

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΜΣ Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ BACILLUS CEREUS ΣΤΟ ΓΑΛΑ »**

**ΕΛΕΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΚΙΤΤΑ**

**ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΒΕΛΙΓΡΑΔΙΟΥ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

Επιβλέπων καθηγητής : ΓΚΟΒΑΡΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ (Καθηγητής ΠΘ )

Τριμελής επιτροπή: ΓΚΟΒΑΡΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ (Καθηγητής ΠΘ )  
ΠΕΞΑΡΑ ΑΝΔΡΕΑΝΑ (Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΘ)  
ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ (Επίκουρος Καθηγητής ΑΠΘ)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *Bacillus cereus* είναι ένα σπορογόνο βακτήριο ευρύτατα διαδεδομένο στο περιβάλλον. Τα περισσότερα στελέχη του αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 10° και 42° C, κυρίως σε αερόβιες συνθήκες, αλλά μπορεί να αναπτυχθούν και σε αναερόβιες συνθήκες. Η τιμή D<sub>121</sub> για τους σπόρους του *B. cereus* είναι συνήθως μεταξύ 0,03 min και 2,35 min. Παράγει τουλάχιστον πέντε διαφορετικές εντεροτοξίνες (HBL, NHE, CYTK, BCET και FM) και μια εμετική τοξίνη.

Ο *B. cereus* προκαλεί μια διαρροϊκή και μια εμετική μορφή τροφιμογενούς νόσου. Η διαρροϊκή μορφή προκαλείται από τις εντεροτοξίνες του *B. cereus* (HBL, NHE και CYTK) που παράγονται στον εντερικό σωλήνα μετά τη βλάστηση των σπόρων και την ανάπτυξη των βλαστικών μορφών του βακτηρίου, με κύρια συμπτώματα τα υδαρή κόπρανα και το κοιλιακό άλγος. Η εμετική μορφή προκαλείται από την πρόσληψη της προσχηματισμένης στα τρόφιμα εμετικής τοξίνης. Τα συμπτώματα είναι ναυτία και έμετος που περιστασιακά συνοδεύονται από κοιλιακό άλγος ή διάρροια.

Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις που προκλήθηκαν από τον *B. cereus* έχουν συσχετιστεί με διάφορα είδη τροφίμων. Η εμετική μορφή συχνότερα έχει συσχετιστεί με την κατανάλωση ρυζιού, ζυμαρικών και άλλων αμυλούχων τροφίμων, ενώ η διαρροϊκή με την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, λαχανικών και κρέατος.

Ο *B. cereus* έχει ιδιαίτερη σημασία για την βιομηχανία του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς τα προϊόντα αυτά είναι μεταξύ των τροφίμων που εμπλέκονται συχνότερα στην πρόκληση νόσου από το παθογόνο αυτό βακτήριο. Είναι δύσκολο να αποφευχθεί εντελώς η παρουσία *B. cereus* στα δείγματα νωπού γάλακτος διότι οι σπόροι του βρίσκονται παντού στο περιβάλλον της φάρμας και επιμολύνουν το παραγόμενο γάλα. Η εφαρμογή μέτρων, όπως η τήρηση των αρχών της Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής (Good Manufacturing Practice, GMP) και του Συστήματος Ανάλυσης των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (Hazard Analysis Critical Control Points System, HACCP) συνιστούν μέτρα για την αποφυγή μόλυνσης από *B. cereus*.

Λέξεις ευρετηρίου : *Bacillus cereus*, τροφιμογενή νόσος, τοξίνες, παθογόνα σπορογόνα βακτήρια, γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα.

## ABSTRACT

*B. cereus* is a spore-forming bacterium, frequently found in the environment. Most of the strains can grow at a temperature range of 10o - 42o C. *B. cereus* grows under aerobic conditions, but anaerobic growth is, also, feasible. The D121 value of the spores of *B. cereus* strains is usually between 0.03 to 2.35 min. The pathogen produces at least five different enterotoxins (HBL, NHE, CYTK, BCET and FM) and one emetic toxin.

*B. cereus* causes either a diarrheal or an emetic type of foodborne disease. The diarrhoeal disease is caused by the *B. cereus* enterotoxins(HBL, NHE και CYTK) , which are formed in the intestinal tract after the spores germination and the subsequent growth of the germinal cells. The symptoms are watery diarrhoea, abdominal cramps and pain. The emetic disease is caused by the ingestion of the preformed emetic toxin in food. The symptoms are nausea and vomiting, occasionally followed by abdominal pain or diarrhoea.

Foodborne outbreaks caused by *B. cereus* have been associated with various foods. The emetic disease has often been associated with the consumption of rice, pasta and other starchy foods, while the diarrheal disease is often linked to the consumption of dairy products, vegetables and meat.

*B. cereus* is of particular importance for the industry of milk and dairy products, as these products are among the food, that are frequently involved in causing disease from this pathogen bacterium. It is difficult to completely avoid the presence of *B. cereus* in raw milk samples because the spores are everywhere in the farm environment and contaminate the produced milk. Application of control measures, such as Good Manufacturing Practices (GMP) and Hazard Analysis Critical Control Points system (HACCP) is recommended in order to avoid *B. cereus* infection.

Keywords: *Bacillus cereus*, foodborne, toxins pathogen, spore-forming bacteria milk and dairy products.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	ii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	iii
ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	iv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο . Bacillus cereus.....	1
1.1 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού.....	1
1.2 Σπορογονία.....	4
1.3 Τυποποίηση.....	5
1.4 Οικολογία.....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο : Η παθογένεια του Bacillus cereus.....	8
2.1 Παθογένεια.....	8
2.2 Λοιμογόνοι παράγοντες.....	9
2.2.1 Εντεροτοξίνες.....	10
2.2.2 Εμετική τοξίνη.....	12
2.2.3 Φωσφολιπάση και Σφιγγομυελάση.....	13
2.2.3.1 Φωσφολιπάση (Λεκιθινάση).....	13
2.2.3.2 Σφιγγομυελάση ή σφιγγομυελινάση.....	13
2.2.4 Κερεολυσίνη.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Ο B. cereus στα τρόφιμα.....	15
3.1 Η παρουσία του B. cereus στα τρόφιμα.....	15
3.2 Ο B. cereus και η πρόκληση τροφιμογενούς νόσου.....	17
3.3 Η παρουσία του B. cereus στα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	20
3.4 Η μόλυνση του γάλακτος από τον B. cereus στις μονάδες γαλακτοπαραγωγής.....	22
3.5 Η παρουσία του B. cereus στο παστεριωμένο γάλα.....	25
3.6 Τυροκομικά προϊόντα.....	27
3.7 Τροφιμογενείς νόσοι λόγω B. cereus στα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	27
3.8 Προληπτικά μέτρα.....	29
3.9 Νομοθεσία.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο : Συμπεράσματα - Σύνοψη.....	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε ορισμένους ανθρώπους που με στήριξαν στην προσπάθεια αυτή.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη στήριξη τους, την υπομονή τους αλλά και την αδιάκοπη αγάπη τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές μου για την αποδοχή και την έγκριση του θέματος της εργασίας καθώς και για τη γενικότερη βοήθεια, τις πολύτιμες υποδείξεις και την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1:** Χαρακτηριστικά του *B. cereus* (Πηγή: Gilbert and Kramer, 1984). **ΣΕΛΙΔΑ 2**
- Πίνακας 2:** Οι τοξίνες που παράγονται από τον *B. cereus*. (Πηγή: Granum, 2001). **ΣΕΛΙΔΑ 10**
- Πίνακας 3:** Ομοιότητα μεταξύ των ClyA της *E. coli* K-12 και των ώριμων πρωτεϊνών HBL και NHE από το στέλεχος ATCC 14579 του *B. Cereus*. **ΣΕΛΙΔΑ 12**
- Πίνακας 4:** Τροφιμογενείς επιδημίες από *B. Cereus*. **ΣΕΛΙΔΑ 19**
- Πίνακας 5:** Τροφιμογενή κρούσματα από *B. cereus* σε γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα. **ΣΕΛΙΔΑ 28**
- Πίνακας 6:** Κριτήρια ασφαλείας για το *b. Cereus* σύμφωνα με το Κανονισμό 2073/2005/ΕΚ (Πηγή : Καν. 2073/2005/ΕΚ). **ΣΕΛΙΔΑ 32**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο *Bacillus cereus* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο σπορογόνο βακτήριο. Έχει μία ευρεία κατανομή στη φύση και απομονώνεται συχνά από το έδαφος και τα καλλιεργούμενα φυτά, και είναι επίσης καλά προσαρμοσμένος για ανάπτυξη στον εντερικό σωλήνα των εντόμων και θηλαστικών (Stenfors et al., 2008). Είναι ένα από τα σημαντικότερα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια και προκαλεί δύο μορφές τροφιμογενούς νόσου, την εντερική και την εμετική μορφή. Η διαρροϊκή μορφή προκαλείται από την εντεροτοξίνη που παράγεται από τις βλαστικές μορφές του *B. cereus* στο λεπτό έντερο (Granum, 1994), ενώ η εμετική προκαλείται από την τοξίνη που παράγεται από την ανάπτυξη των κυττάρων στα τρόφιμα (Kramer και Gilbert, 1989).

Ο *B. cereus* έχει ως ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης περίπου τους 4–5°C, ως μέγιστη περίπου τους 48–50°C, και ως βέλτιστη τους 30°C. Ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε εύρος τιμής pH 4,9–9,3, με βέλτιστη τιμή 6,0–7,0. Αναπτύσσεται σε τιμές  $a_w > 0,95$  και σε συγκέντρωση NaCl  $< 7\%$ .

Οι βλαστικές μορφές είναι ευαίσθητες στη θερμική επεξεργασία (Goepfert και συν., 1972). Οι σπόροι του ποικίλουν ως προς τη θερμοαντοχή τους. Οι περισσότεροι εμφανίζουν μέση αντοχή (τιμή  $D_{1210C} = 0,03$  min) ενώ άλλοι είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτικοί (τιμή  $D_{1210C} = 2,35$  min). Επίσης, ανάλογα με το τρόφιμο, δίνονται τιμές D στους 100°C από 4,2 ως 6,3 min και μέχρι 40 min (ICMSF, 1996).

Ο *B. cereus* παράγει τουλάχιστον πέντε διαφορετικές πρωτεΐνες (ή πρωτεϊνικά συμπλέγματα) που αναφέρονται ως εντεροτοξίνες και μία εμετική τοξίνη. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η εντεροτοξίνη T (BCET) και η εντεροτοξίνη FM (FM) προκαλούν τροφιμογενή νόσο. Οι δύο εντεροτοξίνες (HBL και NHE) που εμπλέκονται στη πρόκληση της διαρροϊκής μορφής αποτελούνται από τρεις διαφορετικές πρωτεϊνικές υποομάδες, δρουν όμως ως σύμπλοκο.

Ο ακριβής αριθμός των τροφιμογενών νόσων λόγω *B. cereus* είναι δύσκολο να υπολογιστεί για πολλούς διαφορετικούς λόγους. Αρχικά, η δηλητηρίαση από τον *B. cereus* δεν διαγιγνώσκεται συνήθως καθώς τα συμπτώματα είναι σχετικά ήπια (Kramer and Gilbert, 1989). Έπειτα οι διαδικασίες αναφοράς διαφέρουν από χώρα σε χώρα (Schoeni & Wong, 2005). Τρίτον, τα συμπτώματα προσομοιάζουν αρκετά τα συμπτώματα που προκαλούν άλλοι μικροοργανισμοί που προκαλούν επίσης τροφικές δηλητηριάσεις, όπως είναι ο *Staphylococcus aureus* και η *Candida perfingens*. Ως εκ τούτου, είναι πολύ πιθανό ο αριθμός των τροφικών δηλητηριάσεων από *B. cereus* να είναι σημαντικά υψηλότερος από τον αριθμό που πιστεύεται (Granum, 1994). Επίσης παρατηρείται και μεγάλη διακύμαση μεταξύ των αναφερόμενων περιπτώσεων από χώρα σε χώρα (Ehling-Schultz, 2004; Granum, 2001; Kotiranta et al., 2000; Kramer and Gilbert, 1989; Shinagawa, 1990).

