιών (χρώμα, σχήμα, ύψος, υφή, χρυσίζουσα μορφή στο στερεοσκόπιο). Για κάθε διαφορετικό τύπο αποικίας πραγματοποιήθηκε χρώση Gram και παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στο μικροσκόπιο (αναμέναμε Gram-θετικούς κόκκους), ενώ παράλληλα έγινε και το τεστ της καταλάσης με χρήση διαλύματος 3% H₂O₂. Τα Gram-θετικά και καταλάση θετικά στελέχη σταφυλόκοκκων, απομονώθηκαν τόσο σε θρεπτικό υλικό MSA όσο και σε Baird-Parker με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς, και επωάστηκαν στους 30 °C για 48-72 ώρες στην περίπτωση του MSA και στους 37 °C για 48 ώρες στην περίπτωση του Baird-Parker, οπότε και επιβεβαιώθηκε η καθαρότητα των καλλιιεργειών με χρώση Gram και μικροσκοπική παρατήρηση. Ταυτόχρονα, στην περίπτωση του MSA, σημειώθηκαν τα στελέχη που προκάλεσαν αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού υλικού από κόκκινο σε κίτρινο, ενώ στην περίπτωση του Baird-Parker σημειώθηκαν τα στελέχη εκείνα που παρουσίαζαν διαυγή ή θολή ζώνη (μονή ή διπλή) ή δεν

Deleted: ¶

¶
¶

παρουσίαζαν καθόλου ζώνη. Για την αποθήκευση των στελεχών αυτών πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες σε Nutrient broth (Oxoid) και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 48 ώρες. Για τις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν κοντοί δοκιμαστικοί σωλήνες και τοποθετήθηκαν 5 ml Nutrient broth ανά δοκιμαστικό σωλήνα.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ

Σε ό,τι αφορά τους εντερόκοκκους, για την απομόνωση των διαφορετικών τύπων αποικιών ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε και στην περίπτωση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος. Τα Gram-θετικά και καταλάση αρνητικά στελέχη εντερόκοκκων απομονώθηκαν σε Slanetz-Bartley με βακτηριολογικό κρίκο με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς, και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 48 ώρες. Αφού επιβεβαιώθηκε η καθαρότητα των καλλιεργειών με χρώση Gram και μικροσκοπική παρατήρηση, τα στελέχη των εντερόκοκκων μεταφέρθηκαν σε υγρές καλλιέργειες με M17 broth (Oxoid) (επώαση στους 37 °C για 48 ώρες) για να αποθηκευτούν στη συνέχεια.

ΦΥΛΑΞΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΥΠΕΡΚΑΤΑΨΥΞΗ (-80° C)

Τα στελέχη που απομονώθηκαν καλλιεργήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C σε διάλυμα γλυκερόλης σε σωληνάκια erpendorfs. Η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.4 ml γλυκερόλης και 0.9 ml υγρής καλλιέργειας. Αρχικά τοποθετείται στα σωληνάκια erpendorfs η γλυκερόλη, και στη συνέχεια η ποσότητα της υγρής καλλιέργειας με χρήση πιπέτας, ενώ ακολουθεί ανάδευση στη συσκευή vortex, προκειμένου να επιτευχθεί καλή ανάμιξη της γλυκερόλης με την υγρή καλλιέργεια. Για κάθε υγρή καλλιέργεια (δηλ. για κάθε στέλεχος) αποθηκεύονταν πάντα 2 επαναλήψεις σε διάλυμα γλυκερόλης .

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ

Για την ταυτοποίηση των εντερόκοκκων αρχικά πραγματοποιήθηκε αναβίωση των στελεχών που είχαν απομονωθεί σε M17 broth και είχαν αποθηκευτεί στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ με τη χρήση γλυκερόλης. Η αναβίωση έγινε σε M17 άγαρ (LAB M) ως εξής: αρχικά, τα σωληνάκια erpendorfs που περιέχουν τα στελέχη που προορίζονται για αναβίωση μεταφέρονται εκτός υπερκαταψύκτη προκειμένου να αποψυχθούν. Εν συνεχεία, η όλη διεργασία γίνεται κάτω από ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο νηματώδους ροής. Από κάθε σωλήνα erpendorf μεταφέρονται με αυτόματη πιπέτα 40 μl υγρού στο τρυβλίο που περιέχει το M17 άγαρ και πραγματοποιείται γραμμική διασπορά με τον βακτηριολογικό κρίκο, ενώ κατόπιν το τρυβλίο παραμένει ανοιχτό για 1-2 λεπτά προκειμένου να απορροφηθεί η υπερκείμενη υγρασία. Τα σωληνάκια erpendorfs, μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας που περιγράψαμε, φυλάγονται στον καταψύκτη στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τυχόν μελλοντική χρήση. Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων με το M17 άγαρ στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 48 ώρες σε αερόβιες συνθήκες, προκειμένου να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός.

Έχοντας επιτύχει την αναβίωση των στελεχών που μας ενδιαφέρουν και αφού επιβεβαιώθηκε η καθαρότητα των καλλιιεργειών με χρώση Gram, πραγματοποιήθηκαν 4 δοκιμές προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα στελέχη που έχουν απομονωθεί ανήκουν όντως στο γένος *Enterococcus*. Οι δοκιμές αυτές ήταν: ανάπτυξη στους 10°C , ανάπτυξη στους $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, ανάπτυξη σε Aesculin Bile agar υπόστρωμα και ανθεκτικότητα σε υψηλή αλατότητα (6.5% NaCl).

Για την πραγματοποίηση της πρώτης δοκιμής χρησιμοποιήθηκαν κοντοί δοκιμαστικοί σωλήνες με υπόστρωμα 3 ml Brain Heart Infusion broth (LAB M) ανά σωλήνα. Με χρήση του βακτηριολογικού κρίκου και επιλέγοντας μεμονωμένες αποικίες, από τα τρυβλία με το M17 άγαρ τα στελέχη μεταφέρονται στο υγρό θρεπτικό υλικό που προαναφέραμε και ακολουθεί επώαση στους $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 7-10 ημέρες. Επειδή οι εντερόκοκκοι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται ικανοποιητικά και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, αναμένουμε να παρατηρήσουμε

ανάπτυξη των στελεχών στο υγρό θρεπτικό υλικό με σχηματισμό ιζήματος, οπότε το τεστ στην περίπτωση αυτή θεωρείται θετικό.

Στην περίπτωση του δεύτερου τεστ ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με το πρώτο, με τη διαφορά ότι η επώαση των στελεχών πραγματοποιήθηκε στους 45 °C για 48 ώρες. Επειδή οι εντερόκοκκοι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται ικανοποιητικά και σε υψηλότερες θερμοκρασίες, αναμένουμε να παρατηρήσουμε ανάπτυξη των στελεχών στο υγρό θρεπτικό υλικό με σχηματισμό ιζήματος, οπότε το τεστ στην περίπτωση αυτή θεωρείται θετικό.

Για την πραγματοποίηση της τρίτης δοκιμής χρησιμοποιήθηκαν ψηλοί δοκιμαστικοί σωλήνες με στερεό υπόστρωμα κεκλιμένο Esculin Bile Agar (6 ml Esculin Bile Agar ανά δοκιμαστικό σωλήνα). Με χρήση του βακτηριολογικού κρίκου, και επιλέγοντας μεμονωμένες αποικίες των στελεχών από τα τρυβλία με το M17 άγαρ, εμβολιάζουμε στους δοκιμαστικούς σωλήνες με το Esculin Bile Agar πραγματοποιώντας streaking στο κεκλιμένο άγαρ, ξεκινώντας από το κάτω μέρος και προχωρώντας προς τα επάνω. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση των δοκιμαστικών σωλήνων στους 44 °C για 24 ώρες. Οι εντερόκοκκοι έχουν την ικανότητα να υδρολύουν το Esculin. Λόγω της υδρόλυσης αυτής, αναμένουμε να μετατραπεί το ανοιχτό πράσινο χρώμα του Esculin Bile Agar σε καφέ-μαύρο, οπότε το τεστ θεωρείται θετικό.

Για την τέταρτη δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν κοντοί δοκιμαστικοί σωλήνες με 3 ml Brain Heart Infusion broth 6,5 % NaCl ανά σωλήνα. Τα στελέχη από το M17 άγαρ μεταφέρθηκαν στο υγρό θρεπτικό υλικό και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24-48 ώρες. Επειδή οι εντερόκοκκοι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται ικανοποιητικά παρουσία NaCl 6.5%, αναμένουμε να παρατηρήσουμε ανάπτυξη των στελεχών στο υγρό θρεπτικό υλικό με σχηματισμό ιζήματος, οπότε η δοκιμή θεωρείται θετική.

Όσα από τα στελέχη έδωσαν θετικό αποτέλεσμα και στις τέσσερις δοκιμές που περιγράψαμε χαρακτηρίστηκαν ως εντερόκοκκοι, οπότε προχωρήσαμε στην ταυτοποίηση των στελεχών αυτών και σε επίπεδο είδους με τη χρήση των βιοχημικών

δοκιμών που περιλαμβάνει το API rapid ID 32 strep (Biomerieux). Για την πραγματοποίηση του τεστ API, ως προπαρασκευαστικό στάδιο, χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια των εξεταζόμενων στελεχών σε τρυβλία με M17 άγαρ, τα οποία επώστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες. Για την εικοσιτετράωρη ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε πυκνή γραμμική διασπορά στα τρυβλία με το M17 άγαρ με χρήση του βακτηριολογικού κρίκου, λαμβάνοντας 2-3 μεμονωμένες αποικίες από προηγούμενη καλλιέργεια των εξεταζόμενων στελεχών στο ίδιο θρεπτικό υλικό.

Σε ό,τι αφορά τη διαδικασία του τεστ API των εντερόκοκκων, από την εικοσιτετράωρη ανακαλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους, με χρήση του βακτηριολογικού κρίκου, λαμβάνουμε ποσότητα εμβολίου την οποία μεταφέρουμε σε 3 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού σε κοντό δοκιμαστικό σωλήνα, προκειμένου να επιτύχουμε τη δημιουργία ομοιογενούς αιωρήματος, του οποίου η θολρότητα ισοδυναμεί με τον αριθμό 4 της κλίμακας McFarland. Το kit για το τεστ API των εντερόκοκκων περιλαμβάνει 32 διαφορετικές δοκιμές σε μικρή κλίμακα (που αντιστοιχούν σε 32 ‘πηγαδάκια’ με αφυδατωμένα αντιδραστήρια). Με την πιπέτα των 100 μl μεταφέρουμε από 55 μl του ομοιογενούς αιωρήματος εμβολίου, σε καθένα από τα 32 ‘πηγαδάκια’ του kit. Εν συνεχεία, το τεστ επωάζεται στους 37 °C για 4 ώρες, οπότε και είναι έτοιμο για ανάγνωση. Ανάλογα με το χρώμα που λαμβάνουν οι 32 αντιδράσεις, η εκάστοτε αντίδραση χαρακτηρίζεται ως θετική ή ως αρνητική. Από τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων (θετικών και αρνητικών), λαμβάνεται η ταυτότητα του εξεταζόμενου στελέχους, μέσω ειδικού προγράμματος στον H/Y (Apilab Plus, Copyright 1990, Biomerieux).

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤ. ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Η αναβίωση των εξεταζόμενων στελεχών από τις γλυκερόλες έγινε σε τρυβλία petri με MRS άγαρ, με την αντίστοιχη διαδικασία που περιγράψαμε προηγουμένως για τους εντερόκοκκους. Τα τρυβλία με τα εξεταζόμενα στελέχη επώστηκαν σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 48-72 ώρες, και κατόπιν ελέγχθηκε η

καθαρότητα των καλλιιεργειών με χρώση Gram και μικροσκοπική παρατήρηση. Στο προπαρασκευαστικό στάδιο, σε αντιστοιχία με τους εντερόκοκκους, πραγματοποιήθηκαν εικοσιτετράωρες ανακαλλιέργειες των εξεταζόμενων στελεχών σε MRS άγαρ. Το kit για το τεστ API των λακτοβάκιλλων (API 50 CHL Medium, Biomerieux) περιλαμβάνει 50 αντιδράσεις (που αντιστοιχούν σε 50 ‘πηγαδάκια’ με αφυδατωμένα αντιδραστήρια), καθώς και μία φύσιγγα API 50 CHL Medium (10 ml) για τη δημιουργία αιωρήματος συγκεκριμένης πυκνότητας κυττάρων του εξεταζόμενου στελέχους, του οποίου η θολερότητα ισοδυναμεί με τον αριθμό 2 της κλίμακας McFarland.

Στη συνέχεια, με χρήση της αυτόματης πιπέτας των 1000 μl, μεταφέρουμε αντίστοιχη ποσότητα του αιωρήματος και σταδιακά γεμίζουμε καθένα από τα 50 ‘πηγαδάκια’ του kit μέχρι ενός συγκεκριμένου σημείου. Κατόπιν, προκειμένου να επιτύχουμε αναερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιούμε αποστειρωμένο mineral oil, το οποίο μεταφέρεται με πιπέτα σε καθένα από τα 50 ‘πηγαδάκια’ των αντιδράσεων. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα τεστ επωάζονται στους 37 °C για 48 ώρες, οπότε και είναι έτοιμα για ανάγνωση. Από τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων (θετικών και αρνητικών), εξάγεται στο συμπέρασμα για την ταυτότητα του εξεταζόμενου στελέχους, μέσω ειδικού προγράμματος στον H/Y (Apilab Plus, Copyright 1990, Biomerieux).

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ

Η αναβίωση των στελεχών προς ταυτοποίηση από τις γλυκερόλες έγινε σε τρυβλία petri με Baird-Parker άγαρ, με την αντίστοιχη διαδικασία που περιγράψαμε προηγουμένως για τους εντερόκοκκους και για τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος. Τα τρυβλία με τα εξεταζόμενα στελέχη επωάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 48 ώρες, και κατόπιν ελέγχθηκε η καθαρότητα των καλλιιεργειών με χρώση Gram και μικροσκοπική παρατήρηση. Στο προπαρασκευαστικό στάδιο, πραγματοποιήθηκαν εικοσιτετράωρες ανακαλλιέργειες των εξεταζόμενων στελεχών σε Baird-Parker άγαρ. Το kit για το τεστ API των σταφυλόκοκκων (API 32 Staph, Biomerieux) περιλαμβάνει 26 αντιδράσεις (που αντιστοιχούν σε 26 ‘πηγαδάκια’ με

αφυδατωμένα αντιδραστήρια). Από την εικοσιτετράωρη ανακαλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους, με χρήση του βακτηριολογικού κρίκου, λαμβάνουμε ποσότητα στελέχους την οποία μεταφέρουμε σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό σε κοντό δοκιμαστικό σωλήνα (3 ml ανά δοκιμαστικό σωλήνα), προκειμένου να επιτύχουμε τη δημιουργία αιωρήματος, του οποίου η θολερότητα ισοδυναμεί με τον αριθμό 0,5 της κλίμακας McFarland. Με αυτόματη πιπέτα (100 µl) μεταφέρουμε από 55 µl του αιωρήματος, το οποίο περιέχει το εξεταζόμενο στέλεχος, σε καθένα από τα 26 'πηγαδάκια' του kit. Στις 3 πρώτες αντιδράσεις του τεστ (URE, ADH και ODC) προστίθενται από 2 σταγόνες mineral oil σε κάθε αντίδραση, προκειμένου να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες για τις συγκεκριμένες αντιδράσεις, και στη συνέχεια το τεστ επωάζεται αερόβια στους 37 °C για 24 ώρες, οπότε και είναι έτοιμο για ανάγνωση. Ανάλογα με το χρώμα που λαμβάνουν οι 26 αντιδράσεις, η εκάστοτε αντίδραση χαρακτηρίζεται ως θετική ή ως αρνητική. Από τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων (θετικών και αρνητικών), λαμβάνεται η ταυτότητα του εξεταζόμενου στελέχους, μέσω ειδικού προγράμματος στον H/Y (Apilab Plus, Copyright 1990, Biomerieux).

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η δοκιμασία ανθεκτικότητας των εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που συστήνεται από την National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2003α, NCCLS 2003β). Τα εξεταζόμενα στελέχη επωάστηκαν αερόβια σε τρυβλία petri με Mueller Hinton άγαρ (Oxoid) στους 37 °C για 24 ώρες και εν συνεχεία επιβεβαιώθηκε η καθαρότητα των καλλιεργειών με χρώση Gram και μικροσκοπική παρατήρηση. Στη συνέχεια εξετάστηκε η ευαισθησία του κάθε στελέχους απέναντι σε 12 επιλεγμένα αντιβιοτικά σε μεγάλα τρυβλία διαμέτρου 15cm. Στα τρυβλία αυτά είχε τοποθετηθεί υπόστρωμα Mueller Hinton άγαρ 65 ml, έτσι ώστε να έχουν όλα σταθερό πάχος 4 mm. Κατόπιν, από την εικοσιτετράωρη ανακαλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους, με χρήση του βακτηριολογικού κρίκου, λαμβάνουμε ποσότητα στελέχους την οποία μεταφέρουμε

σε 4 ml φυσιολογικού ορού (0,85% NaCl), προκειμένου να επιτύχουμε τη δημιουργία ομοιογενούς διαλύματος, του οποίου η θολερότητα ισοδυναμεί με τον αριθμό 1 της κλίμακας McFarland. Με χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στυλεού, τον οποίο εμβαπτίζουμε στο ομοιογενές εμβόλιο, επιστρώνουμε τα μεγάλα τρυβλία petri τρεις φορές, περιστρέφοντας το τρυβλίο κατά 60° ύστερα από κάθε επίστρωση, προκειμένου να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια του τρυβλίου με το εμβόλιο. Για κάθε ένα στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν τρία μεγάλα τρυβλία. Οι δίσκοι των αντιβιοτικών (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Becton Dickinson) τοποθετήθηκαν στα μεγάλα τρυβλία με τη χρήση λαβίδας, αμέσως μετά την ολοκλήρωση όλων των εμβολιασμών. Εν συνεχεία, τα μεγάλα τρυβλία επωάστηκαν αερόβια στους 37 °C για 24 ώρες, οπότε και μετρήθηκε η διάμετρος των ζωνών παρεμπόδισης με ακρίβεια χιλιοστού (mm).