Ο *B. cereus* απομονώνεται συχνά από το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Wong et al., 1988). Ανευρίσκεται επίσης στο ρύζι, στα προϊόντα ρυζιού (Blakey and Priest, 1980). Πολλά είδη τροφίμων έχει εμπλακεί σε κρούσματα τροφιμογενούς νόσου.

Και για τις δύο μορφές νόσου, τα τρόφιμα που εμπλέκονται συχνότερα είναι αυτά που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία που δεν καταστρέφει όλους τους σπόρους που πιθανώς να υπάρχουν στο τρόφιμο. Η θερμική επεξεργασία προκαλεί βλάστηση των σπόρων και, σε απουσία ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας, ο *B. cereus* αναπτύσσεται.



Στη βιομηχανία των γαλακτοκομικών, ο *B. cereus* είναι σημαντική αιτία των προβλημάτων που συνδέονται με μικρόβια (Andersson et al., 1995). Είναι δύσκολο να αποφευχθεί εντελώς η παρουσία *B. cereus* στα νωπά δείγματα γάλακτος διότι οι σπόροι του βρίσκονται παντού στο περιβάλλον της φάρμας και επιμολύνουν το παραγόμενο γάλα μέσω της μεταφορά του μικροοργανισμού από το έδαφος και το χόρτο στους μαστούς των αγελάδων και τελικά στο γάλα. Οι σπόροι επιβιώνουν της παστερίωσης και μετά τη βλάστηση και, λόγω της απουσίας ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας, τα κύτταρα αναπτύσσονται (Wilkinson & Davies, 1974).

Επιπλέον, οι σπόροι του *B. cereus* είναι πολύ υδρόφοβοι (Koshikawa et al., 1989) και προσκολλώνται στις βιομηχανικές επιφάνειες του εξοπλισμού επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων (Andersson et al., 1995). Οι σπόροι που έχουν προσκολληθεί στις επιφάνειες επεξεργασίας γάλακτος, μπορούν να βλαστήσουν, να πολλαπλασιαστούν και να παράξουν εκ νέου σπόρους (Andersson et al., 1995), με αποτέλεσμα την συνεχή μόλυνση (Eneroth et al., 2001). Καθώς η παστερίωση είναι ανεπαρκής για να εξοντώσει τους σπόρους, ελαττώνεται ο ανταγωνισμός με τα κύτταρα των άλλων βακτηριδίων που είναι κυρίαρχα στο νωπό γάλα (Holm et al., 2004, Lafarge et al., 2004).

Ο *B. cereus* έχει απομονωθεί σε σημαντικά ποσοστά από δείγματα παστεριωμένου γάλακτος, δειγμάτων γάλακτος σε σκόνη, δειγμάτων βρεφικής τροφής (που βασίζεται σε γάλα) και δειγμάτων παγωτού (van Netten and Kramer, 1992, te Giffel et al., 1996), αλλά και έχουν αναφερθεί πολλές εξάρσεις κρουσμάτων επιδημίες ακόμη και από γάλα UHT (ultra-high temperature sterilized) (Shinagawa, 1993).

Τα περισσότερα στελέχη του *B. cereus* δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C και δεν μπορούν να αναπτυχθούν στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που διατηρούνται σε ψύξη (4-8°C). Ωστόσο υπάρχουν ορισμένα ψυχρότροφα στελέχη που μπορούν και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ως και 4°C. Για το λόγο αυτό, εκτός από το ρύζι και τα ζυμαρικά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι από τα τρόφιμα που εμπλέκονται συχνότερα σε περιστατικά δηλητηρίασης (Granum και συν. 1993).

Καθώς οι σπόροι του *B. cereus* είναι ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον, η εφαρμογή των προληπτικών μέτρων ελέγχου της μόλυνσης στα τροφίμων είναι σημαντική για την υγεία του καταναλωτή. Για την ασφάλεια των τροφίμων και την αποφυγή μόλυνσης από *B. cereus* η εφαρμογή των μέτρων ελέγχου, συνιστά την τήρηση των ορθών βιομηχανικών πρακτικών (Good Manufacturing Practices, GMP) και την εφαρμογή του Συστήματος Ανάλυσης των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (Hazard Analysis Critical Control Points System, HACCP). Οι γαλακτοβιομηχανίες θα πρέπει να εφαρμόζουν τα μέτρα ελέγχου ώστε να αποφύγουν την μόλυνση του γάλακτος μετά την παστερίωση από το *B. cereus* (EFSA 2005).

## **ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο *B. cereus* είναι ένα σημαντικό παθογόνο, καθώς δύναται να προκαλέσει τροφιμογενείς νόσους και ο στόχος της εργασίας είναι πέρα από την παρουσίαση και ανάλυση των χαρακτηριστικών του μικροβίου αυτού, να περιγραφεί η παρουσία του στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, η εμπλοκή του σε τροφιμογενείς επιδημίες που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, με στόχο να

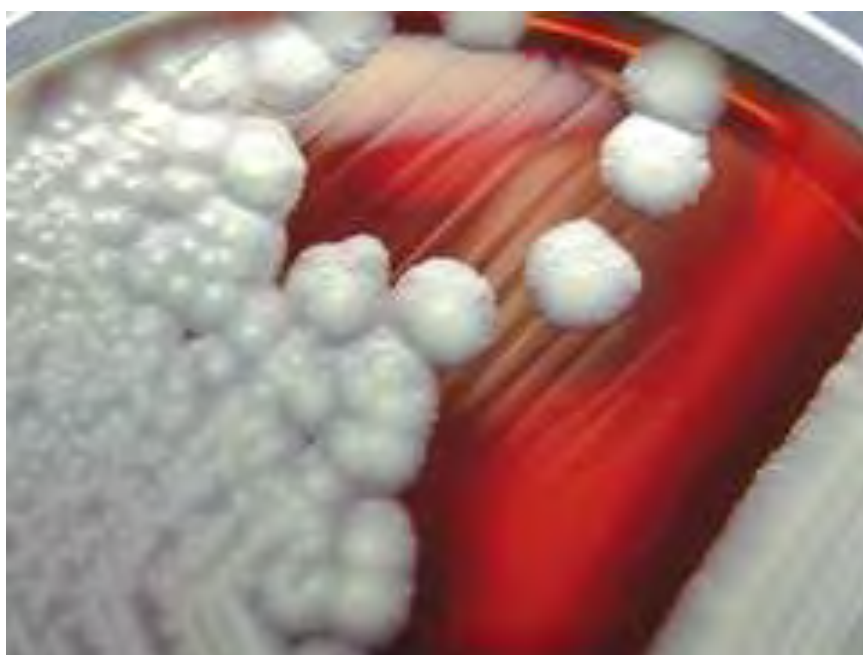
τονιστεί η σημασία του για την Δημόσια υγεία σε σχέση με την κατανάλωση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> . *Bacillus cereus*

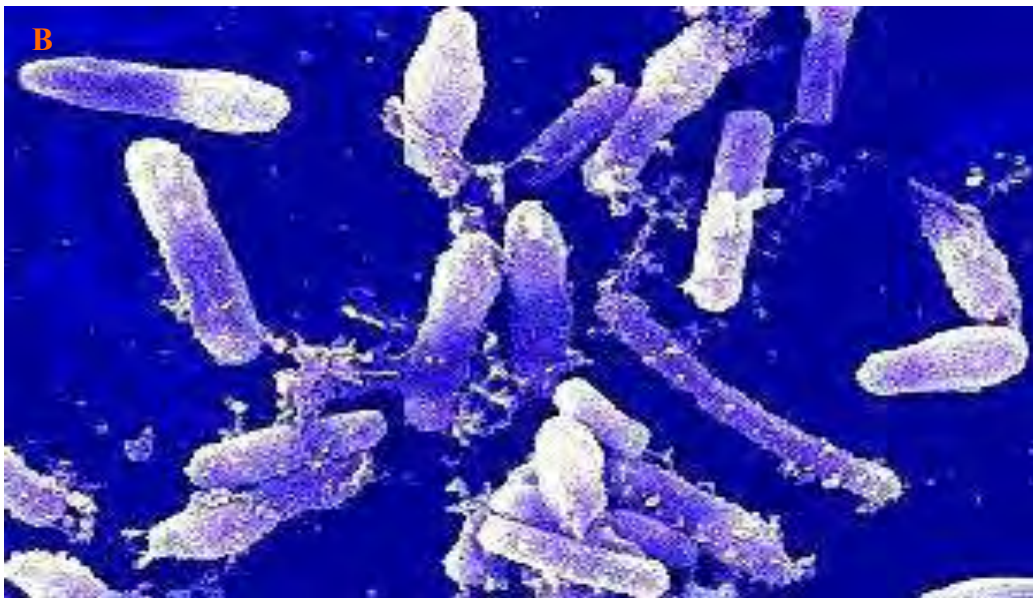
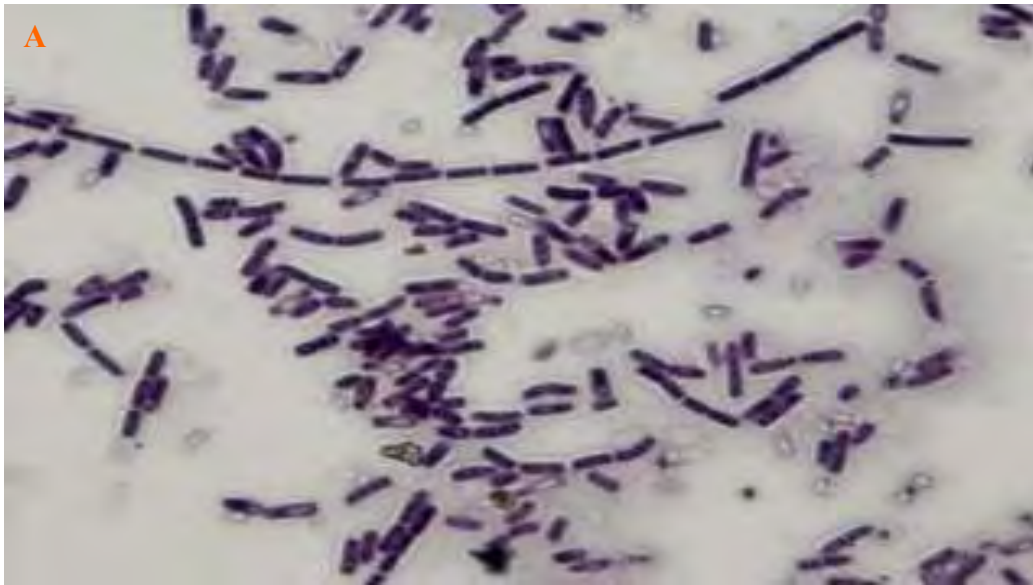
## 1.1 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

Ο *Bacillus cereus* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο με την ικανότητα να δημιουργεί σπόρους. Τα κύτταρα του έχουν τη μορφή ράβδου, εξ' ου και το όνομα 'βάκιλλος' (ράβδος). Το όνομα "cereus" ("κερί") δόθηκε διότι οι αποικίες του είχαν κηρώδη εμφάνιση σε τρυβλία Petri (Frankland and Frankland, 1887) (Εικόνες 1, 2). Οι διαστάσεις ενός τυπικού κυττάρου είναι περίπου 1.0- 1.2 μm έως 3.0-5.0 μm. Οι σπόροι του είναι ελλειπτικοί και σχηματίζονται σε κεντρική ή παράκεντρη θέση.