Για τη δοκιμασία της ανθεκτικότητας των εντερόκοκκων χρησιμοποιήθηκαν 12 αντιβιοτικά, τα οποία άνηκαν στις εξής κατηγορίες:

1. Αναστολείς της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος → Ampicillin 10 µg, Vancomycin 30 µg, Bacitracin 10 µg
2. Αναστολείς της σύνθεσης πρωτεϊνών → Tetracycline 30 µg, Erythromycin 15 µg, Streptomycin 300 µg, Gentamycin 120 µg
3. Αναστολείς της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων → Ciprofloxacin 5 µg, Rifampicin 5 µg, Ofloxacin 5 µg, Norfloxacin 10 µg, Nitrofurantoin 300 µg

Ανάλογα με τη διάμετρο των ζωνών παρεμπόδισης τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα (Sensitive/S), ενδιάμεσης ανθεκτικότητας (Intermediate/I) ή ανθεκτικά (Resistant/R) με βάση τα πρότυπα όρια ζωνών παρεμπόδισης που αναφέρονται από την εταιρία (Πίνακας 6 της επόμενης σελίδας).

Πίνακας 6: Ερμηνευτικός πίνακας ζωνών παρεμπόδισης για τη δοκιμασία της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των στελεχών του γένους *Enterococcus*.

Αντιβιοτικό	Κωδικός αντιβιοτικού	Δόση αντιβιοτικού ανά δισκίο	Ερμηνευτικά πρότυπα για διάμετρο ζωνών παρεμπόδισης		
			Ανθεκτικό στέλεχος (R)	Ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στέλεχος (I)	Ευαίσθητο στέλεχος (S)
Ampicillin	AM-10	10 µg	≤ 16	---	≥ 17
Vancomycin	Va-30	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Bacitracin	B-10	10 µg	≤ 8	9 - 12	≥ 13
Tetracycline	Te-30	30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Erythromycin	E-15	15 µg	≤ 13	14 - 22	≥ 23
Streptomycin	S-300	300 µg	≤ 6	7 - 9	≥ 10
Gentamycin	GM-120	120 µg	≤ 6	7 - 9	≥ 10
Ciprofloxacin	CIP-5	5 µg	≤ 15	16 - 20	≥ 21
Rifampicin	RA-5	5 µg	≤ 16	17 - 19	≥ 20
Ofloxacin	OFX-5	5 µg	≤ 12	13 - 15	≥ 16
Norfloxacin	NOR-10	10 µg	≤ 12	13 - 16	≥ 17
Nitrofurantoin	F/M-300	300 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η δοκιμασία ευαισθησίας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος, απέναντι σε επιλεγμένα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της υπερκείμενης έγχυσης άγαρ, η οποία προτάθηκε το 1998 από τον Charteris *et al.* Στο προπαρασκευαστικό στάδιο, πραγματοποιήθηκαν τρεις 48ωρες ανακαλλιέργειες των εξεταζόμενων στελεχών σε MRS broth σε κοντούς

δοκιμαστικούς σωλήνες (5 ml MRS broth ανά σωλήνα), οι οποίες επωάστηκαν στους 37 °C σε αναερόβιες συνθήκες, έτσι ώστε να επιτευχθεί υψηλός βακτηριακός πληθυσμός από κάθε εξεταζόμενο στέλεχος. Η τρίτη 48ωρη ανακαλλιέργεια ήταν αυτή η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία της ευαισθησίας. Σύμφωνα με τη διαδικασία, 600 μl από την τρίτη 48ωρη ανακαλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους μεταφέρονται με αυτόματη πιπέτα σε δοχείο Universal το οποίο περιέχει 12 ml άγαρ 1%, και το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία 50 °C, ώστε το άγαρ να βρίσκεται σε υγρή μορφή. Εν συνεχεία, τα 12,6 ml άγαρ, που περιέχουν το εξεταζόμενο στέλεχος, εγχύνονται σε μεγάλα τρυβλία petri διαμέτρου 15cm, τα οποία περιέχουν ως υπόστρωμα 47 ml MRS άγαρ (στερεοποιημένο). Κατόπιν τα τρυβλία παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει το υγρό άγαρ που περιέχει το εμβόλιο του εξεταζόμενου στελέχους και στη συνέχεια πραγματοποιείται η τοποθέτηση των δισκίων των αντιβιοτικών (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Becton Dickinson) με τη χρήση λαβίδας. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα μεγάλα τρυβλία επωάστηκαν σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 ώρες, οπότε και μετρήθηκε η διάμετρος των ζωνών παρεμπόδισης με ακρίβεια χιλιοστού (mm).

Για τη δοκιμασία της ανθεκτικότητας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν 12 αντιβιοτικά, τα οποία άνηκαν στις εξής κατηγορίες:

1. Αναστολείς της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος → Ampicillin 10 μg, Amoxicillin 20 μg/Clavulanic acid 10 μg, Cephalothin 30 μg, Vancomycin 30 μg, Bacitracin 10 μg
2. Αναστολείς της σύνθεσης πρωτεϊνών → Amikacin 30 μg, Kanamycin 30 μg, Chloramphenicol 30 μg, Tetracycline 30 μg, Erythromycin 15 μg
3. Αναστολείς της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων → Ciprofloxacin 5 μg, Rifampicin 5 μg

Ανάλογα με τη διάμετρο των ζωνών παρεμπόδισης τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα (Sensitive/S), ενδιάμεσης ανθεκτικότητας (Intermediate/I) ή ανθεκτικά (Resistant/R) με βάση τα πρότυπα όρια ζωνών παρεμπόδισης που αναφέρονται από τους Charteris et al. (1998) (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Ερμηνευτικός πίνακας ζωνών παρεμπόδισης για τη δοκιμασία της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος με βάση τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης άγαρ.

Αντιβιοτικό	Κωδικός αντιβιοτικού	Δόση αντιβιοτικού ανά δισκίο	Ερμηνευτικά πρότυπα για διάμετρο ζωνών παρεμπόδισης (mm)		
			Ανθεκτικό στέλεχος (R)	Ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στέλεχος (I)	Ευαίσθητο στέλεχος (S)
Ampicillin	AM-10	10 µg	≤ 12	13 - 15	≥ 16
Amoxicillin 20µg/ Clavulanic acid 10µg	AmC-30	30 µg	≤ 18	19 - 20	≥ 21
Cephalothin	CF-30	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Vancomycin	Va-30	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Bacitracin	B-10	10 µg	≤ 15	16 - 17	≥ 18
Amikacin	AN-30	30 µg	≤ 15	16 - 17	≥ 18
Kanamycin	K-30	30 µg	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Chloramphenicol	C-30	30 µg	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Tetracycline	Te-30	30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Erythromycin	E-15	15 µg	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Ciprofloxacin	CIP-5	5 µg	≤ 13	14 - 18	≥ 19
Rifampicin	RA-5	5 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η δοκιμασία ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της υπερκείμενης έγχυσης άγαρ με ορισμένες τροποποιήσεις, σύμφωνα με τους Martin *et al* (2006). Στο προπαρασκευαστικό στάδιο, τα εξεταζόμενα στελέχη των σταφυλόκοκκων μεταφέρθηκαν με χρήση του βακτηριολογικού κρίκου σε υπόστρωμα TSBYE (Tryptic Soy Broth με προσθήκη 0,6% Yeast Extract, Merck) σε κοντούς δοκιμαστικούς σωλήνες (3 ml TSBYE ανά δοκιμαστικό σωλήνα), και στη συνέχεια επωάστηκαν στους 37 °C για 20-24 ώρες σε αερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με τη διαδικασία, 300 μl από την 24ωρη καλλιέργεια του εξεταζόμενου στελέχους στο TSBYE μεταφέρονται με αυτόματη πιπέτα σε δοχείο Universal το οποίο περιέχει 12 ml Mueller Hinton άγαρ, και το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία 50 °C, ώστε το άγαρ να βρίσκεται σε υγρή μορφή. Εν συνεχεία, τα 12,3 ml Mueller Hinton άγαρ, που περιέχουν το εξεταζόμενο στέλεχος, εγχύονται σε μεγάλα τρυβλία petri διαμέτρου 15cm, τα οποία περιέχουν επίσης Mueller Hinton άγαρ σε ποσότητα 47 ml (στερεοποιημένο). Κατόπιν τα τρυβλία παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει το υγρό Mueller Hinton άγαρ που εγχύσαμε στην επιφάνεια του τρυβλίου και το οποίο περιέχει το εμβόλιο του εξεταζόμενου στελέχους. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η τοποθέτηση των δισκίων των αντιβιοτικών (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Becton Dickinson) με τη χρήση λαβίδας. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα μεγάλα τρυβλία επωάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 ώρες, οπότε και μετρήθηκε η διάμετρος των ζωνών παρεμπόδισης με ακρίβεια χιλιοστού (mm).

Για τη δοκιμασία της ευαισθησίας των σταφυλόκοκκων χρησιμοποιήθηκαν 12 αντιβιοτικά, τα οποία άνηκαν στις εξής κατηγορίες:

1. Αναστολείς της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος → Ampicillin 10 μg, Amoxicillin 20 μg/Clavulanic acid 10 μg, Methicillin 5 μg, Cephalothin 30 μg, Vancomycin 30 μg

2. Αναστολείς της σύνθεσης πρωτεϊνών → Kanamycin 30 µg, Chloramphenicol 30 µg, Tetracycline 30 µg, Erythromycin 15 µg, Clindamycin 2 µg
3. Αναστολείς της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων → Nitrofurantoin 300 µg, Rifampicin 5 µg

Ανάλογα με τη διάμετρο των ζωνών παρεμπόδισης τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα (Sensitive/S), ενδιάμεσης ανθεκτικότητας (Intermediate/I) ή ανθεκτικά (Resistant/R) με βάση τα πρότυπα όρια ζωνών παρεμπόδισης που αναφέρονται από τις εταιρίες παρασκευής (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Ερμηνευτικός πίνακας ζωνών παρεμπόδισης για τη δοκιμασία της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των στελεχών του γένους *Staphylococcus* με βάση τη μέθοδο υπερκείμενης έγχυσης άγαρ.

Αντιβιοτικό	Κωδικός αντιβιοτικού	Δόση αντιβιοτικού ανά δισκίο	Ερμηνευτικά πρότυπα για διάμετρο ζωνών παρεμπόδισης (mm)		
			Ανθεκτικό στέλεχος (R)	Ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στέλεχος (I)	Ευαίσθητο στέλεχος (S)
Ampicillin	AM-10	10 µg	≤ 28	---	≥ 29
Amoxicillin 20µg/ Clavulanic acid 10µg	AmC-30	30 µg	≤ 19	---	≥ 20
Methicillin	MET-5	5 µg	≤ 17	---	≥ 18
Cephalothin	CF-30	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Vancomycin	Va-30	30 µg	≤ 14	---	≥ 15
Kanamycin	K-30	30 µg	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Chloramphenicol	C-30	30 µg	≤ 12	13 - 17	≥ 18
Tetracycline	Te-30	30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Erythromycin	E-15	15 µg	≤ 13	14 - 22	≥ 23
Clindamycin	DA-2	2 µg	≤ 14	15 - 20	≥ 21
Nitrofurantoin	F/M-300	300 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Rifampicin	RA-5	5 µg	≤ 16	17 - 19	≥ 20

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ- ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί των σαλαμιών αέρος που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 της επόμενης σελίδας. Ο πληθυσμός της ολικής αερόβιας μικροχλωρίδας κυμάνθηκε από 3,67 log cfu g⁻¹ έως 6,43 log cfu g⁻¹, με εξαίρεση το σαλάμι 2 και το σαλάμι 4, όπου δεν ανιχνεύτηκε καθόλου ο πληθυσμός αυτός. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος αποτέλεσαν το κυρίαρχο είδος μικροοργανισμού που απομονώθηκε από όλα τα σαλάμια αέρος, με πληθυσμούς που κυμάνθηκαν από 5,63 log cfu g⁻¹ έως 7,49 log cfu g⁻¹. Σε ό,τι αφορά τους σταφυλόκοκκους που απομονώθηκαν από το Mannitol Salt Agar, οι πληθυσμοί τους ανέρχονταν σε 3,42 log cfu g⁻¹ έως 6,01 log cfu g⁻¹, ενώ παρόμοιοι πληθυσμοί προέκυψαν, αντίστοιχα, και από τη χρήση του Baird-Parker Agar για την απομόνωση των σταφυλόκοκκων (2,85 log cfu g⁻¹ έως 5,75 log cfu g⁻¹). Στο σαλάμι 2 δεν ανιχνεύτηκαν σταφυλόκοκκοι είτε με χρήση του Mannitol Salt Agar είτε με τη χρήση του Baird-Parker Agar. Εντερόκοκκοι ανιχνεύτηκαν σε 8 από τα 10 σαλάμια αέρος σε πληθυσμούς που κυμαίνονταν από 1,83 log cfu g⁻¹ έως 6,78 log cfu g⁻¹. Συγκεκριμένα, τα σαλάμια 3 και 5 ήταν αυτά στα οποία δεν ανιχνεύτηκαν εντερόκοκκοι. Αερόβια σπορογόνα βακτήρια βρέθηκαν σε 4 από τα 10 σαλάμια αέρος που μελετήθηκαν (σαλάμια 1, 2, 5 και 8), και οι πληθυσμοί τους ανήλθαν σε 2,37 log cfu g⁻¹ έως 2,94 log cfu g⁻¹. Ζύμες ανιχνεύτηκαν μόνο σε 2 σαλάμια αέρος (σαλάμια 1 και 5), σε πληθυσμούς που κυμαίνονταν από 4,56 log cfu g⁻¹ έως 5,26 log cfu g⁻¹. Εντεροβακτήρια-*E.coli*, κλοστρίδια και ψευδομονάδες δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα από τα σαλάμια αέρος που απασχόλησαν τη μελέτη.

Πίνακας 9: Μικροβιακοί πληθυσμοί ($\log cfu g^{-1}$) των σολομιών αέρος που μελετήθηκαν.

	ΟΛΙΚΗ ΑΕΡΟΒΙΑ ΜΙΚΡΟΧΛΩΣΙΑ	ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ	ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ (Mannitol Salt Agar)	ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ (Baird-Parker)	ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ	ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ- E.coli	ΑΕΡΟΒΙΑ ΣΠΟΡΟΓΟΝΑ	ΖΥΜΕΣ	ΚΛΟΣΤΡΙΔΙΑ	ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΕΣ
Σώλη 1 Ιοβ Μολακίσης Λευκάδος	5,12	5,63	3,42	2,85	4,14	<1,00	2,37	4,56	<1,00	<1,00
Σώλη 2 Πολυχρονόπουλου Λευκάδος	<1,00	6,31	<1,00	<1,00	1,83	<1,00	2,75	<1,00	<1,00	<1,00
Σώλη 3 Ιφροντής Λευκάδος	3,67	6,72	5,73	5,61	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
Σώλη 4 Δαγρέ Τριτόνιος	<1,00	7,47	3,97	3,56	6,75	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
Σώλη 5 Σπρεμμένου Ευρητανίας	6,43	7,18	6,01	5,75	<1,00	<1,00	2,75	5,26	<1,00	<1,00
Σώλη 6 Κρέτα Φαρμ Λευκάδος	4,08	6,91	4,78	4,56	6,78	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
Σώλη 7 Νίκας Λευκάδος	3,64	7,14	4,52	4,52	6,54	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
Σώλη 8 Ντελημάρη Λευκάδος	4,8	6,6	4,9	4,86	5,94	<1,00	2,94	<1,00	<1,00	<1,00
Σώλη 9 Βίση Παροδοσιακό	4,03	7,49	5,49	5,38	5,2	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
Σώλη 10 Θράκη Λευκάδος	3,85	7,18	3,97	4,03	3,32	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ

Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των εντερόκοκκων παρουσιάζονται στον πίνακα 10 της επόμενης σελίδας. Συνολικά, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 21 στελέχη εντερόκοκκων από 8 σαλάμια αέρος (όπως προαναφέραμε σε δύο σαλάμια αέρος δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου εντερόκοκκοι: Ιφαντής Λευκάδος και Στρεμμένου Ευρυτανίας). Δέκα από τα 21 στελέχη εντερόκοκκων που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως *E. hirae*, ο οποίος αποτέλεσε και το κυρίαρχο είδος εντερόκοκκου των σαλαμιών. Έξι στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *E. faecalis*, δύο ως *E. gallinarum*, ένα στέλεχος ως *E. faecium* 1, ένα ως *E. casseliflavus* και ένα ως *E. hirae/casseliflavus*. Από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης Ιώβ Μαλακάσης Λευκάδος και Ντελημάρη Λευκάδος απομονώθηκαν τέσσερα διαφορετικά στελέχη εντερόκοκκων αντίστοιχα, ενώ από τα σαλάμια Πολυχρονόπουλου Λευκάδος και Δαγρέ Τριπόλεως απομονώθηκε ένα στέλεχος, αντίστοιχα. Από τα σαλάμια αέρος με καλλιέργειες εκκίνησης Θράκη και Βίκη απομονώθηκαν τέσσερα διαφορετικά στελέχη εντερόκοκκων αντίστοιχα, ενώ από το σαλάμι Νίκας έγινε απομόνωση δύο διαφορετικών στελεχών. Από το σαλάμι Κρέτα Φαρμ απομονώθηκε ένα στέλεχος εντερόκοκκου.