Ο μικροοργανισμός αυτός δεν ζυμώνει τη μαννιτόλη και έχει ένα ιδιαίτερα ενεργό σύστημα φωσφολιπάσης (λεκιθινάσης). Ο *B. cereus* χαρακτηρίζεται σαν θετικός στα κιτρικά [κιτρικά (+)/citrate (+)], αρνητικός στην αραβινόζη [αραβινόζη (-)/ arabinose (-)], θετικός κατά Gram [Gram (+)], αερόβιος σπορογόνος μικροοργανισμός (Gilbert and Kramer, 1984). Τα χαρακτηριστικά του και άλλα βιοχημικά χαρακτηριστικά του παρατίθενται στον Πίνακα 1.



Εικόνα 1: Αποικίες *B. cereus* σε αιματούχο άγαρ (Πήγη :Larry Stauffer, 2001).



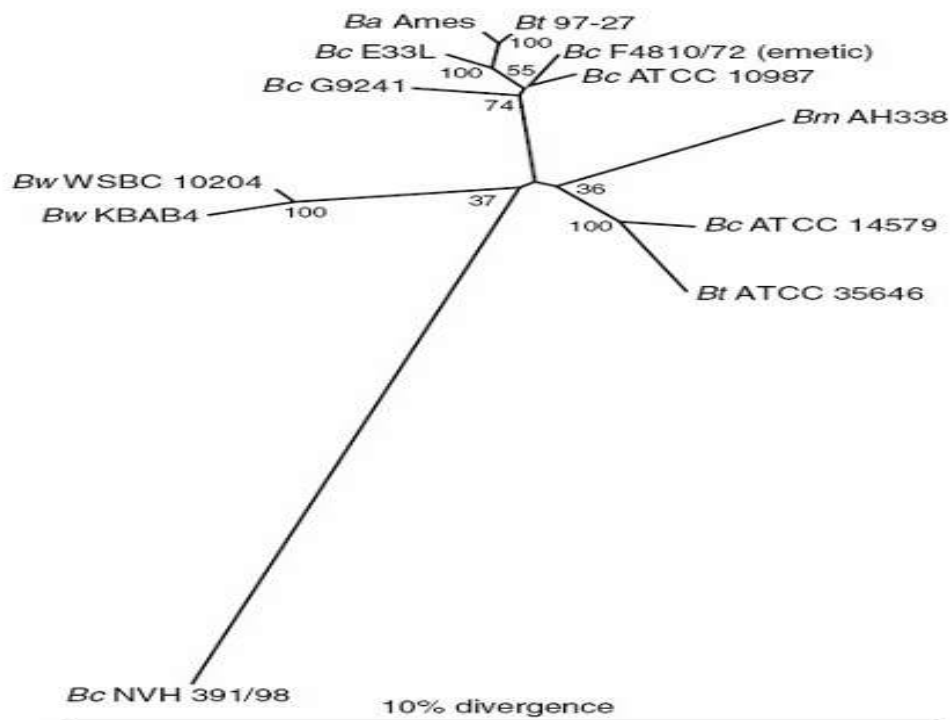
Εικόνες 2 : *B. cereus* σε : A ) φωτονικό μικροσκόπιο μετά από χρώση Gram (Πηγή : Scott Rose, 2008). B) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Πηγή : Frederick C. Michel, 2007).

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά του *B. cereus* (Πηγή: Gilbert and Kramer, 1984)

	O <sub>2</sub>	pH	Θερμοκρασία	Χρόνος διπλασιασμού
Ανάπτυξη	Προαιρετικά αναερόβιο	4.9 – 9.3	10-48°C βέλτιστη: 28-35 °C	Εργαστηριακές συνθήκες: 30 °C Βρασμένο ρύζι: 30 °C
Δημιουργία σπόρων			ελάχιστη: 8-30 min	

Όλα τα είδη του γένους *Bacillus* είναι Gram-θετικά βακτήρια, θετικά στην καταλάση, που μεγαλώνουν σε άγαρ γλυκόζης περιέχουν ενδοκυτταρικά σφαιρίδια τα οποία δεν χρωματίζονται με φουξίνη, αναπτύσσονται σε 7% NaCl και σε άγαρ ή ζυμό Sabouraud με δεξτρόζη, υδρολύουν το άμυλο και την καζεΐνη.

Μαζί με άλλα πέντε είδη του γένους, ο *B. cereus* ανήκει στην ομάδα των *Bacillus cereus*, μία ομάδα βακτηρίων που σχετίζονται τόσο πολύ μεταξύ τους, που συχνά η διάκριση μεταξύ τους είναι δύσκολη. Τα άλλα μέλη είναι ο *B. weihenstephanensis*, ο *B. mycooides*, ο *B. Pseudomycooides*, ο *B. thuringiensis* και ο *B. anthracis* (Jensen et al., 2003). Ο *B. mycooides* οφείλει το όνομά του στην υφοειδή ανάπτυξη του (όπως οι μύκητες) σε τρυβλία με άγαρ. Οι *B. pseudomycooides* και *B. weihenstephanensis* περιγράφηκαν πρόσφατα σαν νέες υπο-ομάδες (Lechner et al., 1998, Nakamura, 1998). Οι *B. cereus*, *B. thuringiensis* και *B. anthracis* είναι τα πιο γνωστά και πλέον μελετημένα μέλη της ομάδας. Ο *B. thuringiensis* είναι θανατηφόρος για τα έντομα και εφαρμόζεται σαν κυρίαρχο είδος βιολογικού φυτοφάρμακου (Whalon and Wingerd, 2003). Ο *B. anthracis* είναι παθογόνο για ανθρώπους και ζώα, ο αιτιολογικός παράγοντας του άνθρακα (Mock and Fouet, 2001). Ο *B. cereus* μπορεί επίσης να προκαλέσει ασθένεια, έχει συσχετιστεί με συστηματικές και τοπικές μολύνσεις και είναι ένα από τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς που απαντώνται σε σοβαρές οφθαλμικές λοιμώξεις (Callegan et al., 2003). Ωστόσο, ο *B. cereus* είναι περισσότερο γνωστός για την ικανότητά του να προκαλέσει τροφιογενή νόσο.



Εικόνα 3: Φυλογενετικό δένδρο από διάφορα στελέχη τεσσάρων ειδών της ομάδας του *Bacillus cereus*.

Bc: *B. cereus*, Bt: *B. thuringiensis*, Bw: *B. weihenstephanensis*, Bm: *B. mycooides*.

Το μήκος της μπάρας αντιστοιχεί σε 10% διαφοροποίηση. Οι τιμές στους κόμβους αντιστοιχούν σε αποτελέσματα από τεστ Bootstrap (ποσοστό επί τοις %). (Πηγή: Stenfors and Granum, 2001).

Το γεγονός ότι τα μέλη της ομάδας του *B. cereus* σχετίζονται στενά μεταξύ τους, διαφαίνεται και από τη φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στο γενετικό τους υλικό (Stenfors and Granum, 2001) (Εικόνα 3). Στο δένδρογραμμα, η φυλογενετική απόσταση ανά δύο στελεχών καθορίζεται από το μήκος της μικρότερης διαδρομής των γραμμών που συνδέουν τα δύο στελέχη.

Η ομάδα των βακτηρίων του *B. cereus* είναι γενετικά πολύ ομοιογενής και περιλαμβάνει έναν εντυπωσιακό αριθμό πλασμιδίων, τα οποία κωδικοποιούν ποικιλία λειτουργιών, όπως είναι η λοιμογόνος ικανότητα και η ικανότητα να μεταφέρονται από βακτήριο σε βακτήριο. Η δυναμική αυτή, της οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού μέσω των πλασμιδίων ανάμεσα στα διάφορα υπο-είδη, συμπεριλαμβανομένων των *B. cereus*, *B. anthracis* και *B. thuringiensis*, έχει οδηγήσει σε ανησυχία σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων. Η συζευκτική συμπεριφορά στελεχών *B. thuringiensis* με εμετικά στελέχη *B. cereus* επιπρόσθετα καταδεικνύει τη στενή γενετική σχέση των στελεχών αυτών.

## 1.2 Σπορογονία

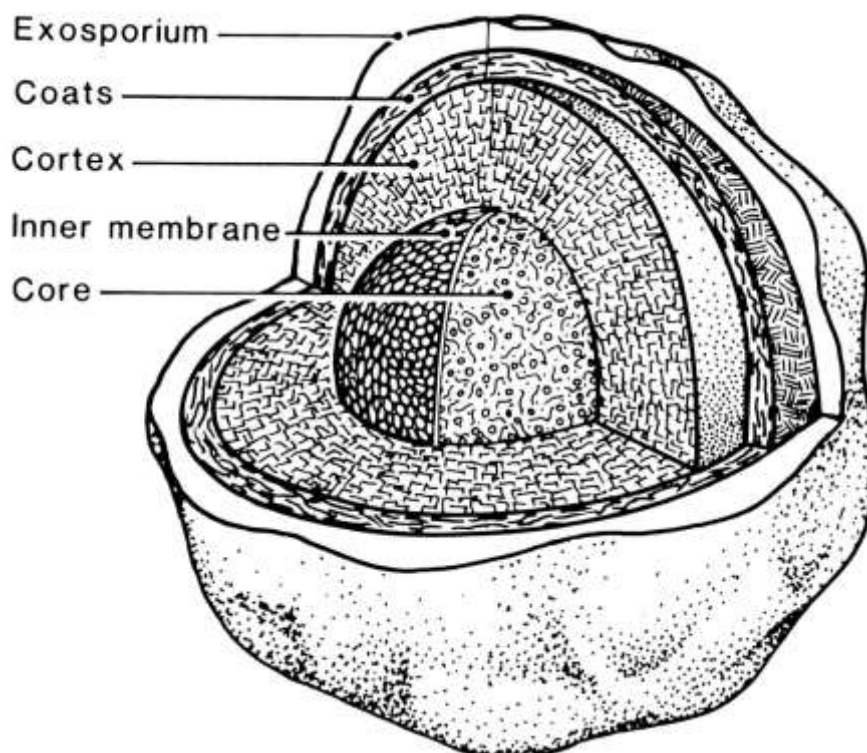
Ο *B. cereus* παράγει ελλειπτικού σχήματος ενδοσπόρια με δεσπόζουσα κεντρική θέση (Εικόνα 4), χωρίς να διαστέλλεται το σποράγγειο. Όταν ο σπόρος ελευθερωθεί από το σποράγγειο εγκιβωτίζεται στο εξωσπόριο και όταν βλαστήσει τότε το κάλυμμα του σπόρου υπόκειται σε ταχεία λύση, ενώ το κύτταρο αναδύεται. Με δεδομένο πως τα σπόρια του *B. cereus* μπορούν να επιβιώσουν της θερμικής επεξεργασίας, η κατανόηση της βλάστησης των σπόρων του *B. cereus* είναι ιδιαίτερα σημαντική στην μελέτη του βακτηρίου αυτού.

Η εκβλάστηση των βακτηριακών σπόρων συμβαίνει μέσω μιας σειράς διαδοχικών σταδίων. Αρχικά παρατηρείται απώλεια της αντοχής στη θερμότητα, ακολουθεί απελευθέρωση διπικολινικού οξέος (DPA) και  $Ca^{2+}$  στο θρεπτικό υλικό, αύξηση της χρωστικότητας των σπόρων και μείωση της οπτικής τους πυκνότητας και τελικά έναρξη της μεταβολικής δραστηριότητας.

Στο μηχανισμό διακοπής του ληθάργου των σπορίων του *B. cereus* μπορεί να εμπλέκονται ένζυμα ομοιάζοντα της θρυψίνης, καθώς η εκβλάστηση των σπορίων του βακτηρίου εμποδίζεται από διάφορους αναστολείς των ενζύμων αυτών. Ένα συνθετικό υπόστρωμα θρυψίνης επίσης αναστέλλει την εκβλάστηση των σπόρων του *B. cereus* (Boschwitz et al., 1983).

Αναστολή της εκβλάστησης των σπόρων του *B. cereus* παρουσιάστηκε και μέσω θραυσμάτων λακτοφερρίνης, μιας γλυκοπρωτεΐνης. Η τρανσφερρίνη, η οποία επίσης είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που δεσμεύει σίδηρο, παρουσιάζει ανάλογες ιδιότητες με τη λακτοφερρίνη. Επίσης, η παρατηρούμενη βακτηριοστατική ικανότητα των νιτροδών μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη νέων βακτηριοστατικών παραγόντων που παράγονται όταν αντιδρούν τα νιτροδών με πρωτεΐνη παρουσία θερμότητας (Custer and Hansen, 1983).

Η αδρανοποίηση σπόρων του *B. cereus* μετά από θερμική επεξεργασία σε  $T > 90\text{ }^{\circ}\text{C}$  ακολουθούμενη από ψύξη, πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Η μία φάση λαμβάνει χώρα κατά την πτώση (μείωση) της θερμοκρασίας διάρκεια της ψύξης από  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η δεύτερη λαμβάνει χώρα κατά την πτώση (μείωση) της θερμοκρασίας από  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Δεν πραγματοποιείται αδρανοποίηση όταν οι σπόροι ψύχονται από μία μέγιστη θερμοκρασία  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της εσωτερικής δομής ενός βακτηριακού σπορίου (τροποποίηση από Foster and Johnstone, 1990).

Η βλάστηση των σπορίων *B. cereus* είναι πιο εκτεταμένη σε ρύζι από ό,τι είναι σε ζωμό τρυπτικάσης κάτω από 15 °C και γενικά τα διαρροϊκά στελέχη αναπτύσσονται καλύτερα από ό,τι τα εμετικά στελέχη (Johnson et al., 1984).

### 1.3 Τυποποίηση

Για την τυποποίηση του είδους, έχει αναπτυχθεί ένα ορολογικό σύστημα τυποποίησης του *B. cereus* στο εργαστήριο υγιεινής τροφίμων στην Αγγλία (Gilbert and Kramer, 1984, Gilbert and Parry, 1977). Με βάση την ειδικότητα του μαστιγικού (H) αντιγόνου, το σύστημα τυποποίησης αποτελείται σήμερα από ένα σύνολο συγκολλητινο-αντιορών που αναπτύχθηκαν έναντι πρωτότυπων στελεχών που απομονώθηκαν από τρόφιμα που είτε συνδέθηκαν με επιδημίες τροφιμογενών νόσων από *B. cereus*, είτε από κλινικά δείγματα που 'συμπληρώθηκαν' από ένα επιπλέον σετ πειραματικών ορών. Με τη χρήση αυτού του συστήματος, μπορούν να ταυτοποιηθούν σήμερα περίπου στο 90% των επιδημιών, οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στη πρόκληση τους. Οι H-ειδικοί αντιοροί δεν είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο.

Τα περισσότερα από τα κρούσματα που σχετίζονται με το σύνδρομο του εμετικού τύπου, είτε από τα τρόφιμα είτε από τα κλινικά δείγματα αποδίδουν τον H-ορότυπο 1 μόνο, ενώ από τα κρούσματα του διαρροϊκού τύπου, μόνο λίγα δείγματα αποδίδουν τον ίδιο ορότυπο (Gilbert and Parry, 1977, Gilbert and Kramer, 1984).

Μεταξύ των απομονωμένων στελεχών *B. cereus* από διάφορα τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα, επικρατεί ένα μικρό σύμπλεγμα των οροτύπων. Το σύμπλεγμα αυτό περιλαμβάνει τους τύπους Η.1, 3, 4, 5, 8 και 12 (τα οποία συνήθως σχετίζονται με τροφιμογενή νόσο), και Η.17, 18, 19, 21, 22 (τα οποία δεν εμπλέκονται με τρόφιμα ή εμπλέκονται σπάνια) (Gilbert and Kramer, 1986).

Έχει αναπτυχθεί ένα σύστημα λυσιτυπίας για τον *B. cereus*. Χρησιμοποιήθηκαν 12 βακτηριοφάγοι, 10 φάγοι της οικογένειας Myoviridae και 2 φάγοι της οικογένειας Siphoviridae, που απομονώθηκαν από λύματα αποχέτευσης (Ahmed et al., 1995). Οι βιότυποι, τα προφίλ των λιπαρών οξέων και τα θραύσματα από αντιδράσεις περιορισμού (τα οποία έχουν διαφορετικό μήκος και επιτρέπουν το διαχωρισμό παρόμοιων τμημάτων DNA-RFLP, restriction fragment length polymorphism) ενός προϊόντος PCR από το γονίδιο κερεολυσίνης του *B. cereus* συγκρίθηκαν από 62 απομονωμένα δείγματα που ελήφθησαν από διάφορες τροφές. Τα απομονωμένα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε 6 βιότυπους, 10 ομάδες λιπαρών οξέων ή σε 7 PCR - RFLP clusters. Τα σχήματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της προέλευσης των στελεχών του *B. cereus* (Schraft et al., 1996).

Μια απλή μέθοδος ενίσχυσης θραυσμάτων DNA (amplified fragment length polymorphism-AFLP) αναπτύχθηκε για την επιδημιολογική διερεύνηση του *B. cereus*. Η μέθοδος αυτή, συγκρίθηκε με την μέθοδο στην οποία ο ορότυπος προσδιορίζεται με συμβατικό τρόπο με αντιγονικούς στόχους στο μαστίγιο του βακτηρίου. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε και σε σχέση με τα επιδημιολογικά δεδομένα. Αναγνωρίστηκαν 16 διαφορετικά προφίλ (το καθένα μοναδικό για τα 15 περιστατικά).

Αρχικά η διάκριση μεταξύ των μελών της ομάδας του *B. cereus* βασιζόταν αποκλειστικά στα διαφορετικά τους φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, ωστόσο πρόσφατα προστέθηκαν και εργαλεία γενετικής ανάλυσης για την ταυτοποίηση των ειδών. Αυτό το γεγονός, όμως δημιούργησε σύγχυση διότι γενετικά μοιάζουν τόσο πολύ μεταξύ τους τα βακτήρια *B. cereus*, *B. thuringiensis* και *B. anthracis* που δεν μπορούν να θεωρηθούν σαν παραλλαγές του ίδιου είδους (Helgason et al., 2000). Επιπρόσθετα, η διάκριση μεταξύ *B. cereus* και *B. weihenstephanensis* είναι προβληματική και η ανάλυση των μεταθετών τους στοιχείων υπέδειξε πως και ο *B. mycoides* είναι γενετικά παρόμοιος με άλλα μέλη της ομάδας του *B. cereus* (Leonard et al., 1997).

Η ομοιότητα μεταξύ των στελεχών της ομάδας του *B. cereus* επιβεβαιώθηκε πρόσφατα με τη διασαφήνιση του πλήρους γονιδιώματος του *B. anthracis* και δύο στελεχών *B. cereus* (Ivanova et al., 2003). Προφανώς, υπάρχει ένα μεγάλο σετ κύριων γονιδίων που μοιράζονται τα διάφορα μέλη της ομάδας του *B. cereus* (Rasko et al., 2005). Εκτός όμως του βασικού αυτού σετ γονιδίων, υπάρχει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία στην ομάδα του *B. cereus* (Helgason et al., 2004). Σε αυτήν την ποικιλομορφία συμβάλλουν ειδικά, ορισμένα γονίδια που σχετίζονται με λειτουργίες φάγων αλλά και γονίδια που βρίσκονται πάνω σε πλασμίδια.

Πράγματι, τα γονίδια που ευθύνονται κατά κύριο λόγο για τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τους *B. thuringiensis* και *B. anthracis* από τον *B. cereus* βρίσκονται σε πλασμίδια (Rasko et al., 2005, Helgason et al., 2000). Μεγάλος αριθμός πλασμιδίων απαντάται στην ομάδα των *B. cereus* και αυτά τα πλασμίδια συχνά ανταλλάσσονται μεταξύ των διαφορετικών μελών (Jensen et al., 2003). Επιπρόσθετα, αρκετά γονίδια που κωδικοποιούνται πάνω σε πλασμίδια, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που σχετίζονται με τη λοιμογόνο ικανότητα έχει δείχθει πως αλλάζουν τακτικά εντόπιση μεταξύ του πλασμιδικού και του χρωμοσωμικού DNA (Rasko et al.,



2005). Συμπερασματικά, το γενετικό υλικό που προκαλεί τους ειδικούς φαινότυπους που διακρίνουν τα μέλη της ομάδας του *B. cereus* είναι ανταλλάξιμο μεταξύ των μελών αυτών και έτσι, είναι και οι φαινότυποι ανταλλάξιμοι (Rasko et al., 2005).

Παραδείγματα αποτελούν στελέχη *B. thuringiensis* που εμπλέκονται σε γαστρεντερίτιδα, η οποία τυπικά προκαλείται από τον *B. cereus* (Jackson et al., 1995) και πρόσφατα στελέχη *B. cereus* που είναι ικανά να προκαλούν συμπτώματα ανάλογα με του άνθρακα λόγω της ύπαρξης ενός πλασμιδίου που προσομοιάζει ιδιαίτερα σε ένα από τα χαρακτηριστικά πλασμίδια του *B. anthracis* (Hoffmaster et al., 2004).

## 1.4 Οικολογία

Οι οικολογικοί θώκοι και οι κύκλοι ζωής των *B. anthracis* και *B. thuringiensis* έχουν περιγραφεί σε σημαντικό βαθμό (Jensen et al., 2003, Rasko et al., 2005). Στον κύκλο ζωής του *B. anthracis* η μόλυνση του ξενιστή (που συνήθως είναι ένα φυτοφάγο θηλαστικό) προκαλείται μέσω των σπόρων του. Τα σπόρια λαμβάνονται από τα μακροφάγα του ανοσοποιητικού συστήματος και βλαστάνουν μέσα στους λεμφαδένες. Ο ξενιστής πεθαίνει λόγω των τοξινών που παράγονται από τα πολυάριθμα κύτταρα του μικροβίου στον οργανισμό ( $>10^7$  /ml ορού), τα οποία φτιάχνουν νέα σπόρια ακόμη και στο αποσυντιθέμενο πτώμα. Αυτά τα νέα σπόρια διασπείρονται από έντομα και μολύνουν νέους ξενιστές, κλείνοντας έτσι τον κύκλο ζωής του μικροβίου. Για τον *B. thuringiensis*, ο ξενιστής είναι έντομο αντί θηλαστικού και η αλληλεπίδραση του μικροβίου με τον ξενιστή δεν οδηγεί απαραίτητα στο θάνατο του ξενιστή (Jensen et al., 2003).

Τα σημεία εντοπισμού και η 'τύχη' του *B. cereus* είναι πιο ασαφείς. Τα σπόριά του είναι πανταχού παρόντα και μπορεί να απομονωθεί από μια ευρεία ποικιλία περιβαλλοντικών δειγμάτων (Kramer and Gilbert, 1989). Για το λόγο αυτό, ο *B. cereus* εδώ και πολύ καιρό θεωρούνταν σαπρόφυτο του εδάφους. Ωστόσο, πρόσφατη ανάλυση του γονιδιώματος έδειξε ότι ο *B. cereus* ειδικεύεται στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών γεγονός που υποδεικνύει μία συμβιωτική ή παρασιτική θέση παρά μία σαπροφυτική ζωή ως βακτήριο του εδάφους (Ivanova et al., 2003). Ο *B. cereus* περιλαμβάνει στο γονιδιώμα του πολυάριθμα γονίδια για την εισβολή, την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό εντός ενός ξενιστή, περιλαμβανομένων αρκετών γονιδίων ιδιαίτερα χρήσιμων για την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων ή το τοίχωμα του εντέρου εντόμων (Ivanova et al., 2003).