Πίνακας 10: Ταυτοποίηση των στελεχών του γένους *Enterococcus* που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος σύμφωνα με το τεστ API rapid ID 32 strep.

Σαλάμια αέρος	Στέλεχος (κωδικός)	Ταυτοποίηση	Επίπεδο ταυτοποίησης	% id*	T**
Σαλάμι 1 Ιωβ Μαλακάσης Λευκάδος	Ιώβ T1	<i>E. faecalis</i>	Excellent	99,9	0,94
	Ιώβ T2	<i>E. hirae</i>	Doubtful profile	99,2	0,35
	Ιώβ T3	<i>E. faecalis</i>	Excellent	99,9	0,79
	Ιώβ T4	<i>E. hirae</i>	Doubtful profile	99,2	0,35
Σαλάμι 2 Πολυχρονόπουλου Λευκάδος	Πολ T1	<i>E. faecalis</i>	Very good	98,9	0,63
Σαλάμι 3 Δαγρέ Τριπόλεως	Δαγ T1	<i>E. hirae</i>	Doubtful profile	98,6	0,24
Σαλάμι 4 Κρέτα Φαρμ Λευκάδος	Κρέτα T1	<i>E. hirae/casseliflavus</i>	Non acceptable profile		
Σαλάμι 5 Νίκας Λευκάδος	Νικ T1	<i>E. casseliflavus</i>	Non acceptable profile		
	Νικ T2	<i>E. faecalis</i>	Very good	99,9	0,58
Σαλάμι 6 Ντελημάρη Λευκάδος	Ντελ T1	<i>E. gallinarum</i>	Very good	99,9	0,64
	Ντελ T2	<i>E. hirae</i>	Very good	99,2	0,72
	Ντελ T3	<i>E. hirae</i>	Very good	99,2	0,72
	Ντελ T4	<i>E. hirae</i>	Very good	99,2	0,72
Σαλάμι 7 Βίκη Παραδοσιακό	Βίκη T1	<i>E. hirae</i>	Very good	99,2	0,72
	Βίκη T2	<i>E. hirae</i>	Very good	99,2	0,72
	Βίκη T3	<i>E. faecium 1</i>	Good	93,6	0,52
	Βίκη T4	<i>E. hirae</i>	Very good	99,2	0,72
Σαλάμι 8 Θράκη Λευκάδος	Θράκη T1	<i>E. faecalis</i>	Excellent	99,9	0,94
	Θράκη T2	<i>E. faecalis</i>	Excellent	99,9	0,94
	Θράκη T3	<i>E. gallinarum</i>	Very good	99,4	0,62
	Θράκη T4	<i>E. hirae</i>	Very good	99,2	0,72

* % id: Ποσοστό ταυτοποίησης - an estimate of how closely the profile corresponds to the taxon relative to all the other taxa in the database

** T: The T index - an estimate of how closely the profile corresponds to the most typical set of reactions for each taxon

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος παρουσιάζονται στον πίνακα 11 της επόμενης σελίδας. Συνολικά, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 30 στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και από τα 10 σαλάμια αέρος που απασχόλησαν τη μελέτη. Από αυτά τα 30 στελέχη, τα δεκαεπτά ταυτοποιήθηκαν ως λακτοβάκιλλοι, οι οποίοι αποτέλεσαν και το κυρίαρχο είδος βακτηρίων του γαλακτικού οξέος των σαλαμιών αέρος. Πιο συγκεκριμένα, από τα 17 στελέχη λακτοβάκιλλων, τα έξι ταυτοποιήθηκαν ως *Lb. plantarum*, τρία ως *Lb. paracasei* / *paracasei*, δύο ως *Lb. fermentum*, ένα στέλεχος ως *Lb. acidophilus*, ένα ως *Lb. brevis*, ένα ως *Lb. coprophilus* και τα τρία εναπομένοντα ως *Lb. delbrueckii. delbr. / curvatus*, *Lb. plantarum / brevis* και *Lb. plantarum / rhamnosus*, αντίστοιχα. Από τα υπόλοιπα είδη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, εννιά στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Pediococcus pentosaceus* (1 και 2), δύο στελέχη ως *Pediococcus* spp., ένα στέλεχος ως *Leuconostoc mes.mes/dext.2*, ενώ ήταν αδύνατη η ακριβής ταυτοποίηση του στελέχους με κωδικό Στρεμ Τ1 που απομονώθηκε από το σαλάμι 5. Από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης Ιώβ Μαλακάσης Λευκάδος και Ντελημάρη Λευκάδος απομονώθηκαν πέντε διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων αντίστοιχα, ενώ από τα σαλάμια Πολυχρονόπουλου Λευκάδος και Δαγρέ Τριπόλεως απομονώθηκε ένα στέλεχος, αντίστοιχα. Από το σαλάμι αέρος Στρεμμένου Ευρυτανίας απομονώθηκαν τρία διαφορετικά στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος. Από τα σαλάμια αέρος με καλλιέργειες εκκίνησης Ιφαντής και Θράκη απομονώθηκαν τέσσερα διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων αντίστοιχα, ενώ από τα σαλάμια Νίκας και Βίκη πραγματοποιήθηκε η απομόνωση δύο στελεχών, αντίστοιχα. Από το σαλάμι Κρέτα Φαρμ απομονώθηκαν τρία διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Πίνακας 11: Ταυτοποίηση των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος σύμφωνα με το τεστ API 50 CHL Medium.

	Στέλεχος (κωδικός)	Ταυτοποίηση	Επίπεδο ταυτοποίησης	% id*	T**
Σαλάμι 1 Ιωβ Μαλακάσης Λευκάδος	Ιώβ T1'	<i>Lb. brevis</i> 3	Acceptable	83,2	0,55
	Ιώβ T1	<i>Lb. plantarum</i> 1	Very good	99,2	0,93
	Ιώβ T2	<i>Lb. plantarum</i> 1	Very good	99,2	0,93
	Ιώβ T3	<i>Pediococcus</i> spp.	Good	92,6	0,74
	Ιώβ T4	<i>Lb. paracasei</i> / <i>paracasei</i> 1	Excellent	99,9	0,88
Σαλάμι 2 Πολυχρονόπουλου Λευκάδος	Πολ T1	<i>Lb. acidophilus</i> 1	Good	96,8	0,77
Σαλάμι 3 Ιφαντής Λευκάδος	ΙφΛε T1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	Excellent	99,9	0,97
	ΙφΛε T2	<i>Lb. plantarum</i> 1	Very good	99,4	0,99
	ΙφΛε T3	<i>Leuconostoc mes.mes/dext.</i> 2	Good	95,1	0,46
	ΙφΛε T4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	Excellent	99,9	0,88
Σαλάμι 4 Δαγρέ Τριπόλεως	Δαγ T1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	Excellent	99,9	0,97
Σαλάμι 5 Στρεμμένου Ευρητανίας	Στρεμ T1	<i>Lc. lactis lactis</i> 1 <i>Leuconostoc mes.mes/dext.</i> 2 <i>Lb. fermentum</i>	Low discrimination	70,3 18,5 6,9	0,41 0,27 0,24
	Στρεμ T2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1	Acceptable	83,7	0,62
	Στρεμ T3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1	Acceptable	83,7	0,62
Σαλάμι 6 Κρέτα Φαρμ Λευκάδος	Κρέτα T1	<i>Lb. plantarum</i> 1	Excellent	99,9	0,9
	Κρέτα T2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	Excellent	99,9	0,97
	Κρέτα T3	<i>Lb. paracasei</i> / <i>paracasei</i> 3	Very good	99,6	0,92
Σαλάμι 7 Νίκας Λευκάδος	Νικ T1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	Excellent	99,9	0,97
	Νικ T2	<i>Lb. plantarum</i> 1 <i>Lb. rhamnosus</i>	Doubtful profile	90 9	0,42 0,28
Σαλάμι 8 Ντελημάρη Λευκάδος	Ντελ T1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	Doubtful profile	97,9	0,78
	Ντελ T2	<i>Lb. plantarum</i> 1	Acceptable	83,5	0,42
	Ντελ T3	<i>Lb. fermentum</i>	Good	93,3	0,53
	Ντελ T4	<i>Lb. plantarum</i> 1 <i>Lb. brevis</i> 1	Good identification to the genus	55,8 41	0,72 0,78
	Ντελ T5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1	Excellent	99,9	0,99
Σαλάμι 9 Βίκη Παραδοσιακό	Βίκη T1	Lb. coprophilus	Doubtful profile	96,7	0,56
	Βίκη T2	<i>Lb. paracasei</i> / <i>paracasei</i> 1	Excellent	99,9	0,87
Σαλάμι 10 Θράκη Λευκάδος	Θράκη T1	<i>Lb. plantarum</i> 1	Excellent	99,9	1
	Θράκη T2	<i>Pediococcus</i> spp.	Good	96,5	0,83
	Θράκη T3	<i>Lb. fermentum</i>	Good	93,3	0,53
	Θράκη T4	<i>Lb. delbr.delbr.</i> <i>Lb. curvatus</i>	Very good identification to the genus	86,5 13,2	0,85 0,84

* % id: Ποσοστό ταυτοποίησης - an estimate of how closely the profile corresponds to the taxon relative to all the other taxa in the database

** T: The T index - an estimate of how closely the profile corresponds to the most typical set of reactions for each taxon

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ

Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των σταφυλόκοκκων παρουσιάζονται στον πίνακα 12 της επόμενης σελίδας. Συνολικά, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 24 στελέχη σταφυλόκοκκων από 9 σαλάμια αέρος (στο σαλάμι αέρος Πολυχρονόπουλου Λευκάδος δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου σταφυλόκοκκοι). Πιο αναλυτικά, πέντε στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *S. saprophyticus*, τέσσερα ως *S. xylosus*, τρία ως *S. warneri*, τρία ως *S. carnosus*, τρία ως *S. simulans*, ένα στέλεχος ως *S. cohnii*, ένα ως *S. auricularis*, ενώ τα τέσσερα εναπομένοντα αναγνωρίστηκαν ως *S. saprophyticus* / *xylosus*, *S. cohnii cohnii* / *capitis*, *S. hominis* / *epidremidis* και *S. hominis* / *warneri*, αντίστοιχα. Από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης Ιώβ Μαλακάσης Λευκάδος, Ντελημάρη Λευκάδος και Στρεμμένου Ευρυτανίας απομονώθηκαν δύο, οκτώ και τέσσερα διαφορετικά στελέχη σταφυλόκοκκων αντίστοιχα, ενώ από το σαλάμι Δαγρέ Τριπόλεως πραγματοποιήθηκε απομόνωση ενός στελέχους. Από τα σαλάμια αέρος με καλλιέργειες εκκίνησης Ιφαντής, Κρέτα Φαρμ, Νίκας και Θράκη απομονώθηκε ένα στέλεχος σταφυλόκοκκου, σε αντίθεση με το σαλάμι Βίκη Παραδοσιακό από το οποίο απομονώθηκαν πέντε διαφορετικά στελέχη.

Πίνακας 12: Ταυτοποίηση των στελεχών του γένους *Staphylococcus* που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος σύμφωνα με το τεστ API ID 32 Staph.

	Στέλεχος (κωδικός)	Ταυτοποίηση	Επίπεδο ταυτοποίησης	% id*	T**
Σαλάμι 1 Ιώβ Μαλακάσης Λευκάδος	Ιώβ T1	<i>S. saprophyticus</i>	Very good	99,7	0,59
	Ιώβ T2	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	Very good identification to the genus	58,7 41,2	0,48 0,66
Σαλάμι 2 Ιφαντής Λευκάδος	ΙφΛε T1	<i>S. carnosus</i>	Good	99,9	0,45
Σαλάμι 3 Δαγρέ Τριπόλεως	Δαγ T1	<i>S. carnosus</i>	Good	99,9	0,45
Σαλάμι 4 Στρεμμένου Ευρητανίας	Στρεμ T1	<i>S. saprophyticus</i>	Excellent	99,9	0,82
	Στρεμ T2	<i>S. xylosus</i>	Very good	99,4	0,9
	Στρεμ T3	<i>S. xylosus</i>	Excellent	99,9	0,82
	Στρεμ T4	<i>S. xylosus</i>	Very good	99,4	0,9
Σαλάμι 5 Κρέτα Φαρμ Λευκάδος	Κρέτα T1	<i>S. cohnii cohnii</i> <i>S. capitis</i>	Unacceptable profile		
Σαλάμι 6 Νίκας Λευκάδος	Νικ T1	<i>S. auricularis</i>	Unacceptable profile		
Σαλάμι 7 Ντελημάρη Λευκάδος	Ντελ T1	<i>S. simulans</i>	Good	96,5	0,4
	Ντελ T2	<i>S. hominis</i> 2	Good identification to the genus	65,8	0,34
		<i>S. epidremidis</i> 1		21,8	0,29
		<i>S. epidremidis</i> 2		8,6	0,3
	Ντελ T3	<i>S. hominis</i> 1 <i>S. warneri</i>	Good identification to the genus	58,6 36,8	0,28 0,32
	Ντελ T4	<i>S. warneri</i>	Good	99,9	0,46
	Ντελ T5	<i>S. warneri</i>	Unacceptable profile		
	Ντελ T6	<i>S. saprophyticus</i>	Unacceptable profile		
Σαλάμι 8 Βίκη Παραδοσιακό	Βίκη T1	<i>S. simulans</i>	Good	97,8	0,51
	Βίκη T2	<i>S. xylosus</i>	Excellent	99,9	0,89
	Βίκη T3	<i>S. cohnii</i>	Good	99,4	0,47
	Βίκη T4	<i>S. simulans</i>	Very good	99,9	0,68
	Βίκη T5	<i>S. warneri</i>	Good	99,9	0,47
Σαλάμι 9 Θράκη Λευκάδος	Θράκη T1	<i>S. carnosus</i>	Good	99,9	0,45

* % id: Ποσοστό ταυτοποίησης - an estimate of how closely the profile corresponds to the taxon relative to all the other taxa in the database. ** T: The T index - an estimate of how closely the profile corresponds to the most typical set of reactions for each taxon.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ **ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ**

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά των στελεχών εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 13 της μεθεπόμενης σελίδας. Όλα τα εξεταζόμενα στελέχη ήσαν ευαίσθητα στην αμπικιλίνη, εκτός από ένα (*E. gallinarum* το οποίο απομονώθηκε από το σαλάμι 8). Το 33% των στελεχών που απομονώθηκαν ήταν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη, ενώ ίδιο ήταν το ποσοστό ανθεκτικότητας και για τη βασιτρακίνη. Υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για την τετρακυκλίνη, με το 81% των στελεχών να είναι ανθεκτικά απέναντι στο αντιβιοτικό αυτό. Το 52.4% των στελεχών παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη, το 19% στη στρεπτομυκίνη, ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στη γενταμυκίνη. Σε ό,τι αφορά τις φθοριοκινολόνες, υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για τη σιπροφλοξασίνη (62%), την οφλοξασίνη (47.6%) και τη νορφλοξασίνη (47.6%), ενώ το ποσοστό ανθεκτικότητας για τη νιτροφουραντοΐνη ανήλθε στο 71.4%. Τέλος, το 47.6% των στελεχών εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στη ριφαμυκίνη.

Κανένα εξεταζόμενο στέλεχος δεν ήταν ανθεκτικό σε όλα τα αντιβιοτικά, ωστόσο παρατηρήθηκαν πολλαπλές ανθεκτικότητες. Συγκεκριμένα, το 33.3% των στελεχών εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε 3 έως 5 αντιβιοτικά, ενώ περίπου τα μισά στελέχη εντερόκοκκων (47,6%) ήταν ανθεκτικά απέναντι σε 6 έως 9 αντιβιοτικά. Από τα στελέχη αυτά που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα απέναντι σε 6 έως 9 αντιβιοτικά τα μισά προέρχονταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης και τα άλλα μισά απομονώθηκαν από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Συγκεκριμένα, από το σαλάμι φυσικής ωρίμανσης Ιώβ Μαλακάσης τα στελέχη με κωδικούς Ιώβ T1 και Ιώβ T3 (*E. faecalis* και στις δύο περιπτώσεις) εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε οκτώ διαφορετικά αντιβιοτικά αντίστοιχα, ενώ το στέλεχος με κωδικό Δαγ T1 που απομονώθηκε από το σαλάμι Δαγρέ Τριπόλεως (*E. hirae*) ήταν ανθεκτικό απέναντι σε έξι διαφορετικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένης και της βανκομυκίνης. Από το σαλάμι Ντελημάρη Λευκάδος, τα στελέχη με κωδικούς Ντελ T1 και Ντελ T2 (*E. gallinarum* & *E. hirae*) εμφάνιζαν ανθεκτικότητα απέναντι σε επτά και έξι διαφορετικά αντιβιοτικά, αντίστοιχα.