Ο *B. cereus* έχει ελεγχθεί για την ομοιότητα του με άλλα είδη ως προς τα-χαρακτηριστικά παθογένειας, αλλά δεν έχει δοθεί η απαραίτητη προσοχή για την ανάλυση των οικολογικών ιδιοτήτων και των δύο 'συγγενικών' ειδών του (*B. anthracis*, *B. thuringiensis*), σε σχέση με το φυσικό τους περιβάλλον. Όλοι οι *B. cereus* μπορούν να αναπτυχθούν σαπροφυτικά σε περιβάλλοντα με πλούσιο υλικό και σπάνια ανευρίσκονται στο περιβάλλον, εκτός εάν υπάρχει συσσώρευση θρεπτικών συστατικών. Έτσι, έχουν πρόσφατα βρεθεί μέλη της ομάδας του *B. cereus* ως βακτήρια της χλωρίδας του εντέρου εντόμων, υποδηλώνοντας έτσι μία συμβιωτική σχέση μόνο με κατάλληλους ξενιστές και μόνο σε συγκεκριμένες συνθήκες κατά τις οποίες το βακτήριο μπορεί να μολύνει τον ξενιστή και να πολλαπλασιάζεται ανενόχλητο (Jensen et al., 2003).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> : Η παθογένεια του *Bacillus cereus*

### 2.1 Παθογένεια

Ο *B. cereus* είναι ευρέως διαδεδομένος στη φύση και συχνά απομονώνεται από το έδαφος και τα καλλιεργούμενα φυτά, αλλά είναι επίσης καλά προσαρμοσμένος για ανάπτυξη στον εντερικό σωλήνα των εντόμων και των θηλαστικών (Stenfors Arnesen et al., 2008). Από αυτά τα σημεία ανάπτυξης απλώνεται εύκολα στα τρόφιμα, μέσω των οποίων μπορεί να προκαλέσει διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Η κλινική μόλυνση από *B. cereus* μπορεί γενικά να κατηγοριοποιηθεί σε δύο κατηγορίες, την γαστρεντερική και την μη-γαστρεντερική νόσο. Το εύρος των παρατηρούμενων ασθενειών που μπορεί να προκαλέσει ο *B. cereus* οφείλεται τόσο την ικανότητα του να παράγει τοξίνες, όσο και στην ικανότητα του να εισβάλλει σε ιστούς και να πολλαπλασιάζεται μέσα σε αυτούς.

Ο *B. cereus* έχει αναγνωριστεί σαν αίτιο τροφιμογενούς νόσου από το 1955 (Todar, 2008). Το Αμερικανικό κέντρο ελέγχου ασθενειών (CDC-Centers for Disease Control) αναφέρει 52 επιδημίες τροφιμογενούς νόσου που σχετίζονται με τον *B. cereus* μεταξύ των ετών 1972-1986. Η γαστρεντερική, τροφιμογενής νόσος που προκαλεί ο *B. cereus* μπορεί να παρουσιαστεί σε δύο μορφές, την εμετική και την διαρροϊκή. Είναι ενδιαφέρον πως οι αναφερόμενες τροφιμογενείς νόσοι από το *B. cereus* ποικίλλουν από ήπιο σε ήπιο. Έτσι, στην Ιαπωνία, η εμετική μορφή αναφέρεται περίπου 10 φορές παραπάνω από την διαρροϊκή, ενώ αντίθετα στην Ευρώπη και Βόρειο Αμερική, η διαρροϊκή μορφή είναι η πλέον συχνά αναφερόμενη (Granum & Lund, 1997).

Η διαρροϊκή μορφή της γαστρεντερικής νόσου είναι μάλλον ήπια και χαρακτηρίζεται από συμπτώματα που εκδηλώνονται μέσα σε 8-16 ώρες, συχνότερα μέσα σε 12-13 ώρες και διαρκούν 12-25 ώρες. Περιλαμβάνουν ναυτία (σπάνια έμετο), κοιλιακό άλγος, τεινεσμούς και υδαρή κόπρανα. Η νόσος προσομοιάζει την τροφοδηλητηρίαση που προκαλεί το *Clostridium perfringens*. Η υπεύθυνη τοξίνη για την παθογένεια παράγεται στο λεπτό έντερο του ξενιστή. Τα τρόφιμα που συχνότερα σχετίζονται με την διαρροϊκή μορφή της νόσου είναι τα προϊόντα κρέατος, σουπές, λαχανικά, πουτίγκες/σάλτσες, και το γάλα/γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η εμετική μορφή είναι περισσότερο σοβαρή και περισσότερο οξεία από ότι η διαρροϊκή. Ο πληθυσμός του μικροοργανισμού που απαιτείται για την εκδήλωση του συνδρόμου είναι μεγαλύτερος από ό,τι στο διαρροϊκό σύνδρομο, με αριθμούς έως και  $2 \times 10^9$  κύτταρα ανά γραμμάριο. Ένας μέσος αριθμός  $10^5$ - $10^8$  κυττάρων αρκεί για να δημιουργήσει νόσο. Η διαφορά με την διαρροϊκή μορφή αφορά και τον μολυσματικό παράγοντα. Στην εμετική μορφή η τοξίνη πιστεύεται πως είναι προσχηματισμένη στις τροφές που καταναλώνονται και έχει τη μορφή κυκλικού πεπτιδίου. Η νόσος έχει ομοιότητες με τη σταφυλοκοκκική τοξίνωση. Ο χρόνος επώασης ποικίλει μεταξύ 1 και 6 ωρών, συχνότερα από 2 έως 5 (Mortimer και McCann, 1974) και η ασθένεια διαρκεί 6-24 ώρες. Τα συμπτώματα είναι κυρίως ναυτία και έμετος (ο οποίος ορισμένες φορές συνοδεύεται από διάρροια και έντονο γαστρικό άλγος, πιθανά λόγω της επιπρόσθετης παραγωγής εντεροτοξίνης). Η νόσος συνδέεται με την κατανάλωση μαγειρεμένου ρυζιού και ζυμαρικών, προϊόντων ζύμης και νουντλς (Granum & Lund, 1997). Ωστόσο συχνά έχει ενοχοποιηθεί και η παστεριωμένη κρέμα γάλακτος (Gilbert, 1979).

Η μη-γαστρεντερική νόσος μπορεί περαιτέρω να διαιρεθεί στην τοπική ή στη συστηματική νόσο. Επιπλέον, σπόρια του *B. cereus* ανευρίσκονται παντού, συμπεριλαμβανομένων των νοσοκομείων. Έτσι, ο *B. cereus* πορεί να προκαλέσει ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, ειδικά σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς που νοσηλεύονται. Περιβαλλοντικές δεξαμενές που πιθανά περιέχουν *B. cereus* ή σπόρια του είναι τα μολυσμένα φίλτρα του συστήματος εξαερισμού, οι οπτικές ίνες που χρησιμοποιούνται στη βρογχοσκόπηση, διάφορα εξαρτήματα εξοπλισμού, σεντόνια, γάντια, κλινοσκεπάσματα, ενδοφλέβιοι καθετήρες, σωλήνες συλλογής δειγμάτων, λευκά είδη.

Αν και η ανίχνευση *B. cereus* στο περιβάλλον δεν συνιστά απόδειξη για αυξημένο κίνδυνο κλινικής νόσου, είναι βέβαιο πως ενδύματα, νοσοκομειακά σκεπάσματα και καθετήρες που φέρουν *B. cereus* μπορεί να προκαλέσουν μόλυνση. Έχει περιγραφεί μηνιγγίτιδα από *B. cereus* λόγω μη ικανοποιητικού καθαρισμού μίας χειρουργικής τράπεζας, σε άτομα που είχαν υποβληθεί σε επεμβάσεις στον εγκέφαλο (Barrie et al., 1992). Η μόλυνση των ατόμων που εργάζονται σε νοσοκομεία από τα νοσοκομειακά κλινοσκεπάσματα και ειδικά των ατόμων που εργάζονται σε μονάδες νεογνών ή άλλες ειδικές μονάδες, είναι σημαντική και ιδιαίτερα επικίνδυνη, καθώς τα σπόρια του *B. cereus* είναι ανθεκτικά στα υγρά κρεμοσάπωνα που περιέχουν αλκοόλη (Barrie et al., 1992). Τα άτομα που συχνότερα μολύνονται με μη-γαστρεντερική μορφή νόσου από *B. cereus* είναι τα νεογνά, οι χρήστες ενέσιμων ναρκωτικών, οι ασθενείς που φέρουν τραύματα από ατύχημα ή λόγω χειρουργικής επέμβασης, καθώς και άτομα που έχουν καθετηριαστεί.

Έχει περιγραφεί βακτηριαμία από *B. cereus* σε ουδετεροπενικό ασθενή 17 ετών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, η οποία αποδόθηκε σε χλιαρό τσάι που ήπιε λίγο πριν παρουσιάσει το βακτηριαμικό επεισόδιο. Διεξοδική έρευνα κατέδειξε σημαντικά υψηλή συχνότητα μόλυνσης από *B. cereus* σε φακελάκια τσαγιού (17 από 19) από προετοιμασμένο τσάι ανοσοκατασταλαμένων ασθενών στο περιβάλλον του νοσοκομείου (El Saleeby et al., 2004). Πάντως, στις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, κανείς από τους/τις νοσηλευομένους/ες δεν προετοίμαζε τσάι εμβαπτίζοντας το φακελάκι σε βραστό νερό, μα αντίθετα, είτε ζέσταινε απλά το νερό σε φούρνο μικροκυμάτων είτε σε ηλεκτρικό μάτι (El Saleeby et al., 2004).

Το φάσμα των μη-γαστρεντερικών λοιμώξεων που μπορεί να προκαλέσει ο *B. cereus* συμπεριλαμβάνει την βακτηριαμία, τη λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (μηνιγγίτιδα και εγκεφαλικά αποστήματα), την ενδοφθαλμίτιδα, την πνευμονία αλλά και διάφορες δερματικές λοιμώξεις (Bottone, 2010). Ο *B. cereus* δύναται επίσης να προκαλέσει και οστεομυελίτιδα, αν και οι λοιμώξεις που προκαλεί στα οστά είναι αρκετά σπάνιες και δεν αναφέρονται μεμονωμένες, μα γίνεται αναφορά σε αυτές σε ανασκοπήσεις του φάσματος των λοιμώξεων που προκαλεί το μικρόβιο αυτό (Tuazon et al., 1979). Τέλος, έχει αναφερθεί και μία περίπτωση ουρολοίμωξης από *B. cereus* λόγω καθετήρα (Sato et al., 1998).

## 2.2 Λοιμογόνοι παράγοντες

Η παραγωγή τοξινών έχει υποτεθεί ότι είναι εξέχουσας σημασίας για την λοιμογόνο ικανότητα του *B. cereus*, ο οποίος παράγει έναν αριθμό κυτοτοξινών και ενζύμων (Davey and Tauber, 1987, Drobniowski, 1993, Turnbull and Kramer, 1983) που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ταχεία πορεία και τη σοβαρότητα της νόσου που προκαλεί,

συμπεριλαμβανομένων αιμολυσίνων, λιπασών, εντεροτοξινών πρωτεασών (Davey and Tauber, 1987, Turnbull, 1981).

Τα δύο είδη τροφιμογενούς νόσου που προκαλεί ο *B. cereus* οφείλονται σε διαφορετικούς τύπους τοξινών. Οι τοξίνες αυτές είναι συνήθως πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά συμπλέγματα και παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Η εμετική τοξίνη, που προκαλεί την εμετική μορφή της νόσου απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε πριν ορισμένα χρόνια ενώ η διαρροϊκή μορφή της νόσου οφείλεται σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικές εντεροτοξίνες (Granum and Lund, 1997). Επιπλέον, ο *B. cereus* παράγει και άλλες μορφές ενζύμων που θεωρούνταν τοξικά μα σήμερα έχει αποδειχθεί πως δεν είναι, όπως η φωσφολιπάση και η σφιγγομυελινάση, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω, μα δεν παρουσιάζονται στον πίνακα. Επίσης, δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η εντεροτοξίνη T (BCET) και εντεροτοξίνη FM (EntFM) προκαλεί τροφιμογενή νόσο.