Αναφορικά με τα σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης, το στέλεχος με κωδικό Κρέτα T1 που απομονώθηκε από το σαλάμι Κρέτα Φαρμ (*E. hirae/casseliflavus*) ήταν ανθεκτικό σε έξι διαφορετικά αντιβιοτικά, όπως και το στέλεχος με κωδικό Νικ T1 (*E. casseliflavus*) που απομονώθηκε από το σαλάμι Νίκας Λευκάδος. Από το σαλάμι Βίκη Παραδοσιακό, το στέλεχος με κωδικό Βίκη T3 (*E. faecium 1*) παρουσίαζε ανθεκτικότητα σε οκτώ διαφορετικά αντιβιοτικά, ενώ από το σαλάμι Θράκη Λευκάδος τα στελέχη με κωδικούς Θράκη T2 και Θράκη T3 (*E. faecalis* & *E. gallinarum*) ήταν ανθεκτικά σε οκτώ και εννιά διαφορετικά αντιβιοτικά αντίστοιχα.

Αξίζει να αναφέρουμε ότι από το σύνολο των στελεχών εντερόκοκκων που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη (33%), το 43% των στελεχών αυτών προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 57% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα της δοκιμασίας ανθεκτικότητας σε 12 επιλεγμένα αντιβιοτικά των στελεχών του γένους *Enterococcus* που απομονώθηκαν από τα σάλαμια αέρος .

Σαλάμια αέρος	Κωδικός στελέχους	Στέλεχος	Ampicillin (10μg)	Vancomycin (30μg)	Bacitracin (10μg)	Tetracycline (30μg)	Erythromycin (15μg)	Streptomycin 300 (μg)	Gentamycin (120μg)	Ciprofloxacin (5μg)	Rifampicin (5μg)	Ofloxacin (5μg)	Norfloxacin (10μg)	Nitrofurantoin (300μg)
Σαλάμι 1 Ιωβ Μαλακίστης Λευκάδος	Ιώβ T1	<i>E. faecalis</i>	S*	R	R	R	R	R	S	R	I	I	R	R
	Ιώβ T2	<i>E. hirae</i>	S	S	I	S	I	S	S	R	R	I	I	R
	Ιώβ T3	<i>E. faecalis</i>	S	I	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R
	Ιώβ T4	<i>E. hirae</i>	S	I	S	R	I	S	S	I	R	I	I	R
Σαλάμι 2 Πολυγρονόπουλου Λευκάδος	Πολ T1	<i>E. faecalis</i>	S	R	I	S	I	S	S	R	R	R	R	I
Σαλάμι 3 Δαγρέ Τριπόλεως	Δαγ T1	<i>E. hirae</i>	S	R	S	R	S	S	S	R	I	R	R	R
Σαλάμι 4 Κρέτα Φαρμ Λευκάδος	Κρέτα T1	<i>E. hirae/casseliflavus</i>	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R
Σαλάμι 5 Νίκας Λευκάδος	Νικ T1	<i>E. casseliflavus</i>	S	R	S	R	S	S	S	R	I	R	R	R
	Νικ T2	<i>E. faecalis</i>	S	I	I	R	I	S	S	R	R	R	I	I
Σαλάμι 6 Ντελημάρη Λευκάδος	Ντελ T1	<i>E. gallinarum</i>	S	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R
	Ντελ T2	<i>E. hirae</i>	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	I	R
	Ντελ T3	<i>E. hirae</i>	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S
	Ντελ T4	<i>E. hirae</i>	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S
Σαλάμι 7 Βίκη Παραδοσιακό	Βίκη T1	<i>E. hirae</i>	S	S	R	R	I	I	S	I	S	I	I	R
	Βίκη T2	<i>E. hirae</i>	S	S	S	R	I	S	S	I	I	I	I	R
	Βίκη T3	<i>E. faecium 1</i>	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
	Βίκη T4	<i>E. hirae</i>	S	S	R	R	R	S	S	I	R	I	I	R
Σαλάμι 8 Θράκη Λευκάδος	Θράκη T1	<i>E. faecalis</i>	S	R	I	S	R	S	S	I	R	I	I	S
	Θράκη T2	<i>E. faecalis</i>	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R
	Θράκη T3	<i>E. gallinarum</i>	R	S	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R
	Θράκη T4	<i>E. hirae</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I
* S: ευαίσθητο στέλεχος I: ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στέλεχος R: ανθεκτικό στέλεχος														

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ **ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ** **ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 14 της μεθεπόμενης σελίδας. Κανένα στέλεχος δεν παρουσίαζε ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και στη χλωραμφενικόλη, ενώ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για τη βανκομυκίνη (90%), τη βασιτρακίνη (66.7%), την αμικασίνη (93.3%), την καναμυκίνη (86.7%) και τη σιπροφλοξασίνη (90%). Το 10% των στελεχών που απομονώθηκαν ήταν ανθεκτικά στην αμοξικιλίνη / κλαβουλανικό οξύ, ενώ ίδιο ήταν το ποσοστό ανθεκτικότητας για την ερυθρομυκίνη και για τη ριφαμυκίνη. Μόνο ένα στέλεχος ήταν ανθεκτικό στην κεφαλοθίνη (*L. plantarum* 1 το οποίο απομονώθηκε από το σαλάμι 6), ενώ το ποσοστό ανθεκτικότητας για την τετρακυκλίνη ανήλθε στο 36.7%.

Όλα τα στελέχη εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον 2 αντιβιοτικά. Πιο συγκεκριμένα, το 56.7% των στελεχών ήταν ανθεκτικά σε 3 έως 5 αντιβιοτικά, ενώ το 33.3% των εξεταζόμενων στελεχών παρουσίαζαν ανθεκτικότητα απέναντι σε 6 έως 8 αντιβιοτικά. Από τα οξυγαλακτικά αυτά στελέχη που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε 6 έως 8 αντιβιοτικά, το 30% προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 70% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Πιο συγκεκριμένα, από το σαλάμι φυσικής ωρίμανσης Στρεμμένου Ευρυτανίας το στέλεχος με κωδικό Στρεμ T2 (*Pediococcus pentosaceus* 1) ήταν ανθεκτικό απέναντι σε έξι διαφορετικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανόμενης και της τετρακυκλίνης. Από το σαλάμι Ντελημάρη Λευκάδος, τα στελέχη με κωδικούς Ντελ T4 και Ντελ T5 (*Lb. plantarum/brevis* & *Pediococcus pentosaceus* 1) εμφάνιζαν ανθεκτικότητα απέναντι σε επτά διαφορετικά αντιβιοτικά, αντίστοιχα (συμπεριλαμβανόμενης της τετρακυκλίνης).

Σε ό,τι αφορά τα σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης, από το σαλάμι Ιφαντής Λευκάδος τα στελέχη με κωδικούς ΙφΛε T1 και ΙφΛε T4 (*Pediococcus pentosaceus* 2

και στις δύο περιπτώσεις) ήταν ανθεκτικά σε οκτώ και επτά διαφορετικά αντιβιοτικά αντίστοιχα (συμπεριλαμβανόμενης της τετρακυκλίνης). Τα στελέχη με κωδικούς Κρέτα T1 και Κρέτα T2 (*Lb. plantarum* 1 & *Pediococcus pentosaceus* 2), που απομονώθηκαν από το σαλάμι Κρέτα Φαρμ, ήταν ανθεκτικά απέναντι σε επτά και έξι διαφορετικά αντιβιοτικά αντίστοιχα, ενώ τα στελέχη με κωδικούς Νικ T1 και Νικ T2 από το σαλάμι Νίκας Λευκάδος (*Pediococcus pentosaceus* 2 & *Lb. plantarum* 1/*rhamnosus*) εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε έξι διαφορετικά αντιβιοτικά αντίστοιχα. Από το σαλάμι Θράκη Λευκάδος, το στέλεχος με κωδικό Θράκη T2 (*Pediococcus spp.*) παρουσίαζε ανθεκτικότητα σε έξι διαφορετικά αντιβιοτικά.

Από το σύνολο των οξυγαλακτικών στελεχών που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη (36.7%), το 45.5% των στελεχών αυτών προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 54.5% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα της δοκιμασίας ανθεκτικότητας σε 12 επιλεγμένα αντιβιοτικά των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από τα σιλάμια αέρος.

Σιλάμια αέρος	Κωδικός στελέχους	Στέλεχος	Ampicillin (10μg)	Amoxicillin / Clavulanic acid (30μg)	Cefalothin (30μg)	Vancomycin (30μg)	Bacitracin (10μg)	Amikacin (30μg)	Kanamycin (30μg)	Chloramphenicol (30μg)	Tetracycline (30μg)	Erythromycin (15μg)	Ciprofloxacin (5μg)	Rifampicin (5μg)
Σιλάμι 1 Ιοβ Μαλακάσσης Λευκάδος	Ιώβ T1'	<i>Lb. brevis 3</i>	S*	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S
	Ιώβ T1	<i>Lb. plantarum 1</i>	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
	Ιώβ T2	<i>Lb. plantarum 1</i>	S	S	S	R	R	R	R	S	I	S	R	S
	Ιώβ T3	<i>Pedococcus spp.</i>	S	S	S	R	R	R	I	S	S	S	R	S
	Ιώβ T4	<i>Lb. paracasei / paracasei 1</i>	S	S	I	I	R	R	R	I	R	R	I	I
Σιλάμι 2 Πολυχρονόπουλου Λευκάδος	Πολ T1	<i>Lb. acidophilus 1</i>	S	S	S	R	R	I	R	S	S	S	R	S
Σιλάμι 3 Ιφαντής Λευκάδος	ΙφΛε T1	<i>Pedococcus pentosaceus 2</i>	S	R	I	R	R	R	R	I	R	I	R	R
	ΙφΛε T2	<i>Lb. plantarum 1</i>	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
	ΙφΛε T3	<i>Leuconostoc mes.mes/dext.2</i>	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S
	ΙφΛε T4	<i>Pedococcus pentosaceus 2</i>	S	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R	I
Σιλάμι 4 Δαγρέ Τριπόλεως	Δαγ T1	<i>Pedococcus pentosaceus 2</i>	S	S	S	R	R	R	R	S	I	S	R	S
Σιλάμι 5 Στρεμμένου Ευρητανίας	Στρεμ T1	<i>Lc. lactis lactis 1</i> <i>Leuconostoc mes.mes/dext.2</i> <i>Lb. fermentum</i>	S	S	S	I	I	R	R	S	S	S	R	S
	Στρεμ T2	<i>Pedococcus pentosaceus 1</i>	S	I	S	R	R	R	R	I	R	S	R	S
	Στρεμ T3	<i>Pedococcus pentosaceus 1</i>	S	I	S	R	I	R	R	S	I	S	R	S
Σιλάμι 6 Κρέτα Φαρμ Λευκάδος	Κρέτα T1	<i>Lb. plantarum 1</i>	S	S	R	R	R	R	R	S	R	I	R	I
	Κρέτα T2	<i>Pedococcus pentosaceus 2</i>	S	I	S	R	R	R	R	S	R	S	R	I
	Κρέτα T3	<i>Lb. paracasei / paracasei 3</i>	S	S	S	R	R	R	R	S	I	S	R	S
Σιλάμι 7 Νίκας Λευκάδος	Νικ T1	<i>Pedococcus pentosaceus 2</i>	S	S	S	R	R	R	R	S	R	I	R	I
	Νικ T2	<i>Lb. plantarum 1</i> <i>Lb. rhamnosus</i>	S	S	S	R	R	R	R	I	R	S	R	I
Σιλάμι 8 Ντελημάρη Λευκάδος	Ντελ T1	<i>Pedococcus pentosaceus 2</i>	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
	Ντελ T2	<i>Lb. plantarum 1</i>	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S
	Ντελ T3	<i>Lb. fermentum</i>	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	R	S
	Ντελ T4	<i>Lb. plantarum 1</i> <i>Lb. brevis 1</i>	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S
	Ντελ T5	<i>Pedococcus pentosaceus 1</i>	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	I
Σιλάμι 9 Βίκη Παραδοσιακό	Βίκη T1	<i>Lb. coprophilus</i>	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R
	Βίκη T2	<i>Lb. paracasei / paracasei 1</i>	S	S	S	R	I	R	R	S	S	S	I	R
Σιλάμι 10 Θράκη Λευκάδος	Θράκη T1	<i>Lb. plantarum 1</i>	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
	Θράκη T2	<i>Pedococcus spp.</i>	S	S	I	R	R	R	R	I	S	R	R	S

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ **ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ**

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά των στελεχών σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 15 της μεθεπόμενης σελίδας. Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην κεφαλοθίνη. Στην περίπτωση της καναμυκίνης και της ριφαμπικίνης δεν προέκυψαν ανθεκτικά στελέχη, με εξαίρεση ένα μόνο στέλεχος (*S. simulans*), το οποίο απομονώθηκε από το σαλάμι 7 (φυσικής ωρίμανσης) και παρουσίαζε ανθεκτικότητα και στα δύο αυτά αντιβιοτικά, αντίστοιχα. Όλα τα εξεταζόμενα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην αμοξικιλίνη / κλαβουλανικό οξύ, εκτός από ένα (*S. xylosus* το οποίο απομονώθηκε από το σαλάμι 8). Το 54.2% των στελεχών παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, το 50% στη μεθικιλίνη, το 50% στη βανκομυκίνη, ενώ ένα μόνο στέλεχος ήταν ανθεκτικό στη χλωραμφενικόλη (*S. xylosus* το οποίο απομονώθηκε από το σαλάμι 8). Υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για την τετρακυκλίνη, με το 70.8% των στελεχών να είναι ανθεκτικά απέναντι στο αντιβιοτικό αυτό. Το 25% των εξεταζόμενων στελεχών εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη, το 20.8% στην κλινδαμυκίνη, ενώ και στην περίπτωση της νιτροφουραντοίνης το ποσοστό ανθεκτικότητας ανήλθε στο 20.8%. Να σημειώσουμε ότι στην περίπτωση της κλινδαμυκίνης, τα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στο αντιβιοτικό αυτό απομονώθηκαν όλα από το σαλάμι 8 (με καλλιέργειες εκκίνησης).

Και στην περίπτωση των σταφυλόκοκκων παρατηρήθηκαν πολλαπλές ανθεκτικότητες. Συγκεκριμένα, το 66.7% των στελεχών ήταν ανθεκτικά σε 2 έως 4 αντιβιοτικά, ενώ το 20.8% των εξεταζόμενων στελεχών παρουσίαζαν ανθεκτικότητα απέναντι σε 5 έως 7 αντιβιοτικά. Από τα στελέχη αυτά των σταφυλόκοκκων που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα απέναντι σε 5 έως 7 αντιβιοτικά, το 40% προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 60% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Πιο συγκεκριμένα, από το σαλάμι φυσικής ωρίμανσης Στρεμμένου Ευρυτανίας το στέλεχος με κωδικό Στρεμ T1 (*S. saprophyticus*) ήταν ανθεκτικό απέναντι σε πέντε διαφορετικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων της

μεθικιλίνης και της βανκομυκίνης. Το στέλεχος με κωδικό Ντελ T1 που απομονώθηκε από το σαλάμι Ντελημάρη Λευκάδος (*S. simulans*) ήταν ανθεκτικό σε πέντε διαφορετικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανόμενης της βανκομυκίνης.

Σε ό,τι αφορά τα σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης, από το σαλάμι Βίκη Παραδοσιακό τα στελέχη με κωδικούς Βίκη T1, Βίκη T2 και Βίκη T5 (*S. simulans*, *S. xylosus* & *S. warneri*) ήταν ανθεκτικά σε πέντε, επτά και έξι διαφορετικά αντιβιοτικά αντίστοιχα.

Αξίζει να σημειώσουμε ότι από το σύνολο των στελεχών σταφυλόκοκκων που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη (50%), το 66.7% των στελεχών αυτών προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 33.3% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τη βανκομυκίνη, με το 66.7% των στελεχών σταφυλόκοκκων που ήταν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη να προέρχονται από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα της δοκιμασίας ανθεκτικότητας σε 12 επιλεγμένα αντιβιοτικά των στελεχών του γένους *Staphylococcus* που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος.

Σαλάμια αέρος	Κωδικός στελεχούς	Στέλεχος	Ampicillin (10μg)	Amoxicillin / Clavulanic acid (30μg)	Methicillin (5μg)	Cefalothin (30μg)	Vancomycin (30μg)	Kanamycin (30μg)	Chloramphenicol (30μg)	Tetracycline (30μg)	Erythromycin (15μg)	Clindamycin (2μg)	Nitrofurantoin (300μg)	Rifampicin (5μg)
Σαλάμι 1 Ιώβ Μαλακάσας Λευκάδος	Ιώβ T1	<i>S. saprophyticus</i>	S*	S	R	S	R	S	I	R	I	S	I	I
	Ιώβ T2	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i>	R	S	R	S	R	S	I	R	I	I	I	I
Σαλάμι 2 Ιφάντης Λευκάδος	ΙφΛε T1	<i>S. carnosus</i>	S	S	S	S	S	I	I	I	I	I	I	I
Σαλάμι 3 Δαγρέ Τριπόλεως	Δαγ T1	<i>S. carnosus</i>	S	S	S	S	S	I	I	I	I	I	I	I
Σαλάμι 4 Στρεμμένου Ευρητανίας	Στρεμ T1	<i>S. saprophyticus</i>	R	S	R	S	R	I	I	R	R	I	I	I
	Στρεμ T2	<i>S. xylosus</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S
	Στρεμ T3	<i>S. xylosus</i>	R	S	R	S	R	I	I	R	I	I	I	S
	Στρεμ T4	<i>S. xylosus</i>	S	S	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S
Σαλάμι 5 Κρέτα Φαρμ Λευκάδος	Κρέτα T1	<i>S. cohnii cohnii</i> <i>S. capitis</i>	R	S	R	S	S	S	I	I	I	S	S	S
Σαλάμι 6 Νίκας Λευκάδος	Νικ T1	<i>S. auricularis</i>	R	S	R	S	S	S	I	I	I	I	S	S
Σαλάμι 7 Ντελημάρη Λευκάδος	Ντελ T1	<i>S. simulans</i>	S	S	S	S	R	R	I	R	I	I	R	R
	Ντελ T2	<i>S. hominis</i> 2 <i>S. epidermidis</i> 1 <i>S. epidermidis</i> 2	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
	Ντελ T3	<i>S. hominis</i> 1 <i>S. warneri</i>	R	S	S	S	S	S	I	R	R	I	S	S
	Ντελ T4	<i>S. warneri</i>	R	S	S	S	S	S	I	R	I	S	S	S
	Ντελ T5	<i>S. warneri</i>	R	S	S	S	S	S	I	R	R	I	S	S
	Ντελ T6	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	R	S	R	S	I	R	I	S	S	S

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ

Τα αποτελέσματα της μικροβιακής ανάλυσης έδειξαν ότι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα των σαλαμιών αέρος, αποτέλεσμα το οποίο έχει διαπιστωθεί και σε άλλες έρευνες που εξέτασαν τη μικροχλωρίδα διάφορων σαλαμιών αέρος [11, 39, 40, 90]. Συγκεκριμένα, στην έρευνα των Samelis και συν (1998) μελετήθηκε η μικροχλωρίδα τεσσάρων ελληνικών σαλαμιών αέρος φυσικής ωρίμανσης. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκαν από $7,78 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $8,23 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [11]. Στη μελέτη των Drosinos και συν (2005), όπου μελετήθηκαν τρία ελληνικά σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης, οι πληθυσμοί των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος κυμάνθηκαν από $7,43 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $8,31 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [39]. Σύμφωνα με μια πολύ πρόσφατη μελέτη των Drosinos και συν (2007) στην οποία εξετάστηκε η μικροχλωρίδα δύο σαλαμιών αέρος φυσικής ωρίμανσης προερχόμενα από την περιοχή της νότιας Ελλάδας, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκε από $8,12 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $8,45 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [40]. Τέλος, στην έρευνα των Comi και συν (2005), όπου μελετήθηκε ένα παραδοσιακό σαλάμι αέρος από μια περιοχή της βορειοανατολικής Ιταλίας (Friuli Venezia Giulia region), ο πληθυσμός των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος ανήλθε σε $5,77 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [90]. Στη δική μας μελέτη οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκαν από $5,63 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $7,49 \log \text{ cfu g}^{-1}$, τιμές οι οποίες είναι συγκρίσιμες με αυτές που αναφέρονται στις παραπάνω έρευνες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, ο πληθυσμός της ολικής αερόβιας μικροχλωρίδας κυμάνθηκε από $3,67 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $6,43 \log \text{ cfu g}^{-1}$. Σύμφωνα με την έρευνα των Samelis και συν (1998), ο πληθυσμός της ολικής αερόβιας μικροχλωρίδας κυμάνθηκε από $8 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $8,17 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [11], ενώ στη μελέτη των Drosinos και συν (2005) ο αντίστοιχος πληθυσμός κυμάνθηκε από $6,48 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $8,58 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [39], τιμές οι οποίες είναι υψηλότερες σε σχέση με αυτές που προέκυψαν από τη δική μας έρευνα.

Οι τιμές για τους πληθυσμούς των σταφυλόκοκκων, των εντερόκοκκων, των ζυμών και των αερόβιων σπορογόνων βακτηρίων που προέκυψαν από τη δική μας έρευνα

είναι παρόμοιες και συγκρίσιμες με αυτές που έχουν προκύψει από τις αντίστοιχες έρευνες σε ελληνικά σαλάμια αέρος [11, 39, 40]. Σε ό,τι αφορά τους σταφυλόκοκκους, στη μελέτη των Drosinos και συν (2005) οι πληθυσμοί των σταφυλόκοκκων κυμάνθηκαν από $1,7 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $4,5 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [39], ενώ στην πιο πρόσφατη μελέτη των Drosinos και συν (2007) οι αντίστοιχοι πληθυσμοί ανήλθαν σε $5,23 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [40]. Στη μελέτη των Samelis και συν (1998), ο πληθυσμός των σταφυλόκοκκων κυμάνθηκε από $4,15 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $5,89 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [11]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τη δική μας μελέτη, στην οποία οι πληθυσμοί των σταφυλόκοκκων κυμάνθηκαν από $2,85 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $6,01 \log \text{ cfu g}^{-1}$. Για τους εντερόκοκκους, οι Samelis και συν (1998) αναφέρουν πληθυσμούς που κυμαίνονται από $4,69 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $5,17 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [11], ενώ σύμφωνα με τους Drosinos και συν (2005) οι πληθυσμοί των εντερόκοκκων κυμαίνονται από $4,50 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $5,61 \log \text{ cfu g}^{-1}$ [39]. Στην έρευνά μας, οι πληθυσμοί των εντερόκοκκων κυμάνθηκαν από $1,83 \log \text{ cfu g}^{-1}$ έως $6,78 \log \text{ cfu g}^{-1}$, ευρήματα που συμφωνούν με αυτά των προαναφερθέντων μελετών.

Σε κανένα από τα εξεταζόμενα σαλάμια που απασχόλησαν τη μελέτη δεν ανιχνεύτηκαν εντεροβακτήρια-*E.coli*, κλοστρίδια, ψευδομονάδες ή παθογόνοι σταφυλόκοκκοι. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία για τα ζυμωμένα κρέατα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους και σε ό,τι αφορά το τελικό προϊόν (< 10 κλοστρίδια ανά γραμμάριο, < 10 ψευδομονάδες ανά γραμμάριο, $< 10^3$ παθογόνοι σταφυλόκοκκοι ανά γραμμάριο, ενώ δεν αναφέρονται τιμές για τα εντεροβακτήρια).

Σε αντίθεση με τις ζύμες οι οποίες ανιχνεύτηκαν μόλις σε δύο από τα δέκα σαλάμια που απασχόλησαν τη μελέτη, οι εντερόκοκκοι ανιχνεύτηκαν σε οκτώ από τα δέκα σαλάμια, και μάλιστα στις περισσότερες περιπτώσεις σε αυξημένους πληθυσμούς. Η βιβλιογραφία δείχνει ότι οι εντερόκοκκοι πράγματι αναπτύσσονται καλά στα ζυμωμένα αλλαντικά, ωστόσο υπάρχει διχογνωμία σε ό,τι αφορά το ρόλο των μικροοργανισμών αυτών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του προϊόντος [11]. Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι εντερόκοκκοι βελτιώνουν τη γεύση και το άρωμα των σαλαμιών μέσω των πρωτεολυτικών τους δράσεων, ωστόσο κάποιοι άλλοι θεωρούν ότι οι εντερόκοκκοι μπορούν να μειώσουν την ασφάλεια του προϊόντος, στην

περίπτωση που αναπτυχθούν ευκαιριακά παθογόνα στελέχη [91]. Σταφυλόκοκκοι ανιχνεύτηκαν στην πλειοψηφία των σαλαμιών της μελέτης σε αυξημένους πληθυσμούς, γεγονός το οποίο είναι σύμφωνο με τις αναφορές της βιβλιογραφίας σχετικά με την υψηλή παρουσία των μικροοργανισμών αυτών στα σαλάμια αέρος [11, 47-50].

Η απουσία κλοστριδίων, ψευδομονάδων, εντεροβακτηρίων και παθογόνων σταφυλόκοκκων επιβεβαιώνει την ισχυρή ανταγωνιστική δράση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, τα οποία κυριαρχούν και στην ωρίμανση του κρέατος. Τα βακτήρια αυτά, λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος και της συνακόλουθης μείωσης του pH απαγορεύουν τον πολλαπλασιασμό των προαναφερθέντων παθογόνων μικροοργανισμών [40].

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ

Ο *E. hirae* αποτέλεσε το κυρίαρχο είδος εντερόκοκκου των σαλαμιών αέρος που απασχόλησαν τη συγκεκριμένη μελέτη, ενώ ακολούθησαν τα είδη *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. faecium* 1 και *E. casseliflavus*. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με μια πρόσφατη έρευνα των Peters και συν (2003), στην οποία ο *E. faecalis* αναφέρεται ως το κυρίαρχο είδος εντερόκοκκου σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης της Γερμανίας (συμπεριλαμβανομένων και σαλαμιών αέρος) [60]. Σε μια άλλη μελέτη των Martin και συν (2005) ο *E. faecium* αναφέρεται ως το συνηθέστερο είδος εντερόκοκκου που απομονώθηκε από ισπανικά σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης (chorizo & fuet) [61]. Ωστόσο, θα πρέπει να τονίσουμε ότι οι παραπάνω έρευνες αναφέρονται σε ισπανικά και γερμανικά σαλάμια αέρος, ενώ δεν υπάρχουν άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα που να αναφέρονται στην ταυτοποίηση στελεχών εντερόκοκκων από ελληνικά σαλάμια αέρος.

Η μόλυνση του κρέατος από τη γαστρεντερική οδό των τεμαχισμένων ζώων, αλλά και από τον άνθρωπο πιθανότατα εξηγεί την παρουσία των διάφορων ειδών εντερόκοκκων σε 8 από τα 10 σαλάμια αέρος που απασχόλησαν τη μελέτη. Ο *E.*

faecalis, ο *E. faecium* και ο *E. hirae* αποτελούν είδη εντερόκοκκων που απομονώνονται συχνότερα από τη γαστρεντερική οδό των χοίρων, αλλά και από τη γαστρεντερική οδό του ανθρώπου [55]. Ο *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* και ο *E. mundtii* απομονώνονται σπάνια από τη γαστρεντερική οδό ανθρώπων και ζώων. Οι συνηθέστερες πηγές τους είναι το χώμα, τα φυτά ή τα επιφανειακά ύδατα [61].

Οι καλλιέργειες εκκίνησης είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη διασφάλιση της σταθερότητας και ασφάλειας των σαλαμιών αέρος. Η χρήση τους έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των χρόνων ωρίμανσης, και την αναστολή της ανάπτυξης μη επιθυμητών μικροοργανισμών [11, 40]. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τους Samelis και συν (1998), τα παραδοσιακά σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης θεωρούνται ανώτερης ποιότητας σε σχέση με αυτά που παρασκευάζονται με τη χρήση καλλιιεργειών εκκίνησης, ένα φαινόμενο το οποίο αποδίδεται στην ιδιαίτερη σύνθεση-βιοποικιλότητα και μεταβολική δράση της ενδογενούς μικροχλωρίδας [11]. Οι καλλιέργειες εκκίνησης που διατίθενται στο εμπόριο και παράγονται κυρίως σε χώρες της βόρειας Ευρώπης φαίνεται ότι δεν ανταγωνίζονται ισχυρά την ενδογενή μικροχλωρίδα των σαλαμιών αέρος, και μάλιστα η χρήση τους συχνά έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, οι οποίες φυσιολογικά απαντώνται στα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης [37].

Στην έρευνά μας δεν παρατηρήσαμε ουσιαστικές διαφορές ως προς τη βιοποικιλότητα των εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης σε σχέση με τα σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Για παράδειγμα, από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης Ιώβ Μαλακάσης Λευκάδος και Ντελημάρη Λευκάδος απομονώθηκαν τέσσερα διαφορετικά στελέχη εντερόκοκκων αντίστοιχα, όσα απομονώθηκαν και από τα σαλάμια με χρήση καλλιιεργειών εκκίνησης Θράκη Λευκάδος και Βίκη Παραδοσιακό. Επίσης, από το σαλάμι φυσικής ωρίμανσης Πολυχρονόπουλου Λευκάδος απομονώθηκε ένα στέλεχος εντερόκοκκου, ομοίως με το σαλάμι Κρέτα Φαρμ, το οποίο παρασκευάζεται με χρήση καλλιιεργειών εκκίνησης. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ούτε ως προς τα είδη των εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από τις δύο κατηγορίες σαλαμιών αέρος. Για παράδειγμα, το είδος *E. hirae* απομονώθηκε τόσο από το σαλάμι αέρος Ιώβ Μαλακάσης (φυσικής ωρίμανσης), όσο και από το σαλάμι Βίκη Παραδοσιακό (με χρήση καλλιιεργειών

εκκίνησης). Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τα είδη *E. faecalis* και *E. gallinarum*, τα οποία απομονώθηκαν τόσο από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης όσο και από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Πρέπει να αναφέρουμε ότι στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν έρευνες, οι οποίες να αναφέρονται στη βιοποικιλότητα των εντερόκοκκων που απομονώνονται από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης σε σχέση με σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Στη συγκεκριμένη έρευνα, η πλειοψηφία των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος άνηκε στο γένος *Lactobacillus* (57% των στελεχών), ενώ υψηλή ήταν και η παρουσία των βακτηρίων του γένους *Pediococcus* (37% των στελεχών). Προηγούμενες έρευνες στις οποίες πραγματοποιήθηκε απομόνωση και ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος από σαλάμια αέρος έδειξαν ότι πράγματι οι λακτοβάκιλλοι αποτελούν την πλειοψηφία των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται από τέτοιου είδους προϊόντα [34, 37]. Το 2001, ο Parente E. και οι συνεργάτες του μελέτησαν διάφορα σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης προερχόμενα από τη Νότια Ιταλία (*salsiccia*, *soppressata*, *salame Milano*, *salame Napoli*). Από το σύνολο των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν, το 57% άνηκε στο γένος *Lactobacillus*, ενώ το 22% άνηκε στο γένος *Pediococcus* (κυρίως *P. pentosaceus*), αποτελέσματα που συμφωνούν με αυτά της δικής μας μελέτης [34]. Στην έρευνα των Samelis και συν (1994), στην οποία απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος από 5 σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης προερχόμενα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, οι λακτοβάκιλλοι αποτέλεσαν το 62% επί του συνόλου των οξυγαλακτικών βακτηρίων [37]. Σε κάποιες άλλες έρευνες οι λακτοβάκιλλοι κυριάρχησαν των υπολοίπων βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και απομονώθηκαν σε ακόμα υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τα προαναφερθέντα [11, 38, 39, 90]. Για παράδειγμα, στην έρευνα των Paramanolι και συν (2003), στην οποία μελετήθηκαν 2 σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης προερχόμενα από την περιοχή της Ξάνθης, οι λακτοβάκιλλοι αποτέλεσαν το 90% των οξυγαλακτικών βακτηρίων που

απομονώθηκαν. Στην μελέτη των Drosinos και συν (2005), όπου μελετήθηκαν 3 ελληνικά σαλάμια αέρος χωρίς προσθήκη καλλιεργειών εκκίνησης, το 88.6% των οξυγαλακτικών βακτηρίων άνηκε στο γένος *Lactobacillus* [39], ενώ στη μελέτη των Comi και συν (2005), οι λακτοβάκιλλοι αποτέλεσαν το 88% των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από ένα παραδοσιακό σαλάμι αέρος της Ιταλίας [90].

Στην έρευνά μας το 37% των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων άνηκαν στο γένος *Pediococcus*, ποσοστό το οποίο είναι συγκρίσιμο με αυτό που αναφέρεται στην έρευνα των Parente και συν (2001), σύμφωνα με την οποία το 22% των οξυγαλακτικών στελεχών άνηκαν στο γένος *Pediococcus* [34]. Στην έρευνα αυτή, η πλειοψηφία των στελεχών που άνηκαν στο γένος *Pediococcus* ταυτοποιήθηκαν ως *Pediococcus pentosaceus*, αποτέλεσμα το οποίο προέκυψε και από τη δική μας μελέτη. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα βακτήρια του γένους *Pediococcus* απομονώνονται σποραδικά από τα σαλάμια αέρος και σε αρκετά χαμηλότερα ποσοστά σε σχέση με τα προαναφερθέντα (3% έως 8,5% των στελεχών) [30,38].

Στην έρευνά μας, ένα μόνο στέλεχος των οξυγαλακτικών βακτηρίων άνηκε στο γένος *Leuconostoc*, εύρημα το οποίο είναι σύμφωνο με αρκετές μελέτες στις οποίες αναφέρεται ότι τα βακτήρια του γένους *Leuconostoc* απομονώνονται σποραδικά από τα σαλάμια αέρος [37-39,90].