Πίνακας 2.: Οι τοξίνες που παράγονται από τον *B. cereus*. (Πηγή: Granum, 2001).

Τοξίνη	Τύπος ή μέγεθος	Πρόκληση τροφιμογενούς νόσου
Αιμολυσίνη BL (Haemolysin BL, HBL)	Πρωτεΐνη (τμήματα L1, L2 και B)	+
Μη αιμολυτική εντεροτοξίνη NHE (Nonhemolytic enterotoxins, NHE)	Πρωτεΐνη (τμήματα A, B και C)	+
Εντεροτοξίνη T (Enterotoxin T, BCET)	Πρωτεΐνη (41kDa)	- (?)
Εντεροτοξίνη FM (Enterotoxin FM, EntFM)	Πρωτεΐνη (45kDa)	- (?)
Εντεροτοξίνη K [Cytotoxin K (CYTK)]	Πρωτεΐνη (34kDa)	+
Εμετική τοξίνη (cereulide)	Πεπτίδιο (1,2 kDa)	+

### 2.2.1 Εντεροτοξίνες

Ιστορικά, η ανακάλυψη των εντεροτοξινών που παράγονται από τον *B. cereus* έχει γίνει εδώ και αρκετά χρόνια. Παλαιότερα ανακοινώθηκε πως το βακτήριο παράγει μία αληθινή εντεροτοξίνη η οποία εκκρίνεται στο ελεύθερο από κύτταρα υλικό και συσχετίζεται με τα εκπλυμένα κύτταρα (της καλλιέργειας που μελετάται) (Spira and Goepfert, 1975).

Ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλεί την διαρροϊκή νόσο ο *B. cereus* είναι άγνωστος. Έχουν προταθεί βέβαια τρεις τοξίνες του σαν εμπλεκόμενες στο μηχανισμό αυτό, η αιμολυσίνη BL (HBL), η κυτοτοξίνη K (CYTK) και η μη αιμολυτική εντεροτοξίνη (NHE). Τόσο η HBL όσο και

η NHE είναι κυτοτοξίνες τριών συστατικών και η μέγιστη κυτοτοξικότητα της NHE ενάντια σε επιθηλιακό ιστό, εξαρτάται και από τα τρία συστατικά της, μα ο μηχανισμός της κυτοτοξικότητας παραμένει άγνωστος. Εκτός από αυτές τις τρεις τοξίνες, έχει προταθεί και μία ακόμη, η εντεροτοξίνη T για την οποία δεν υπάρχει απόδειξη πως προκαλεί την διαρροϊκή μορφή της νόσου.

Αρχικές μελέτες σχετικά με την 'εντεροτοξίνη' του *B. cereus* πρότειναν πως αυτή μπορεί να είναι είτε αποτελούμενη από ένα συστατικό είτε από πολλά διαφορετικά συστατικά. Περαιτέρω έρευνα έδειξε πως ο *B. cereus* παράγει δύο διαφορετικές εντεροτοξίνες τριών συστατικών. Η μία εντεροτοξίνη, που αποτελείται από τρία συστατικά είναι η αιμολυσίνη HBL και τα συστατικά που την αποτελούν είναι οι πρωτεΐνες B, L1 και L2. Η τοξίνη αυτή έχει δραστηριότητα εντεροτοξίνης, έχει καθαριστεί και χαρακτηριστεί. Καθώς δεν υπήρχε ομοιότητα με άλλες τοξίνες τόσο η HBL (αλλά και η NHE που περιγράφεται παρακάτω) παρέμεναν μη ταξινομημένες σαν τοξίνες (Fagerlund et al., 2008). Η HBL έχει ικανότητα νέκρωσης του δέρματος, έχει αγγειακή διαπερατότητα και προκαλεί συσσώρευση υγρού σε προσδεμένους βρόχους ειλεού κουνελιού. Λόγω αυτής της δραστηριότητας, έχει προταθεί η HBL σαν πρωταρχικός παράγων πρόκλησης νόσου για τη διαρροϊκή μορφή που προκαλεί ο *B. cereus*. Σήμερα, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν πως και τα τρία συστατικά της τοξίνης αυτής είναι απαραίτητα για τη μέγιστη δραστηριότητα της σαν εντεροτοξίνη (Cowell, et al., 1976.)

Μία μη αιμολυτική τριών συστατικών εντεροτοξίνη (NHE) χαρακτηρίστηκε από τους Lund και Granum ( Davey & Tauber, 1987) .Τα τρία συστατικά αυτής της τοξίνης ήταν διαφορετικά από τα αντίστοιχα της HBL, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.2

Η NHE ταυτοποιήθηκε στον *B. cereus* ύστερα από ένα μεγάλο ξέσπασμα δηλητηρίασης στη Νορβηγία (Lund and Granum, 1996). Το απομονωμένο στέλεχος, NVH 0075/95, δεν είχε ούτε HBL ούτε CYTK (Ehling-Schulz et al., 2005), μα ήταν ιδιαίτερα κυτοτοξικό, επιτρέποντας έτσι την ανακάλυψη της NHE. Η αρχική μελέτη υπέδειξε πως η τοξίνη δεν ήταν αιμολυτική.

Με χρήση μάρκερς για την διαταραχή των μεμβρανών, όπως τη λήψη ιωδιδίου του προπιδίου, έχει παρατηρηθεί πως επιθήλια που εκτέθηκαν σε NHE από υπερκείμενο καλλιέργειας *B. cereus* παρουσίασαν απώλεια κυτταρικού ATP, απελευθέρωση LDH (lactate dehydrogenase), ενώ επιθήλια που εκτέθηκαν σε υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων *B. cereus* που ήταν μεταλλαγμένα και από τα οποία έλειπαν τα γονίδια NHEB και NHEC δεν παρουσίασαν τις ίδιες ιδιότητες (Fagerlund et al., 2008) Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πως η δράση της τοξίνης πιθανά καταστρέφει εξωγενώς τη μεμβράνη.

Και οι δύο αυτές εντεροτοξίνες κωδικοποιούνται από τρία γονίδια τα οποία μεταγράφονται μαζί σε ένα οπερόνιο. Για την αιμολυσίνη, το οπερόνιο hblCDA κωδικοποιεί τα συστατικά της HBL, L2, L1 and B. Για την μη αιμολυτική εντεροτοξίνη, το οπερόνιο nheABC κωδικοποιεί τα NHEA, NHEB και NHEC προϊόντα. Σύγκριση της αλληλουχίας των προϊόντων αυτών δείχνει πως τα τρία αυτά συστατικά είναι ομόλογα μεταξύ τους, τόσο μεταξύ των τριών συστατικών των ιδίων εντεροτοξινών όσο και των συστατικών μεταξύ των δύο εντεροτοξινών δηλαδή της NHE και της HBL (Granum et al., 1999, Ryan et al., 1997) (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Ομοιότητα μεταξύ των ClyA της E. coli K-12 και των ώριμων πρωτεϊνών HBL και NHE από το στέλεχος ATCC 14579 του B. Cereus.

	HBL L <sub>2</sub>	HBL L <sub>1</sub>	HBL B	NHEA	NHEB	NHEC
CLYA	18%	20%	20%	18%	19%	20%
HBL L <sub>2</sub>		18%	23%	23%	21%	19%
HBL L <sub>1</sub>			25%	18%	40%	32%
HBL B				20%	27%	25%
NHEA					22%	22%
NHEB						44%

Μία εκ των τοξινών που μπορεί να προκαλέσει τη διαρροϊκή μορφή της τροφιμογενούς νόσου από τον B. cereus είναι και η κυτοτοξίνη K (CYTK), που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο, CYTK.

Πρόσφατα κατασκευάστηκε ένα φθορίζον στέλεχος βάκιλλου με το οποίο γίνεται δυνατή η μέτρηση της έκφρασης της κυτοτοξίνης K (έκφραση CYTK) (Ceuppens et al., 2013). Στο στέλεχος αυτό, η έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης τέθηκε υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της CYTK. Έτσι, μετρήθηκε η έκφραση της κυτοτοξίνης K και φάνηκε πως αυτή εκφράζεται με τον ίδιο ρυθμό όπως και η αιμολυσίνη με κορυφή κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των βακτηρίων. Ενδιαφέρον είχε η παρατήρηση πως μόνο ένα ποσοστό 1-2% επί του συνολικού αριθμού κυττάρων εξέφραζε την CYTK, υποδεικνύοντας πως σε έναν δεδομένο πληθυσμό βακτηρίων B. cereus διαφορετικοί πληθυσμοί χρησιμοποιούν διαφορετική γονιδιακή έκφραση για τις τοξίνες τους και τους παράγοντες παθογένειας τους.

## 2.2.2 Εμετική τοξίνη

Η εμετική τοξίνη προκαλεί εμετούς μόνο και η δομή της ήταν για καιρό ένα μυστήριο, καθώς το μόνο διαθέσιμο σύστημα ανίχνευσης της ενέπλεκε πρωτεΐοντα θηλαστικά. Η πρόσφατη ανακάλυψη ότι η τοξίνη μπορεί να ανιχνευθεί (δραστηκότητα κενοτοπίων) με τη χρήση των HEp-2 κυττάρων, οδήγησε στην απομόνωση της και τον προσδιορισμό της δομής της.

Παρά το γεγονός ότι υπήρξε κάποια αμφιβολία ως προς το αν η εμετική τοξίνη είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη κενοτοπιοποιητική δράση, δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι είναι η ίδια τοξίνη. Η εμετική τοξίνη έχει ονομαστεί κερουλίδιο και αποτελείται από μια δομή δακτυλίου από τρεις επαναλήψεις τεσσάρων αμινο ή / και οξυ οξέων: [Do-Leu-D-Ala-Io-Val-L-Val] Αυτή η δομή δακτυλίου (dodecadepsipeptide) έχει μοριακή μάζα από 1,2 kDa και χημικά σχετίζεται στενά με την βαλινομυκίνη καλίου. Η εμετική τοξίνη είναι ανθεκτική σε θερμότητα, pH και πρωτεόλυση αλλά δεν είναι αντιγονική.

Η εμετική τοξίνη του B. cereus προκαλεί την εμετική μορφή της νόσου, η οποία μπορεί ενίοτε να οδηγήσει σε σοβαρή ασθένεια, ακόμα και σε θάνατο. Για τη διαφορική διάγνωση του εμετικού τύπου της τροφικής ασθένειας που προκαλείται από τον B. cereus και να αξιολογηθεί η ασφάλεια των εμπορικών τροφίμων, έχει αναπτυχθεί μέθοδος για την ποσοτικοποίηση του κερουλιδίου.

### 2.2.3 Φωσφολιπάση και Σφιγγομυελάση

Η φωσφολιπάση και η σφιγγομυελάση παλαιότερα θεωρούνταν τοξικές, αλλά τώρα έχει αποδειχθεί πως δεν είναι. Επίσης, ορισμένες αιμολυσίνες που συνδέονται με αυτές τις ενώσεις είναι μόνο οριακά τοξικές (Beecher et al., 2000).

#### 2.2.3.1 Φωσφολιπάση (Λεκιθινάση)

Η φωσφολιπάση παράγεται από τον *B. cereus* και προσομοιάζει με την  $\alpha$ -τοξίνη του *Clostridium perfringens*. Η φωσφολιπάση του *B. cereus* είναι ανθεκτική στην απενεργοποίηση στους 45 °C και επίσης είναι ανθεκτική στην απενεργοποίηση μέσω θρυψίνης. Είναι μία μικρή μεταλλοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος MW 23,000 Da, που περιέχει δύο άτομα ψευδαργύρου ανά μόριο ενζύμου.