Σε ό,τι αφορά τα είδη των λακτοβάκιλλων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος που απασχόλησαν τη μελέτη, η πλειοψηφία τους ταυτοποιήθηκε ως *Lb. plantarum*, εύρημα το οποίο διαπιστώθηκε και στην έρευνα των Drosinos και συν (2005), όπου, ομοίως με τη δική μας έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν βιοχημικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από ελληνικά σαλάμια αέρος [39]. Το αξιοσημείωτο είναι ότι στην έρευνά μας κανένα στέλεχος λακτοβάκιλλων δεν ταυτοποιήθηκε είτε ως *Lb. curvatus* είτε ως *Lb. sakei*, είδη λακτοβάκιλλων τα οποία, μαζί με τον *Lb. plantarum*, απαντώνται περισσότερο συχνά στα σαλάμια αέρος είτε φυσικής ωρίμανσης είτε με τη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης και παίζουν κυρίαρχο ρόλο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των προϊόντων

αυτών [4, 27]. Μάλιστα, σύμφωνα με ευρήματα ερευνών που μελέτησαν ελληνικά σαλάμια αέρος, τα κυρίαρχα είδη λακτοβάκιλλων που απαντώνται στα ελληνικά σαλάμια αέρος είναι τα *Lb. curvatus* και *Lb. sakei*, και ακολουθεί ο *Lb. plantarum* [11, 37, 38]. Στις έρευνες αυτές η ταυτοποίηση των λακτοβάκιλλων έγινε με βιοχημικές μεθόδους, ομοίως με τη δική μας. Στην έρευνα των Aymerich και συν (2006), με χρήση της μοριακής τεχνικής RAPD-PCR, ταυτοποιήθηκαν οι λακτοβάκιλλοι από 10 διαφορετικά σαλάμια αέρος της Ισπανίας (είτε φυσικής ωρίμανσης είτε με τη χρήση αρχικών καλλιιεργειών). Ο *Lb. sakei*, ο *Lb. curvatus* και ο *Lb. plantarum* αποτελούσαν τα κυρίαρχα στελέχη λακτοβάκιλλων, ενώ σύμφωνα με τους ερευνητές η χρήση μοριακών μεθόδων επιτρέπει μια πιο βελτιωμένη ταυτοποίηση των εξεταζόμενων στελεχών σε σχέση με τη χρήση βιοχημικών μεθόδων [31]. Επομένως, η χρήση μοριακών μεθόδων ενδεχομένως να έδινε και στη δική μας μελέτη περισσότερες πληροφορίες και μια πιο ακριβή ταυτοποίηση των εξεταζόμενων στελεχών, κάτι που ισχύει και για τις προαναφερθείσες έρευνες στις οποίες η ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών στελεχών έγινε μέσω βιοχημικών μεθόδων.

Σχετικά με τα υπόλοιπα είδη λακτοβάκιλλων που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη μας (*Lb. paracasei* / *paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* / *rhamnosus*) η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί και σε άλλες αντίστοιχες έρευνες με σαλάμια αέρος [27, 28, 39], με εξαίρεση τα είδη *Lb. acidophilus* και *Lb. coprophilus*, τα οποία δεν έχουν απομονωθεί σε καμία αντίστοιχη έρευνα με σαλάμια αέρος. Σε ό,τι αφορά τον *Lb. acidophilus*, ο μικροοργανισμός αυτός απομονώνεται συνήθως από τη γαστρεντερική οδό ζώων και ανθρώπων, από τη στοματική κοιλότητα του ανθρώπου και από τον κόλπο [93], ενώ έχει απομονωθεί από τρόφιμα όπως το μη παστεριωμένο γάλα, το τυρί Camembert και το γιαούρτι [13]. Άρα, τα βιβλιογραφικά αυτά δεδομένα δικαιολογούν την παρουσία του λακτοβάκιλλου αυτού και στα σαλάμια αέρος. Σχετικά με τον *Lb. coprophilus*, ο λακτοβάκιλλος αυτός έχει απομονωθεί από τη γαστρεντερική οδό των ζώων και η παρουσία του έχει διαπιστωθεί στο μη παστεριωμένο γάλα, ωστόσο δεν έχει απομονωθεί από κάποιο ζυμωμένο τρόφιμο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [94].

Σε ό,τι αφορά τη βιοποικιλότητα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης σε σχέση με τα σαλάμια με

καλλιέργειες εκκίνησης έχουμε να παρατηρήσουμε τα εξής: από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης Ιωβ Μαλακάσης Λευκάδος και Ντελημάρη Λευκάδος απομονώθηκαν πέντε διαφορετικά στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος αντίστοιχα, ενώ κι από τα πέντε σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης απομονώθηκαν μέχρι τέσσερα διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επομένως, τα σαλάμια Ιωβ Μαλακάσης Λευκάδος και Ντελημάρη Λευκάδος παρουσίασαν μεγαλύτερη βιοποικιλότητα σε σχέση με τα σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Αντιθέτως, από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης Πολυχρονόπουλου Λευκάδος και Δαγρέ Τριπόλεως απομονώθηκε ένα μόνο οξυγαλακτικό στέλεχος αντίστοιχα, άρα τα σαλάμια αυτά παρουσίασαν μικρή βιοποικιλότητα σε σχέση με τα σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Το σαλάμι φυσικής ωρίμανσης Στρεμμένου Ευρυτανίας παρουσίασε περίπου την ίδια βιοποικιλότητα σε σχέση με τα σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Επιπλέον, δεν παρατηρήσαμε ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στις δύο κατηγορίες σαλαμιών ως προς τα είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν. Για παράδειγμα, τα είδη *Pediococcus pentosaceus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* και *Lb. paracasei* / *paracasei* απομονώθηκαν τόσο από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης όσο και από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν έρευνες που να συγκρίνουν τη βιοποικιλότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης σε σχέση με τα σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης, με εξαίρεση την έρευνα των Aymerich και συν (2006), στην οποία μελετήθηκαν σαλάμια φυσικής ωρίμανσης και σαλάμια με χρήση καλλιεργειών εκκίνησης από διάφορες περιοχές της Ισπανίας. Στην έρευνα αυτή δεν διαπιστώθηκαν διαφορές ως προς τη βιοποικιλότητα των οξυγαλακτικών στελεχών που απομονώθηκαν από τις δύο κατηγορίες των σαλαμιών αέρος [31].

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ

Ο *S. saprophyticus* αποτέλεσε το κυρίαρχο είδος των σαλαμιών αέρος (21% των στελεχών), ενώ ακολούθησαν οι *S. xylosus* (17% των στελεχών), *S. carnosus* (12,5%) και *S. simulans* (12,5%). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αντίστοιχες έρευνες στις οποίες αναφέρεται ότι ο *S. saprophyticus* και ο *S. xylosus* είναι τα κυρίαρχα είδη σταφυλόκοκκων που απομονώνονται από τα ελληνικά

σαλάμια αέρος [12,39,40]. Συγκεκριμένα, στην έρευνα των Drosinos και συν (2005), όπου μελετήθηκε η μικροχλωρίδα τριών ελληνικών σαλαμιών αέρος φυσικής ωρίμανσης, ο *S. saprophyticus* ήταν το κυρίαρχο είδος (31.1%), και ακολουθούσαν οι *S. xylosus* (19.2%) και *S. simulans* (11.4%) [39]. Στη μελέτη των Papamanoli και συν (2002), στην οποία μελετήθηκαν δύο ελληνικά σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης, ο *S. saprophyticus* αποτελούσε το 27.6% των στελεχών, ο *S. carnosus* το 25.8%, και ο *S. xylosus* το 5.2% των στελεχών [12]. Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη των Drosinos και συν (2007), όπου εξετάστηκε η μικροχλωρίδα δύο ελληνικών σαλαμιών αέρος φυσικής ωρίμανσης, ο *S. saprophyticus* αποτελούσε το 50.3% των στελεχών σταφυλόκοκκων, ο *S. simulans* το 15.3%, και ο *S. xylosus* το 12.6% των στελεχών [40]. Σχετικά με τα υπόλοιπα είδη σταφυλόκοκκων που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη μας (*S. warneri*, *S. cohnii*, *S. auricularis*, *S. cohnii cohnii / capitis*, *S. hominis / epidremitidis*, *S. hominis / warneri*) η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί σε όλες τις προαναφερθείσες έρευνες [12, 39, 40]. Ο *S. xylosus* είναι το κυρίαρχο είδος σταφυλόκοκκου σε πολλά σαλάμια αέρος της Ιταλίας [44-48], και στο Ισπανικό 'chorizo' [49,50]. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Mauriello και συν (2000), όπου μελετήθηκαν ιταλικά σαλάμια αέρος (Naples-type Salami), ο *S. xylosus* αποτελούσε το 71.4% των στελεχών σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν [44]. Στην έρευνα των Martin και συν (2005), η οποία αφορούσε ισπανικά σαλάμια αέρος, ο *S. xylosus* αποτελούσε το κυρίαρχο είδος σταφυλόκοκκου, αποτελώντας το 80.8% των στελεχών [50].

Σχετικά με την προέλευση των σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος, τα είδη *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidremitidis*, *S. cohnii*, *S. capitis* και *S. simulans* απομονώνονται κυρίως από δέρμα του ανθρώπου, αλλά και από το δέρμα ζώων της κτηνοτροφίας. Ως εκ τούτου, τα προαναφερθέντα στελέχη πιθανότατα προέρχονται από το δέρμα των χοίρων ή από τους ανθρώπινους χειρισμούς του κρέατος κατά τη διάρκεια της παρασκευής των σαλαμιών αέρος [39]. Τα είδη *S. xylosus* και *S. carnosus* απομονώνονται σχεδόν αποκλειστικά από ζυμωμένα αλλαντικά [12]. Λόγω της ιδιότητάς τους να βελτιώνουν το άρωμα των προϊόντων και να περιορίζουν την όξινη γεύση τους, χρησιμοποιούνται συχνά στις καλλιέργειες εκκίνησης προκειμένου να επιτευχθεί η παραγωγή σαλαμιών αέρος με ιδιαίτερα ευχάριστο άρωμα [12].

Σε ό,τι αφορά τη βιοποικιλότητα των στελεχών σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης σε σχέση με τα σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης διαπιστώσαμε τα εξής: από τα σαλάμια με χρήση καλλιεργειών εκκίνησης Ιφαντής Λευκάδος, Κρέτα Φαρμ Λευκάδος, Νίκας Λευκάδος και Θράκη Λευκάδος απομονώθηκε ένα μόνο είδος σταφυλόκοκκου αντίστοιχα, εύρημα το οποίο σχετίζεται πιθανότατα με τη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης. Μάλιστα, στην περίπτωση των σαλαμιών Ιφαντής Λευκάδος και Θράκη Λευκάδος το είδος σταφυλόκοκκου που απομονώθηκε ήταν ο *S. carnosus*, ο οποίος, όπως προαναφέραμε χρησιμοποιείται συχνά στις καλλιέργειες εκκίνησης. Από τα σαλάμια φυσικής ωρίμανσης Στρεμμένου Ευρυτανίας και Ντελημάρη Λευκάδος απομονώθηκαν τέσσερα και οκτώ διαφορετικά στελέχη σταφυλόκοκκων αντίστοιχα, επομένως τα σαλάμια αυτά παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη βιοποικιλότητα σε σχέση με τα σαλάμια με χρήση καλλιεργειών εκκίνησης που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Αντιθέτως, το σαλάμι φυσικής ωρίμανσης Δαγρέ Τριπόλεως παρουσίασε χαμηλή βιοποικιλότητα, αφού απομονώθηκε από αυτό ένα μόνο στέλεχος σταφυλόκοκκου. Το μοναδικό σαλάμι με χρήση καλλιεργειών εκκίνησης το οποίο παρουσίασε υψηλή βιοποικιλότητα ήταν το Βίκη Παραδοσιακό από το οποίο απομονώθηκαν πέντε διαφορετικά στελέχη σταφυλόκοκκων, που άνηκαν και τα πέντε σε διαφορετικά είδη. Ομοίως με τους εντερόκοκκους, στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν έρευνες, οι οποίες να αναφέρονται στη βιοποικιλότητα των σταφυλόκοκκων που απομονώνονται από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης σε σχέση με σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ **ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ** **ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

Οι β-λακτάμες (κυρίως αμπικιλίνη και αμοξικιλίνη) σε συνδυασμό με τις αμινογλυκοσίδες (κυρίως γενταμικίνη) αποτελούν τους αντιμικροβιακούς παράγοντες επιλογής για τη θεραπεία εντεροκοκκικών λοιμώξεων στην κλινική πράξη. Τα γλυκοπεπτίδια βανκομυκίνη και τεϊχοπλανίνη αποτελούν τη μοναδική θεραπευτική λύση σε περίπτωση ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες και στις αμινογλυκοσίδες ή αλλεργίας στις β-λακτάμες [60].

Ένα ‘ευχάριστο’ αποτέλεσμα της συγκεκριμένης έρευνας είναι ότι δεν απομονώθηκαν στελέχη εντερόκοκκων ανθεκτικά στην αμπικιλίνη εκτός από ένα μόνο, ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στη γενταμυκίνη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αυτά που αναφέρονται στην έρευνα των Peters και συν. (2003), σύμφωνα με την οποία όλα τα στελέχη εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από τρόφιμα ζωικής προέλευσης της Γερμανίας (συμπεριλαμβανομένων και των σαλαμιών αέρος) ήταν ευαίσθητα στην αμπικιλίνη και τη γενταμυκίνη [60]. Στη μελέτη των Martin και συν. (2005), στην οποία μελετήθηκαν ισπανικά σαλάμια αέρος (chorizo & fuet), δεν απομονώθηκαν στελέχη ανθεκτικά στη γενταμυκίνη, ωστόσο το 27.4% των στελεχών εντερόκοκκων εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, εύρημα το οποίο κρίθηκε ανησυχητικό από τους συγκεκριμένους ερευνητές [61].

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το 33% των στελεχών εντερόκοκκων εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, εύρημα το οποίο κρίνεται ιδιαίτερα ανησυχητικό από κλινικής άποψης, λόγω του σημαντικού ρόλου που κατέχει το γλυκοπεπτίδιο αυτό στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από πολλαπλά ανθεκτικούς εντερόκοκκους, όπως έχουμε προαναφέρει. Η ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων στη βανκομυκίνη είναι επίκτητη και συνίσταται στην απόκτηση πλασμιδίων και μεταθετών στοιχείων από βακτήρια ‘δωρητές’. Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται μέσω των γονιδίων ανθεκτικότητας Van, τα οποία κωδικοποιούν τροποποιημένες πρωτεΐνες πρόσδεσης, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα πρόσδεσης της βανκομυκίνης στις πρωτεΐνες αυτές [53]. Στη μελέτη των Peters και συν (2003) όλα τα στελέχη εντερόκοκκων ήταν ευαίσθητα στη βανκομυκίνη, ενώ στη μελέτη των Martin και συν (2005), το 7.5% των στελεχών παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό [60,61]. Πάντως, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, εντερόκοκκοι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη, έχουν απομονωθεί από ζώα της κτηνοτροφίας, νωπό κρέας, επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος, γαλακτοκομικά προϊόντα (νωπό και ζυμωμένο γάλα-διάφορα είδη τυριών) και ζυμωμένα αλλαντικά (κυρίως σαλάμια αέρος) [9,52].

Στην έρευνά μας, υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας διαπιστώθηκαν για την τετρακυκλίνη (81%), την ερυθρομυκίνη (52.4%) και τη ριφαμπικίνη (47.6%), αντιβιοτικά στα οποία οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν επίκτητη ανθεκτικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκρίσιμα με αυτά που αναφέρονται στην έρευνα των Martin και συν (2005), σύμφωνα με την οποία τα ποσοστά ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη και ριφαμπικίνη ανήλθαν στο 47.2%, 50.9% και 80.2%, αντίστοιχα [61].

Το 19% των στελεχών που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος ήταν ανθεκτικά στη στρεπτομυκίνη. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η απομόνωση εντερόκοκκων ανθεκτικών στη στρεπτομυκίνη από σαλάμια αέρος και άλλα ζυμωμένα αλλαντικά [53]. Σε ό,τι αφορά τη βασιτρακίνη, το 33% των στελεχών εμφάνιζαν ανθεκτικότητα απέναντι σε αυτό το αντιβιοτικό. Δεν υπάρχουν άλλες αντίστοιχες έρευνες στη βιβλιογραφία στις οποίες να χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό αυτό στη δοκιμασία ευαισθησίας των εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από σαλάμια αέρος. Ωστόσο, εντερόκοκκοι ανθεκτικοί στη βασιτρακίνη έχουν απομονωθεί από νωπό κοτόπουλο και νωπό μοσχάρι στην Ελβετία σε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά (99% των στελεχών που απομονώθηκαν) [95].

Οι εντερόκοκκοι εμφανίζουν επίκτητη ανθεκτικότητα στις φθοριοκινολόνες, η οποία συνίσταται στην απόκτηση πλασμιδίων και μεταθετών στοιχείων. Τα αντιβιοτικά αυτά στοχεύουν στην DNA γυράση (τοποϊσομεράση II) και στην τοποϊσομεράση IV, ένζυμα που είναι απαραίτητα για την αντιγραφή και μεταγραφή του βακτηριακού DNA. Η ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων στις φθοριοκινολόνες προκύπτει είτε από τροποποίηση των ενζύμων της DNA γυράσης και τοποϊσομεράσης IV, είτε από αυξημένη απομάκρυνση του αντιβιοτικού μέσω πρωτεϊνικών αντλιών [85]. Στην έρευνά μας τα ποσοστά ανθεκτικότητας των στελεχών εντερόκοκκων στις φθοριοκινολόνες κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα: 62% για τη σιπροφλοξασίνη, 47.6% για την οφλοξασίνη, 47,6% για τη νορφλοξασίνη και 71.4 % για τη νιτροφουραντοΐνη. Στην έρευνα των Martin και συν (2005), τα ποσοστά ανθεκτικότητας των εντερόκοκκων για τη σιπροφλοξασίνη και τη νιτροφουραντοΐνη ανήλθαν στο 52.8% και 50.9% αντίστοιχα, αποτελέσματα που συμφωνούν με αυτά της δικής μας έρευνας [61].

Προκειμένου να κριθεί ένα στέλεχος κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικό ή στις καλλιέργειες εκκίνησης είναι απαραίτητο να διασφαλιστεί ότι το στέλεχος αυτό δεν διαθέτει μεταθετά γονίδια ανθεκτικότητας. Η παρουσία μεταθετών γονιδίων ανθεκτικότητας σε στελέχη που χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες εκκίνησης είναι ιδιαίτερα ανησυχητική, καθώς είναι δυνατή η μεταφορά τους στον άνθρωπο αλλά και σε παθογόνα βακτήρια [32]. Στην έρευνά μας, πέρα από την ανθεκτικότητα που εμφάνισαν τα στελέχη εντερόκοκκων φυσικού τύπου (wild strains) που απομονώθηκαν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για τα στελέχη εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι από το σύνολο των στελεχών εντερόκοκκων που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη (33%), το 43% των στελεχών αυτών προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 57% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε για τη σιπροφλοξασίνη και τις υπόλοιπες φθοριοκινολόνες, δηλαδή περίπου τα μισά στελέχη εντερόκοκκων που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στα εν λόγω αντιβιοτικά προέρχονταν από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Συγκεκριμένα για τη σιπροφλοξασίνη, από το σύνολο των στελεχών εντερόκοκκων που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό (62%), το 53.8% των στελεχών αυτών προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 46.2% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε για την τετρακυκλίνη, την ερυθρομυκίνη και τη ριφαμπικίνη.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, οι εντερόκοκκοι που απομονώνονται από ζώα της κτηνοτροφίας και το νωπό κρέας τους συχνά παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε κλινικά σημαντικά αντιβιοτικά, όπως οι β-λακτάμες, οι κεφαλοσπορίνες, η βανκομυκίνη, η στρεπτομυκίνη, η ερυθρομυκίνη, οι φθοριοκινολόνες, η χλωραμφενικόλη, η τετρακυκλίνη, η νεομυκίνη, οι σουλφοναμίδες, η ριφαμπικίνη και η κλινδαμυκίνη [95-97]. Η παρουσία ανθεκτικών εντερόκοκκων έχει διαπιστωθεί και σε άλλα ζυμωμένα τρόφιμα εκτός από σαλάμια αέρος, όπως σε διάφορα είδη τυριών και στο γιαούρτι [95]. Στην έρευνα των Citak και συν (2004) ελέγχθηκε η ευαισθησία σε αντιβιοτικά των στελεχών εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από τούρκικο λευκό τυρί. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής

έδειξαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας για την στρεπτομυκίνη, ερυθρομυκίνη, οξακυλλίνη και τη βανκομυκίνη [98]. Σε μια έρευνα με 53 σκληρά, ημίσκληρα και μαλακά ευρωπαϊκά τυριά παρασκευασμένα από νωπό μη παστεριωμένο γάλα, τα στελέχη εντερόκοκκων που απομονώθηκαν εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη, ερυθρομυκίνη, γενταμυκίνη, τετρακυκλίνη, βανκομυκίνη και ριφαμυκίνη [95].

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Πολλοί λακτοβάκιλλοι, καθώς και τα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pediococcus* και *Leuconostoc* παρουσιάζουν μια εγγενή (φυσική) ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, ιδιότητα η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των βακτηρίων αυτών από άλλους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς [77]. Μεταξύ των λακτοβάκιλλων που εμφανίζουν εγγενή ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη αναφέρονται τα είδη *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. reuteri*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. coryneformis*, *Lb. brevis* και *Lb. fermentum* [99], ενώ ευαίσθητα στη βανκομυκίνη θεωρούνται τα είδη *Lb. delbrueckii*, *Lb. crispatus* και η ομάδα *Lb. acidophilus* [100]. Στην έρευνα μας, το 90% των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, αποτέλεσμα το οποίο είναι σύμφωνο με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που μόλις αναφέραμε.

Υψηλή εγγενής ανθεκτικότητα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (κυρίως *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc*) έχει αναφερθεί για τη βασιτρακίνη, τη σιπροφλοξασίνη, την καναμυκίνη και την αμικασίνη [76, 78]. Πράγματι, στην έρευνά μας τα ποσοστά ανθεκτικότητας των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα προαναφερθέντα αντιβιοτικά κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα: 66.7% για τη βασιτρακίνη, 90% για τη σιπροφλοξασίνη, 93.3 % για την αμικασίνη και 86.7% για την καναμυκίνη.

Η επίκτητη ανθεκτικότητα που εμφανίζουν κάποια στελέχη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος στην τετρακυκλίνη, την ερυθρομυκίνη και τη χλωραμφενικόλη αποτελεί θέμα ανησυχίας, καθώς τα γονίδια ανθεκτικότητας για τα αντιβιοτικά αυτά εντοπίζονται πάνω σε πλασμίδια, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η μεταφορά τους με αρκετά υψηλή συχνότητα και σε άλλα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, αλλά και σε παθογόνα βακτήρια [76, 81, 82]. R-πλασμίδια που κωδικοποιούν γονίδια ανθεκτικότητας για την τετρακυκλίνη (*tet genes*), την ερυθρομυκίνη (*erm genes*) και τη χλωραμφενικόλη (*cat genes*) έχουν αναφερθεί για τον *L. reuteri*, τον *L. fermentum*, τον *L. acidophilus* και τον *L. plantarum* (οι απομονώσεις των λακτοβάκιλλων αυτών έγιναν από νωπό κρέας και κόπρανα) [76]. Οι Gevers και συν (2003) εξέτασαν την ικανότητα 14 στελεχών λακτοβάκιλλων, που είχαν απομονωθεί από σαλάμια αέρος, να μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη σε άλλους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς μέσω βακτηριακής σύζευξης. Εφτά από τα 14 ανθεκτικά στελέχη λακτοβάκιλλων ήταν ικανά να μεταφέρουν την ανθεκτικότητά τους σε στελέχη του *E. faecalis* με αρκετά υψηλή συχνότητα. Δύο από τα 14 στελέχη των λακτοβάκιλλων μπορούσαν επίσης να μεταφέρουν την ανθεκτικότητά τους σε στελέχη του *Lc. lactis subsp. lactis*, ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταφορά γονιδίων μέσω βακτηριακής σύζευξης στον *S. aureus* [82]. Στην έρευνά μας, παρατηρήθηκαν σχετικά υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας για την τετρακυκλίνη, με το 36.7% των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων να είναι ανθεκτικά απέναντι στο αντιβιοτικό αυτό. Στην έρευνα των Aymerich και συν. (2006), στην οποία ελέγχθηκε η ευαισθησία σε επιλεγμένα αντιβιοτικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από ισπανικά σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης (chorizo, fuet & salchichon), το ποσοστό των στελεχών που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη ήταν χαμηλότερο, και ανήλθε μόλις στο 12% [32]. Επίσης, βρήκαμε ότι το 10% των εξεταζόμενων στελεχών παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη, σε αντίθεση με τη μελέτη των Aymerich και συν (2006), στην οποία όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στο αντιβιοτικό αυτό [32]. Ένα ‘ευχάριστο’ αποτέλεσμα της έρευνας μας είναι ότι δεν απομονώθηκαν στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων ανθεκτικά στη χλωραμφενικόλη. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με αυτό που αναφέρεται στην έρευνα των Aymerich και συν (2006), σύμφωνα με την οποία το ποσοστό ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη ανήλθε μόλις στο 1.2% [32].

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι όλα τα στελέχη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος ήταν ευαίσθητα στην αμπικιλίνη. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με αυτό που αναφέρεται στη μελέτη των Aymerich και συν (2006), σύμφωνα με την οποία το ποσοστό ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη ήταν υψηλό και ανήλθε στο 43.6% [32]. Σύμφωνα με τους προαναφερθέντες ερευνητές, τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην αμπικιλίνη που προέκυψαν από την έρευνά τους, αποδίδονται στην εκτεταμένη χρήση της αμπικιλίνης και άλλων πενικιλινών στην ισπανική κτηνοτροφία [32].

Για την αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ και τη ριφαμπικίνη το ποσοστό της ανθεκτικότητας των εξεταζόμενων στελεχών ανήλθε στο 10% αντίστοιχα, ενώ ένα μόνο στέλεχος εμφάνιζε ανθεκτικότητα στην κεφαλοθίνη. Ωστόσο, δεν υπάρχουν άλλες αντίστοιχες έρευνες στη βιβλιογραφία στις οποίες να χρησιμοποιήθηκαν τα τρία αυτά αντιβιοτικά στη δοκιμασία ευαισθησίας των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν από σαλάμια αέρος.

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται η απομόνωση ανθεκτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων από διάφορα ζυμωμένα τρόφιμα, αν και τα βιβλιογραφικά δεδομένα πάνω σε σαλάμια αέρος είναι ελάχιστα [76]. Ανθεκτικά στελέχη του *Lb. plantarum* στην τετρακυκλίνη έχουν απομονωθεί από αρκετά μαλακά τυριά της Ελβετίας (G. Dasen, ETH Zurich, unpublished) [95]. Στην έρευνα των Herero και συν (1996), η οποία αφορούσε παραδοσιακά τυριά της Ισπανίας (Serena, Gamonedo, Cabrales), απομονώθηκαν λακτοβάκιλλοι (*Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*) ανθεκτικοί στην πενικιλίνη G, την κλοξακιλίνη, τη στρεπτομυκίνη, τη γενταμυκίνη, την τετρακυκλίνη, την ερυθρομυκίνη και τη χλωραμφενικόλη [101]. Στη μελέτη των Temmerman και συν (2002), η οποία αφορούσε 55 ευρωπαϊκά προβιοτικά προϊόντα, απομονώθηκαν 187 στελέχη λακτοβάκιλλων (*L. acidophilus*, *L. ramnosus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. delbreukii* spp. *bulgaricus*), τα οποία παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη (79% των στελεχών), τη βανκομυκίνη (65%), την τετρακυκλίνη (26%), την πενικιλίνη G (23%), την ερυθρομυκίνη (16%) και τη χλωραμφενικόλη (11%) [102].

Σε ό,τι αφορά την ανθεκτικότητα που εμφάνισαν τα οξυγαλακτικά στελέχη φυσικού τύπου (wild strains) που απομονώθηκαν από σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης σε σχέση με την ανθεκτικότητα που παρουσίασαν τα στελέχη που απομονώθηκαν από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης έχουμε να παρατηρήσουμε τα εξής: από το σύνολο των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη (36.7%), το 45.5% των στελεχών αυτών προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 54.5% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης είναι ιδιαίτερα ανησυχητικά και πλέον τίθεται θέμα ασφάλειας των καλλιεργειών εκκίνησης που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ελληνικών σαλαμιών αέρος και άλλων ζυμωμένων προϊόντων, καθώς ανάλογο φαινόμενο με αυτό των οξυγαλακτικών βακτηρίων για την τετρακυκλίνη διαπιστώθηκε και στην περίπτωση των εντερόκοκκων για τη βανκομυκίνη, τις φθοριοκινολόνες, την τετρακυκλίνη, την ερυθρομυκίνη και τη ριφαμπικίνη. Όπως θα δούμε παρακάτω, και για τους σταφυλόκοκκους διαπιστώθηκαν παρόμοια αποτελέσματα (δηλ. υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας των στελεχών που απομονώθηκαν από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης). Σχετικά με την ερυθρομυκίνη, από το σύνολο των ανθεκτικών οξυγαλακτικών στελεχών (3 συνολικά), ένα μόνο προερχόταν από σαλάμι με καλλιέργειες εκκίνησης.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ **ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ** **ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

Στους σταφυλόκοκκους, τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα διάφορα αντιβιοτικά εντοπίζονται κυρίως πάνω σε πλασμίδια, επομένως οι σταφυλόκοκκοι εμφανίζουν επίκτητη ανθεκτικότητα απέναντι στις διάφορες κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων. Οι μηχανισμοί επίκτητης ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων για τις διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών έχουν περιγραφεί αναλυτικά στο κεφάλαιο της εισαγωγής.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ευαισθησίας των σταφυλόκοκκων σε επιλεγμένα αντιβιοτικά έδειξαν ότι το 54.2% των στελεχών που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος ήταν ανθεκτικά στην αμικικιλίνη. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων που απομονώνονται από σαλάμια αέρος στο αντιβιοτικό αυτό, πιθανότατα λόγω της εκτεταμένης χρήσης του στην κτηνοτροφία. Συγκεκριμένα, στην έρευνα των Martin και συν. (2005), όπου απομονώθηκαν 240 στελέχη σταφυλόκοκκων από σαλάμια αέρος φυσικής ωρίμανσης της Ισπανίας (fuet, chorizo, salchichon) και εν συνεχεία ελέγχθηκε η ευαισθησία τους απέναντι σε επιλεγμένα αντιβιοτικά, τα ποσοστά ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη ανήλθαν στο 73.8% [50]. Στη μελέτη των Mauriello και συν (2000), στην οποία μελετήθηκαν παραδοσιακά σαλάμια αέρος της Ιταλίας (Naples-type salami), απομονώθηκαν 42 στελέχη σταφυλόκοκκων, εκ των οποίων το 88.1% παρουσίαζε ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη [44].

Η μεθικιλίνη είναι ένα ημισυνθετικό αντιβιοτικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε αρχικά στις αρχές της δεκαετίας του 1960 για την αντιμετώπιση των ενδονοσοκομιακών στελεχών του *S. aureus*, που παρήγαγαν β-λακταμάση. Ωστόσο, γρήγορα αναπτύχθηκε ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη, και στις μέρες μας η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στο αντιβιοτικό αυτό (συμπεριλαμβανομένων των *S. aureus* & coagulase-negative staphylococci, CoNS) αποτελεί σύνηθες φαινόμενο στην κλινική πράξη [83]. Σε ό,τι αφορά τα σαλάμια αέρος, από την έρευνά μας διαπιστώσαμε υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων στη μεθικιλίνη (50% των στελεχών). Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με την προαναφερθείσα έρευνα των Mauriello και συν (2000), στην οποία όλα τα στελέχη σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος ήταν ευαίσθητα στη μεθικιλίνη [44]. Στη μελέτη των Martin και συν. (2005), στην οποία αναφερθήκαμε προηγουμένως, το ποσοστό ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων στη μεθικιλίνη ανήλθε στο 4.6% [50]. Στην έρευνα των Gardini και συν. (2003), απομονώθηκαν 140 στελέχη σταφυλόκοκκων από τρεις τύπους σαλαμιών αέρος φυσικής ωρίμανσης της Ιταλίας και ελέγχθηκε η ευαισθησία των στελεχών αυτών σε επιλεγμένα αντιβιοτικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας το 8.6% των στελεχών σταφυλόκοκκων παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη [86]. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν άλλες αντίστοιχες έρευνες οι οποίες να εξετάζουν την ανθεκτικότητα στη

μεθικιλίνη των σταφυλόκοκκων που απομονώνονται από σαλάμια αέρος ή από άλλα ζυμωμένα τρόφιμα, ενώ είναι περιορισμένος και ο αριθμός των μελετών που εξετάζουν την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη των σταφυλόκοκκων που απομονώνονται από νωπό κρέας. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι στην έρευνα των Kawano και συν (1996), το 25% των στελεχών σταφυλόκοκκων (coagulase-negative staphylococci, CoNS) που απομονώθηκαν από νωπό κρέας κοτόπουλου παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη [103]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι περισσότερες έρευνες που εξετάζουν την ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (*S. aureus* & coagulase-negative staphylococci, CoNS) αφορούν κυρίως στελέχη τα οποία απομονώνονται από λοιμώξεις του ανθρώπου ή των ζώων της κτηνοτροφίας, και από κλινικούς χώρους γενικότερα. Πάντως, όπως έχουμε προαναφέρει, ο επιπολασμός της ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων στη μεθικιλίνη στην κλινική πράξη είναι υψηλός [83].

Η ανθεκτικότητα των σταφυλόκοκκων στη βανκομυκίνη είναι ιδιαίτερα ανησυχητική, καθώς το γλυκοπεπτίδιο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων από ανθεκτικούς σταφυλόκοκκους στη μεθικιλίνη [85]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο *S. aureus* είναι γενικά ευαίσθητος στη βανκομυκίνη, ενώ είναι εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο η απομόνωση ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών του *S. aureus*, που να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και στη βανκομυκίνη [85]. Σε ό,τι αφορά τους αρνητικούς στην αγλουτινάση σταφυλόκοκκους (coagulase-negative staphylococci, CoNS) κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η ανθεκτικότητά τους στη βανκομυκίνη παραμένει σε πολύ χαμηλά επίπεδα (<0.5% στην Ευρώπη) [85], ωστόσο κάποιοι άλλοι θεωρούν ότι παρουσιάζει συνεχώς αυξητικές τάσεις [44, 104]. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το 50% των στελεχών σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν από τα σαλάμια αέρος εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, ενώ τα μισά από αυτά τα στελέχη παρουσίαζαν ανθεκτικότητα και στη μεθικιλίνη. Σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα, στις έρευνες των Martin και συν (2005) και των Mauriello και συν. (2000) δεν απομονώθηκαν σταφυλόκοκκοι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη από τα σαλάμια αέρος που μελετήθηκαν [44, 50]. Στην έρευνα των Gardini και συν. (2003), το 5% των στελεχών σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, και επιπλέον τα στελέχη αυτά ήταν ανθεκτικά και στη μεθικιλίνη [86].