Η παραγωγή της φωσφολιπάσης ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα PlcR, ο οποίος προσδέεται στον ρυθμιστή της μεμμία συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία συντηρείται σε διάφορες θέσεις στο γονιδίωμα κυρίως σε περιοχές υποκινητών της μεταγραφής. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών, εκ των οποίων οι 22 εκκρίνονται στο εξωκυτταρικό μέσο και οι 18 προσδέονται ή προσκολλώνται σε δομές του κυτταρικού τοιχώματος (στις μεμβράνες ή στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης). Αυτές οι ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες σχετίζονται με την παροχή τροφής (φωσφολιπάσες, πρωτεάσες, τοξίνες), την προστασία του κυττάρου (βακτηριοκίνες, τοξίνες, μεταφορικές πρωτεΐνες, βιογένεση του κυτταρικού τοιχώματος) και με τη δυνατότητα του βακτηρίου να αισθάνεται το περιβάλλον του (Gohar et al., 2008).

#### 2.2.3.2 Σφιγγομυελάση ή σφιγγομυελινάση

Η σφιγγομυελινάση είναι μία πρωτεΐνη μεταξύ 41.000 και 23.300 Da, ανάλογα με τη μέθοδο ανάλυσης που χρησιμοποιείται και απαιτεί δισθενή ιόντα για τη δράση της.

Η σφιγγομυελινάση του *B. cereus* (BC – ΣΜάση) προκαλεί αιμόλυση ερυθροκυττάρων προβάτου που περιέχουν μεγάλες ποσότητες σφιγγομυελίνης. Ο μηχανισμός της αιμόλυσης αυτής έχει ερευνηθεί σε σύγκριση με την αντίστοιχη αιμόλυση που προκαλείται από μία άλλη παρόμοια τοξίνη, την άλφα τοξίνη του *C. perfringens*. Η *B. cereus* –ΣΜάση τοξίνη είναι ικανή να προσδεθεί σε ολόκληρες μεμβράνες, σε αντίθεση με την άλφα τοξίνη του *C. perfringens*, η οποία προσδέεται μόνο στα κλάσματα εκείνα των μεμβρανών που είναι ανθεκτικά στα απορρυπαντικά (Oda et al., 2010).

### 2.2.4 Κερεολυσίνη

Η δραστική μορφή της τοξίνης έχει ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 6,6, και το μοριακό βάρος 55.000 (Cowell et al., 1976). Η κερεολυσίνη είναι μία χοληστερολο-εξαρτώμενη κυτολυσίνη (Brillard

and Lereclus, 2007), που περιέχει δύο κατάλοιπα μισο - κυστεΐνης. Απουσία δι-θριοθρεϊτόλης (DTT, dithiothreitol) παρατηρείται μερική αυθόρμητη οξείδωση που οδηγεί στο σχηματισμό μιας οξειδωμένης μορφής της τοξίνης (Cowell et al., 1976).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Ο *B. cereus* στα τρόφιμα

### 3.1 Η παρουσία του *B. cereus* στα τρόφιμα

Τα τρόφιμα που φέρουν *B. cereus* και προκαλούν μόλυνση στον άνθρωπο (χωρίς απαραίτητα την εκδήλωση νόσου) περιέχουν το βακτήριο σε συγκεντρώσεις μεταξύ  $10^6$  και  $10^9$  cfu/g. Ιδιαίτερα όμως στο γάλα, η συγκέντρωση τού μικροβίου αρκεί να βρίσκεται ανάμεσα σε  $10^5$  -  $10^7$  cfu/g για να προκαλέσει μόλυνση.

Στο σημείο αυτό, πρέπει να τονίσουμε ότι η παρουσία των μικροοργανισμών είναι αναγκαία συνθήκη για την εκδήλωση νόσου αλλά όχι ικανή. Η εμφάνιση τής τελευταίας εξαρτάται από τον τύπο / στέλεχος τού μικροοργανισμού, από τον πληθυσμό του που προσλαμβάνεται μέσω του τροφίμου, από την κατάσταση τής υγείας του καταναλωτή και από άλλους παράγοντες.

Ένα μολυσμένο τρόφιμο με χαμηλό πληθυσμό βακτηρίων, μπορεί να μην προκαλέσει μόλυνση στον άνθρωπο ή το ζώο που θα το καταναλώσει. Εδώ, η συχνότητα με την οποία ο καταναλωτής εκτίθεται στο μικρόβιο είναι επίσης καθοριστική.

Ο *B. cereus* έχει απομονωθεί από τρόφιμα που δεν συμμετείχαν σε κρούσματα τροφιμογενών λοιμώξεων και είναι επίσης παρών στα κόπρανα σε ποσοστό 14-15% των υγιών ανθρώπων. Ανευρίσκεται στο ρύζι, στα προϊόντα ρυζιού, σε ανατολίτικα πιάτα και σε διάφορα συστατικά τους (Blakey and Priest, 1980). Μια ποικιλία τροφίμων έχει εμπλακεί σε τροφιμογενείς νόσους, όπως περιγράφεται και παρακάτω. Η εμετική μορφή τής νόσου που προκαλείται από *B. cereus* σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το ρύζι (Johnson, 1984).

Έχει δειχθεί σε μία ερευνητική εργασία πως το 56% δειγμάτων μπιζελιών, φασολιών και σιτηρών περιείχε *B. cereus* από  $1 \times 10^2$  έως  $6 \times 10^4$  οργανισμούς ανά γραμμάριο και μεγάλο αριθμό οργανισμών θετικών σε λεκιθινάση. Κατά τη διάρκεια της κανονικής διαδικασίας μαγειρέματος, ο *B. cereus* θα μπορούσε να αυξηθεί και στα  $10^7$  κύτταρα/ g (Blakey και Priest, 1980).

Ο *B. cereus* βρέθηκε στο 71,4 % και 33,3 % σε δείγματα που ελήφθησαν την άνοιξη και το φθινόπωρο αντίστοιχα, από πλήρες γάλα στην ηπειρωτική Κίνα και η μέση τιμή μεταξύ των θετικών δειγμάτων ήταν 11,7 mpn/ml (Zhou et al., 2008). Είναι γνωστό πως προϊόντα γάλακτος σε σκόνη αλλά και οι βρεφικές τροφές είναι συχνά μολυσμένα με *B. cereus* και σε έλεγχο 261 δειγμάτων που συλλέχθηκαν από βρεφική τροφή που είχε διανεμηθεί σε 17 χώρες, το 54% αυτών ήταν μολυσμένο με *B. cereus* σε επίπεδα που κυμαίνονταν από 0,3 έως 600/g (Becker et al., 1994).

Τα κινέζικα «take-out» φαγητά φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε μόλυνση από *B. cereus* και έχει δειχθεί πως τα εναιωρήματα (2%) των άλευρων σπόρων και τα γεύματα από ποικίλες φυτικές προελεύσεις είναι άριστες πηγές θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη του βακτηρίου (Beauchat & Ma-Lin, 1980).

Σε σύνολο 433 δειγμάτων μελιού που συλλέχθηκαν στην Αργεντινή, το 27% έδωσε θετικό αποτέλεσμα στον *B. cereus* ενώ το 14 % απέδωσε άλλα είδη *Bacillus*. Τα απομονωμένα στελέχη

από την Αργεντινή συγκρίθηκαν με απομονωμένα στελέχη από το μέλι από τις άλλες χώρες που χρησιμοποιούν παρόμοιες μοριακές τεχνικές και τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπάρχει μεγάλος βαθμός ποικιλομορφίας, τόσο σε φαινοτυπικό όσο και σε γενοτυπικό επίπεδο ανάμεσα τους (Lopez & Alipri, 2007).

Τα απομονωμένα στελέχη *B. cereus* από τρόφιμα είναι ιδιαίτερα τοξικά. Το 100% των απομονωμένων *B. cereus* από τοπικά γαλακτοκομικά προϊόντα σε έρευνα στην Κίνα, προκάλεσε λύση σε ερυθρά κύτταρα λαγού, το 98% έδειξε τοξικότητα, το 68% είχε κυτοτονική τοξικότητα σε κύτταρα (Wong et al., 1988a).

Σχετικά με τον *B. cereus* που απομονώθηκε από θαλασσινά, το 48% των απομονωμένων στελεχών παρήγαγε αιμολυσίνη BL (HBL) και μη αιμολυτικές (Nhe) εντεροτοξίνες και το 94% και 50% παρήγαγε είτε NHE ή HBL τοξίνες, αντίστοιχα.

Η παρουσία τουλάχιστον ενός από τα τρία γονίδια της ομάδας γονιδίων NHE ανιχνεύθηκε στο 99% των στελεχών ενώ το 69% κατείχε και τα τρία γονίδια. Ένα απομονωμένο δείγμα *B. cereus* είχε το γονίδιο της συνθετάσης της κερουλίδης, *ces* (Rahmati and Labbe, 2008).

Σπόρια του είδους *Bacillus* βρέθηκαν στο 52,8 % των δειγμάτων ρυζιού με μέση συγκέντρωση 32,6 cfu / g. Ογδόντα τρία από τα 94 απομονωμένα δείγματα ταυτοποιήθηκαν ως *B. cereus* και 11 ταυτοποιήθηκαν ως *B. thuringiensis*. Σε ένα εκ των δειγμάτων ρυζιού, το κυρίαρχο μικρόβιο ήταν ο *B. mycoides*. Το γονίδιο *ces* δεν εντοπίστηκε σε κανένα από τα δείγματα, ενώ αντίθετα, το 56,6 % των απομονωμένων δειγμάτων *B. cereus* διέθετε τα γονίδια HBLA και HBLD (αιμολυσινών) και το 89,1 % κατείχε τα γονίδια NHEA και NHEB (μη αιμολυτικών τοξινών). Όπως προσδιορίστηκε, το 53,0 % από συνολικά 83 απομονωμένα δείγματα *B. cereus* παρήγαγε δύο NHE και HBL εντεροτοξίνες ενώ το 93,9 % ήταν θετικό είτε για το ένα ή το άλλο (Ankolekar et al., 2009).

Τα γονίδια εντεροτοξίνης HBLA, HBLC, HBLD, NHEA, NHEB και NHEC βρέθηκαν σε απομονωμένους *B. cereus* από προϊόντα γάλακτος με πλήρη λιπαρά σε συχνότητες από 37,0%, 66,3%, 71,7%, 71,7%, 62,0% και 71,7% αντίστοιχα. Σε έξι δείγματα παστεριωμένου γάλακτος, ταυτοποιήθηκαν εννέα *B. thuringiensis* και οι περισσότεροι από αυτούς έφεραν γονίδια έξι εντεροτοξινών και το γονίδιο της εντομοκτόνου τοξίνης Cry1A. Το μοναδικό *B. mycoides* που απομονώθηκε από τα δείγματα έφερε γονίδια NHEA και NHEC γονίδια για μη αιμολυτικές τοξίνες (Zhou et al., 2008).

Στην Ολλανδία, αναλύθηκε η παρουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν τρεις εντεροτοξίνες αιμολυσίνης BL (HBL), μη αιμολυτικής εντεροτοξίνης (NHE) και κυτταροτοξίνης K αλλά και την ικανότητα να παράγουν κερουλίδη (*cereulide*) και βρέθηκε πως τα γονίδια NHE βρίσκονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 97% των απομονωμένων βακτηρίων, τα γονίδια HBL βρέθηκαν στο 66% των βακτηρίων και το γονίδιο για την κυτταροτοξίνη K σε σχεδόν 50% των απομονωμένων βακτηρίων (Wijnands et al., 2006).

Μία μέθοδος multiplex PCR χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμήσει την κατανομή των 10 διαφορετικών γονιδίων που σχετίζονται με παραγωγή τοξίνης μεταξύ 1.082 στελεχών *B. cereus* που απομονώθηκαν από αποξηραμένες κόκκινες πιπεριές, ρύζι και Sunsik. Τα τρόφιμα που εξετάστηκαν ήταν απαλλαγμένα από την εμετική τοξίνη, όχι όμως και από εντεροτοξίνες και η κατανομή των εντεροτοξιγονικών γονιδίων ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των διαφορετικών *B. cereus* που απομονώθηκαν από διάφορες πηγές (Kim et al., 2009).