Παρατηρήσαμε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων στην τετρακυκλίνη (70.8% των στελεχών). Στη μελέτη των Martin και συν. (2005), το ποσοστό ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων στην τετρακυκλίνη ανήλθε στο 33.8% [50], ενώ στην έρευνα των Mauriello και συν (2000) το αντίστοιχο ποσοστό ανήλθε στο 21.4% [44].

Στην έρευνά μας, τα ποσοστά ανθεκτικότητας για την αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, την καναμυκίνη, τη χλωραμφενικόλη και τη ριφαμπικίνη κυμάνθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα (μέχρι 3.3% των στελεχών), ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην κεφαλοθίνη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αυτά που αναφέρονται στις έρευνες των Martin και συν (2005). και των Mauriello και συν (2000). για τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά [44, 50].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το 25% των εξεταζόμενων στελεχών εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη, το 20.8% στην κλινδαμυκίνη, ενώ και στην περίπτωση της νιτροφουραντοΐνης το ποσοστό ανθεκτικότητας ανήλθε στο 20.8%. Οι έρευνες των Mauriello και συν (2000) και των Martin και συν. (2005) αναφέρουν υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας για την ερυθρομυκίνη (40.8% και 56.7% αντίστοιχα), παρόμοια ποσοστά ανθεκτικότητας για την κλινδαμυκίνη (15% και 33.2% αντίστοιχα), και αρκετά χαμηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας για τη νιτροφουραντοΐνη (μέχρι 4.6%) [44, 50].

Σύμφωνα με τους Werckenthin και συν (2001) τα επίπεδα ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες παρουσιάζουν τεράστιες διακυμάνσεις και εξαρτώνται από την προέλευση των εξεταζόμενων στελεχών (λοιμώξεις του ανθρώπου, ζώα της κτηνοτροφίας, τρόφιμα), το είδος του σταφυλόκοκκου, αλλά και από τον μηχανισμό ανθεκτικότητας που αναπτύσσει το εκάστοτε στέλεχος. Οι ίδιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι είναι πολύ δύσκολη-αν όχι αδύνατη-η ασφαλής σύγκριση των διάφορων βιβλιογραφικών δεδομένων που αναφέρονται στο θέμα της ανθεκτικότητας των σταφυλόκοκκων, λόγω της ανομοιομορφίας των μεθόδων που εφαρμόζονται στις διάφορες έρευνες, λόγω των

διαφορετικών κριτηρίων που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και λόγω έλλειψης, πολλές φορές, πληροφοριών σχετικά με την προέλευση ή την επιδημιολογική συσχέτιση των εξεταζόμενων στελεχών [106].

Ομοίως με τους εντερόκοκκους και τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν για τα στελέχη των σταφυλόκοκκων που απομονώθηκαν από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Σχετικά με τη μεθικιλίνη, από το σύνολο των στελεχών σταφυλόκοκκων που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό (50%), το 66.7% των στελεχών αυτών προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 33.3% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης, ενώ ακριβώς τα ίδια ποσοστά διαπιστώθηκαν και για τη βανκομυκίνη. Επιπλέον, είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι όλα τα στελέχη που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην κλινδαμυκίνη προέρχονταν από το σαλάμι Βίκη Παραδοδιακό, το οποίο παρασκευάζεται με χρήση καλλιεργειών εκκίνησης. Σε ό,τι αφορά την τετρακυκλίνη, από το σύνολο των στελεχών σταφυλόκοκκων που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό (70.8%), το 76.5% των στελεχών αυτών προερχόταν από σαλάμια φυσικής ωρίμανσης, ενώ το 23.5% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Σχετικά με τη νιτροφουραντοΐνη, από το σύνολο των στελεχών που ήταν ανθεκτικά στο αντιβιοτικό αυτό (20.8%), το 80% προερχόταν από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης, ενώ από τα στελέχη που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη (25%), το 42.9% απομονώθηκε από σαλάμια με καλλιέργειες εκκίνησης. Όπως έχουμε προαναφέρει, η παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας σε στελέχη που χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες εκκίνησης ενέχει σοβαρούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία λόγω της πιθανής μεταφοράς των γονιδίων αυτών στον άνθρωπο και σε παθογόνα βακτήρια. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να ελέγχεται διεξοδικά η ευαισθησία των στελεχών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης, ιδιαίτερα απέναντι σε αντιβιοτικά που είναι σημαντικά στην κλινική πράξη όπως η μεθικιλίνη, η βανκομυκίνη, η γενταμυκίνη, κ.α.

Ως συμπέρασμα, η μικροβιακή ανάλυση σαλαμιών αέρος της ελληνικής αγοράς φανέρωσε μια πλούσια μικροχλωρίδα των προϊόντων αυτών (είτε φυσικής ωρίμανσης είτε με τη χρήση καλλιιεργειών εκκίνησης). Το ενδιαφέρον μας εστιάστηκε στην απομόνωση και ταυτοποίηση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, των εντερόκοκκων και των σταφυλόκοκκων. Οι λακτοβάκιλλοι αποτέλεσαν την πλειοψηφία των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ενώ υψηλή ήταν και η παρουσία των πεδίοκοκκων. Ο *E. hirae* αποτέλεσε το κυρίαρχο είδος εντερόκοκκου, ενώ παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλία στα διαφορετικά είδη σταφυλόκοκκων, με επικρατέστερους τους *S. saprophyticus*, *S. xylosus* και *S. simulans*. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ευαισθησίας των στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, των εντερόκοκκων και των σταφυλόκοκκων ήταν μάλλον ανησυχητικά. Παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας των εντερόκοκκων στη βανκομυκίνη, των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην τετρακυκλίνη και των σταφυλόκοκκων στη μεθικιλίνη και στη βανκομυκίνη, αντιβιοτικά τα οποία έχουν ιδιαίτερη σημασία στην κλινική πράξη. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη πολλών ερευνητών σύμφωνα με την οποία τα σαλάμια αέρος μπορούν να αποτελέσουν ένα ιδανικό περιβάλλον για τη μεταφορά πλασμιδίων και μεταθετών στοιχείων που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας μεταξύ των διαφόρων ειδών βακτηρίων. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό για τη δημόσια υγεία, καθώς τα γονίδια ανθεκτικότητας μπορούν να μεταφερθούν σε όλο το μήκος της τροφικής αλυσίδας, αλλά και σε παθογόνα βακτήρια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Πρακτικά δεύτερου πανελλήνιου συνεδρίου επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων. Αθήνα-Μάρτιος 1988.
2. James M. Jay. Modern Food Microbiology. *Fifth Edition*.
3. Rantsiou K, Cocolin L. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 2006.
4. Hammes WB, Bantleon A, Min S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*. 1990; **87**: 165-174.
5. Demeyer DJ. Stoichiometry of dry sausage fermentation. *Antonie Leeuwenhoek*. 1982; **48**: 414-416.
6. Fadda S, Sanz Y, Vignolo G. Characterization of muscle sarcoplasmatic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999a; **65**: 3540-3546.
7. Talon R, Walter D, Chartier S. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*. 1999; **52**: 47-56.
8. Demeyer DI, Verplaetse A, Gistelink M. Fermentation of meat: an integrated process. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*. 1986; **41**: 131-140.
9. Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002; **26**: 163-171.
10. Lucke FK. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*. 2000; **56**: 105-115.
11. Samelis J, Metaxopoulos J, Vlassi M. Stability and safety of traditional Greek salami-a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology*. 1998; **44**: 69-82.
12. Papamanoli E, Kotzekidou P, Tzanetakis N. Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology*. 2002; **19**: 441-449.
13. Bernardeau M, Guguen M, Vernoux JP. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006; **30**: 487-513.

14. Kandler O & Weiss N (1986) Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2 (Williams & Wilkins, eds), pp. 1261-1434. Baltimore, MD.
15. Mitsuoka T (1992). The human gastrointestinal tract (Chapter 4). *The lactic acid bacteria: The lactic acid bacteria in health and disease, Vol 1* (Wood BJB, ed), p.76. Elsevier Science Publishers, Essex.
16. Levri KM, Ketvertis K, Deramo M. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *J Fam Pract.* 2005; **54**: 613-620.
17. Qin HL, Shen TY, Gao ZG. Effect of lactobacillus on the gut microflora and barrier function of the rats with abdominal infection. *World J Gastroenterol.* 2005; **11**: 2591-2596.
18. Macfarlane GT & Cummings JH. Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis.* 2002; **15**: 751-759.
19. Cross ML. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002; **34**: 245-253.
20. Bongaerts GP& Severijnen RS. Preventive and curative effects of probiotics in atopic patients. *Med Hypotheses.* 2005; **64**: 1089-1092.
21. Hamilton-Miller JM. Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgrad Med J.* 2004; **80**: 447-451.
22. Torriani S& Marzotto M. Probiotic as promoters of human wellbeing: proven effects and quality assessment of selected cultures. *Industria del Latte.* 2003; **39**: 29-46.
23. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr.* 2001; **73**: 451S-455S.
24. Liong MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Sciences.* 2005; **88**: 55-66.
25. Marelli G, Papaleo E, Ferrari A. Lactobacilli for prevention of urogenital infections: a review. *Eur Rev Med Pharmacol.* 2004; **8**: 87-95.
26. Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A. Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003; **67**: 1421-1424.

27. Rantsiou K, Drosinos EH, Gialitaki M. Use of molecular tools to characterize *Lactobacillus* spp. isolated from Greek traditional fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2006.
28. Rantsiou K, Drosinos EH, Gialitaki M. Molecular characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*. 2005; **22**: 19-28.
29. Hugas M, Garriga M, Aymerich T. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 1993; **18**: 107-113.
30. Santos EM, Gonzalez-Fernandez C, Jaime I. Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of 'chorizo'. *International Journal of Food Microbiology*. 1998; **39**: 123-128.
31. Aymerich T, Martin B, Garriga M. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*. Aug. 2003; p. 4583-4594.
32. Aymerich T, Martin B, Garriga M. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 2006; **100**: 40-49.
33. Rebecchi A, Crivori S, Sarra PG. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 1998; **84**: 1043-1049.
34. Parente E, Griego S, Crudele MA. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *Journal of Applied Microbiology*. 2001; **90**: 943-952.
35. Andrighetto C, Zampese L, Lombardi A. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolate from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*. 2001; **33**: 26-30.
36. Urso R, Comi G, Cocolin L. Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. 2006.
37. Samelis J, Maurogenakis F, Metaxopoulos J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology*. 1994; **23**: 179-196.

38. Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. 2003; **65**: 859-867.
39. Drosinos EH, Mataragas M, Xiraphi N. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*. 2005; **69**: 307-317.
40. Drosinos EH, Paramithiotis S, Kolovos G. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*. 2007; **24**: 260-270.
41. Μαντώ Κυριακού. Σημειώσεις Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας. Αθήνα 2002.
42. Morot-Bizot SC, Talon R, Leroy S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; **97**: 1087-1094.
43. Berdague JL, Monteil P, Montel MC. Effect of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausages. *Meat Science*. 1993; **35**: 229-240.
44. Mauriello G, Moschetti G, Villani F. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from Naples-type salami. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2000; **51**: 19-24.
45. Rossi F, Tofalo R, Torriani S. Identification of 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 2001; **90**: 365-371.
46. Blaiotta G, Pennacchia C, Ercolini D. Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S-23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of staphylococci from Italian fermented sausages. *Systematic and Applied Microbiology*. 2003; **26**: 423-433.
47. Blaiotta G, Pennacchia C, Villani F. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; **97**: 271-284.
48. Iacumin L, Comi G, Cantoni C. Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages. *Systematic and Applied Microbiology*. 2006; **29**: 480-486.
49. Garcia-Varona M, Santos EM, Jaime I. Characterization of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; **54**: 189-195.

50. Martin B, Hugas M, Garriga M. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2005.
51. Morot-Bizot SC, Leroy S, Talon R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. . *International Journal of Food Microbiology*. 2006; **108**: 210-217.
52. Moreno F, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 2006; **106**: 1-24.
53. Franz MAP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*. 1999; **47**: 1-24.
54. Franz MAP, Stiles ME, Schleifer KH. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; **88**: 105-122.
55. Leclerc H, Devriese LA, Mossel DAA. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Bacteriology*. 1996; **81**: 459-466.
56. Buydens P, Debeuckelaere S. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1996; **31**: 887-891.
57. Agerbaek M, Gerdes LU, Richelsen B. Hypocholesteroleamic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1995; **49**: 346-352.
58. Marchesino B, Bruttin A, Romailier N. Microbiological events during commercial meat fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992; **73**: 203-209.
59. Hugas M, Garriga M, Aymerich MT. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; **88**: 223-233.
60. Peters J, Mac K, Wichmann-Schauer H. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; **88**: 311-314.
61. Martin B, Garriga M, Hugas M. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 2005; **98**: 1177-1190.

62. Φαρμακολογία.
63. Ungemach FR. Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*. 2000; **93**: 89-98.
64. Van den Bogaard AEJM, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000; **14**: 327-335.
65. Garofalo C, Vignaroli C, Zandri G. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. *International Journal of Food Microbiology*. 2006.
66. Van den Bogaard AEJM, Stobberingh EE. Is it time to ban all antibiotics as animal growth-promoting agents? *Lancet*. 1996; **348**: 1454-1456.
67. Bonner J. Hooked on drugs. *New Scientist*. 1997; **153**: 24-27.
68. Phillips I, Casewell M, Cox T. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; **53**: 28-52.
69. Catry B, Laevens H, Devriese LA. Antimicrobial resistance in livestock. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2003; **26**: 81-93.
70. Berends BR, van den Bogaard AEJM, Van Knapen F. Human health hazards associated with the administration of antimicrobials to slaughter animals. Part II. *Veterinary Quarterly*. 2001; **23**: 10-21.
71. Kruse H. Indirect transfer of antibiotic resistance genes to man. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*. 1999; **92**: 59-65.
72. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001; **17**: 431-437.
73. Austin DJ, Kristinsson KG, Anderson RM. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1999; **96**: 1152-1156.
74. Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Update*. 2000; **3**: 303-311.

75. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; **13**: 513-522.
76. Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2005; **105**: 281-295.
77. Hamilton-Miller JMT, Shah S. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology*. 1998; **26**: 153-154.
78. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; **82**: 1-11.
79. Curragh HJ, Collins MA. High levels of spontaneous drug-resistance in *Lactobacillus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992; **73**: 31-36.
80. Wang TT, Lee BH. Plasmids in *Lactobacillus*. *Crit. Rev. Biotechnol*. 1997; **17**: 227-272.
81. Gevers D, Danielson M, Huys G. Molecular characterization of tet (M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; **69**: 1270-1275.
82. Gevers D, Huys G, Swings J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2003; **225**: 125-130.
83. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000; **16**(suppl 1): 3-10.
84. Reynolds R, Potz N, Colman M. Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001-2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother*. 2004; **53**: 1018-1032.
85. Woodford N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005; **11**(Suppl 3): 2-21.
86. Gardini F, Tofalo R, Suzzi G. A survey of antibiotic resistance in Micrococcaceae isolated from Italian dry fermented sausages. *Journal of Food Protection*. 2003; **66**: 937-945.
87. Bourgeois CM, Leveau JY. Microbiological Control for Foods and Agricultural Products.
88. Jett BD, Huyke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994; **7**: 462-478.

89. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; **67**: 1628-1635.
90. Comi G, Urso R, Iacumin L. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*. 2005; **69**: 381-392.
91. Holley RA, Lammerding AM, Tittiger F. Occurrence and significance of streptococci in fermented Italian type dry sausage. *International Journal of Food Microbiology*. 1988; **7**: 63-72.
92. Levy SB, Fitzgerald GB, Macone AB. Spread of antibiotic resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature*. 1976; **260**: 40-42.
93. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Volume 2. Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
94. Sharpe ME, Garvie EI, Tilbury RH. Some slime-forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. *Applied Microbiology*. 1972; **23(2)**: 389-397.
95. Teuber M, Meile L, Schwartz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999; **76**: 115-137.
96. Klare I, Heier H, Claus H. VanA mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiol. Lett*. 1995; **125**: 165-172.
97. Klein G, Pack A, Reuter G. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; **64**: 1825-1830.
98. Citak S, Yucel N, Orhan S. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 2004; **57**: 27.
99. Saarela M, Matto J, Mattila-Sandholm T. Safety aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotic products. *Microb Ecol Health Dis*. 2002; **14**: 233-240.
100. Hamilton Miller JMT, Shah S. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett Appl Microbiol*. 1998; **26**: 153-154.
101. Herrero M, Mayo B, Gonzales B. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*. 1996; **81**: 565-570.

- 102.** Temmerman R, Pot B, Huys G. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 81: 1-10.
- 103.** Kawano J, Shimizu A, Saitoh Y. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34: 2072-2077.
- 104.** Mlynarczyk G, Mlynarczyk A, Meisel-Mikolajczyk F. Evaluation of susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains to vancomycin.
- 105.** Teuber M. Spread of antibiotic resistance in food-borne pathogens. *Cellular and molecular life sciences*. 1999; 56: 755-763.
- 106.** Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Res.* 2001; 32: 341-362.