Ανάμεσα σε 48.901 δείγματα έτοιμων για κατανάλωση τροφίμων στη δανική αγορά λιανικής πώλησης, το 0,5 % είχε τιμή πάνω από  $10^4$  cfu/g σε βακτήρια *B. cereus*. Οι υψηλές μετρήσεις ανιχνεύτηκαν συχνότερα σε αμυλούχα, ψημένα προϊόντα μα και σε φρέσκα αγγούρια και ντομάτες. Σαράντα τυχαία επιλεγμένα στελέχη είχαν τουλάχιστον ένα γονίδιο ή τμήμα του γονιδίου που εμπλέκεται σε ανθρώπινη διαρροϊκή ασθένεια, ενώ η εμετική τοξίνη σχετιζόταν μόνο με ένα στέλεχος *B. cereus* (Rosenquist et al., 2005).

Ο ακριβής αριθμός των τροφικών δηλητηριάσεων λόγω *B. cereus* είναι δύσκολο να υπολογιστεί για πολλούς διαφορετικούς λόγους. Αρχικά, η δηλητηρίαση από τον *B. cereus* δεν διαγιγνώσκεται συνήθως καθώς τα συμπτώματα είναι σχετικά ήπια (Kramer and Gilbert, 1989). Έπειτα οι διαδικασίες αναφοράς διαφέρουν από χώρα σε χώρα (Schoeni & Wong, 2005). Τρίτον, τα συμπτώματα προσομοιάζουν αρκετά τα συμπτώματα που προκαλούν άλλοι οργανισμοί που προκαλούν επίσης τροφικές δηλητηριάσεις, όπως είναι ο *Staphylococcus aureus* και η *Candida parfringens*. Πράγματι, μέχρι και πρόσφατα τρυβλία που περιείχαν υψηλό αριθμό αποικιών *B. cereus* θεωρούνταν σαν μολυσμένα από τα διαγνωστικά εργαστήρια και δεν συμπεριλαμβάνονταν στη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων του εργαστηρίου. Ως εκ τούτου, είναι πολύ πιθανό ο αριθμός των τροφικών δηλητηριάσεων από *B. cereus* να είναι σημαντικά υψηλότερος από τον αριθμό που πιστεύεται (Granum, 1994) καθώς επίσης παρατηρείται και μεγάλη διακύμανση μεταξύ των αναφερόμενων περιπτώσεων από χώρα σε χώρα (Ehling-Schultz, 2004; Granum, 2001; Kotiranta et al., 2000; Kramer and Gilbert, 1989; Shinagawa, 1990).

Σε πολλές περιπτώσεις, ο *B. cereus* αποδείχθηκε πως ήταν η κυρίαρχη αιτία τροφικής δηλητηρίασης. Για παράδειγμα, η προσεκτική διερεύνηση των εστιών τροφιμογενών λοιμώξεων στις γερμανικές Ένοπλες Δυνάμεις έδειξε πως ο *B. cereus* ήταν μακράν το πιο συχνά απομονωμένο παθογόνο στα επιλεγμένα δείγματα τροφίμων (Ehling-Schultz et al., 2004) και υπεύθυνος για σχεδόν το ήμισυ (42%) των κρουσμάτων που αναφέρθηκαν μεταξύ 1985 και 2000 (Kleer et al., 2001). Πράγματι, μελέτες αξιολόγησης του κινδύνου έχουν επανειλημμένα δηλώσει ότι ο *B. cereus* είναι ένας κίνδυνος μείζονος σημασίας σε διάφορα τρόφιμα, ειδικά τα μαγειρεμένα κρύα φαγητά (Carlin et al., 2000; Nauta et al., 2003).

### 3.2 Ο *B. cereus* και η πρόκληση τροφιμογενούς νόσου

Οι τροφιμογενείς νόσοι αποτελούν σημαντική απειλή για την υγεία. Η μικροβιακή ασφάλεια των τροφίμων έχει βελτιωθεί σημαντικά κατά τις τελευταίες δεκαετίες, αλλά, παρ'όλα αυτά, σε μια πρόσφατη έρευνα που διεξήχθη από το Ολλανδικό Ινστιτούτο για την Εθνική Υγεία και το Περιβάλλον (RIVM), η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από μικροοργανισμούς σε τρόφιμα αναγνωρίστηκε ως μια σημαντική απειλή για την εθνική υγεία. Η προκύπτουσα ετήσια απώλεια για την υγεία του πληθυσμού της Ολλανδίας ήταν 3.000-10.000 DALY [Disability Adjusted Life Years, Έτη ζωής προσαρμοσμένα σε αναπηρία, που είναι τρόπος μέτρησης για απώλεια υγείας και που περιγράφεται από τους Murray και Lopez (1996)]. Η τιμή αυτή είναι συγκρίσιμη με τις απώλειες που παρατηρούνται από μόλυνση από HIV/AIDS στην Ολλανδία (van Kreijl en Knaap, 2004). Στις ΗΠΑ κάθε έτος συμβαίνουν 76 εκατομμύρια τροφιμογενών λοιμώξεων, με αποτέλεσμα 325.000 εισαγωγές σε νοσοκομείο και περίπου 5.000 θανάτους. Οι απώλειες παραγωγικότητας μπορεί να ανέλθουν σε 7 έως 37.000.000.000 δολάρια ετησίως μόνο στις ΗΠΑ (Steele, 2001).

Ο ακριβής αριθμός των τροφικών δηλητηριάσεων λόγω *B. cereus* είναι δύσκολο να υπολογιστεί για πολλούς διαφορετικούς λόγους. Αρχικά, η δηλητηρίαση από τον *B. cereus* δεν διαγνώσκεται συνήθως καθώς τα συμπτώματα είναι σχετικά ήπια (Kramer and Gilbert, 1989). Έπειτα οι διαδικασίες αναφοράς διαφέρουν από χώρα σε χώρα (Schoeni & Wong, 2005). Τρίτον, τα συμπτώματα προσομοιάζουν αρκετά τα συμπτώματα που προκαλούν άλλοι οργανισμοί που προκαλούν επίσης τροφικές δηλητηριάσεις, όπως είναι ο *Staphylococcus aureus* και η *Candida perfringens*. Πράγματι, μέχρι και πρόσφατα τρυβλία που περιείχαν υψηλό αριθμό αποικιών *B. cereus* θεωρούνταν σαν μολυσμένα από τα διαγνωστικά εργαστήρια και δεν συμπεριλαμβάνονταν στη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων του εργαστηρίου. Ως εκ τούτου, είναι πολύ πιθανό ο αριθμός των τροφικών δηλητηριάσεων από *B. cereus* να είναι σημαντικά υψηλότερος από τον αριθμό που πιστεύεται (Granum, 1994) καθώς επίσης παρατηρείται και μεγάλη διακύμανση μεταξύ των αναφερόμενων περιπτώσεων από χώρα σε χώρα (Ehling-Schultz, 2004; Granum, 2001; Kotiranta et al., 2000; Kramer and Gilbert, 1989; Shinagawa, 1990).

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται δημοσιευμένες επιδημίες τροφιμογενών νόσων από *B. cereus*. Ο στόχος ήταν να συλλεχθούν οι επιδημίες που οφείλονταν σε *B. cereus* που απομονώθηκε σε τρόφιμα διαφορετικά από το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Διάφορες μελέτες παρουσίαζαν συνολικά τον επιπολασμό τροφιμογενών επιδημιών και απλά ανέφεραν πως συγκεκριμένες επιδημίες οφείλονταν στον *B. cereus* χωρίς όμως να αναφέρουν εάν και ποιά επιδημία οφειλόταν σε κατανάλωση συγκεκριμένου τροφίμου. Έτσι, το είδος τροφής που εμπλέκεται σε κάθε επιδημία δεν παρουσιάζεται παρακάτω όταν η πηγή δεν συγκεκριμενοποιούσε το εμπλεκόμενο τρόφιμο.

Σε μελέτη στο Μπάρι της Ιταλίας, περιγράφηκε μία εστία μόλυνσης από *B. cereus* λόγω κατανάλωσης basmati ρυζιού με γλυκόξινα λαχανικά σε πάρτυ γενεθλίων που έγινε σε μία pub (Martinelli et al., 2013). Σε σύνολο 13 στόμων που ήτα παρόντα, τα 12 νόσησαν από το βακτήριο.

Μία επιδημία τροφιμογενούς δηλητηρίασης από *B. cereus* παρουσιάστηκε στη Νορβηγία το έτος 1995 κατά τη διάρκεια των νεανικών αγώνων σκι (Granum et al., 1995), κατά τη διάρκεια του οποίου νόσησαν 152 άτομα.

Στις ΗΠΑ, κατά την περίοδο 2009-2010 καταγράφηκαν συνολικά 25 τροφιμογενείς επιδημίες οι οποίες οφείλονταν ή πιθανά οφείλονταν σε *B. cereus*. Το σύνολο των ατόμων που ασθένησαν ήταν 427 εκ των οποίων 3 νοσηλεύτηκαν (CDC, 2013).

Κατά την περίοδο 1993-1998 στην Ολλανδία καταγράφηκαν συνολικά 59 επιδημίες λόγω δηλητηρίασης από *B. cereus* με 537 περιπτώσεις ατόμων που νόσησαν (WHO, 2000).

Μία ανασκόπηση του 2009 κατέγραψε το σύνολο τροφιμογενών επιδημιών σε παγκόσμιο επίπεδο, που προκλήθηκαν από διάφορα μικρόβια κατά την περίοδο 1988-2007 (Greig & Ravel, 2009). Οι επιδημίες είχαν ως εξής: 498 προκλήθηκαν από κηπευτικά, εκ των οποίων ο *B. cereus* ευθυνόταν για το 1,1% από αυτές και 277 προκλήθηκαν από κατανάλωση τροφών που περιείχαν άλλα συστατικά. Από αυτές, ο *B. cereus* ήταν υπεύθυνος για το 6,1%. Επίσης, καταγράφηκαν 498 και 277 επιδημίες οφειλόμενες σε κατανάλωση κρέατος βοοειδών και θαλασσινών αντίστοιχα, επί του συνόλου των οποίων ο *B. cereus* ήταν υπεύθυνος για το 1,1% και στις δύο κατηγορίες.

Πίνακας 4 : Τροφιμογενείς επιδημίες από *B. cereus*

Είδος τροφής	Χώρα	Αρ. Κρουσμάτων (αριθμός ατόμων)	Έτη	Πηγή
Ρύζι/Λαχανικά	Ιταλία	1 (12)	2012	Martinelli et al., 2013
Ρύζι/take-away	Αγγλία	30	1992-2014	HPA, 2010
Ρύζι	Virginia (ΗΠΑ)	1 (14)	1993	Khord et al., 1994
-	Νορβηγία	1(152)	1995	Granum et al., 1995
-	ΗΠΑ	25(427)	2009-2010	CDC, 2013
-	Ολλανδία	59(537)	1993-1998	WHO, 2000
Κοτόπουλο	ΗΠΑ και Ευρωπαϊκή Ένωση	10	1988-2007	Greig and Ravel, 2009
Βοδινό	ΗΠΑ, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία	5	1988-2007	Greig and Ravel, 2009
Χοιρινό	ΗΠΑ και Ευρωπαϊκή Ένωση	2	1988-2007	Greig and Ravel, 2009
Αυγά	Αυστραλία	1	1988-2007	Greig and Ravel, 2009
Θαλασσίνα	ΗΠΑ και Ασία	3	1988-2007	Greig and Ravel, 2009
Σαλάτα/Φρούτα	Αυστραλία και Καναδάς	6	1988-2007	Greig and Ravel, 2009
Κέικ	Ιταλία	2(95 & 78)	2000	Ghelardi et al., 2000
Κοτόπουλο	Αγγλία	2(300 & 30)	2000	Ripabelli et al., 2000
Πατατοσαλάτα (μαγιονέζα)	Καναδάς	1(25)	2001	Gaulin et al., 2002

Τέλος, σε 337 επιδημίες από κατανάλωση μολυσμένων γαλακτοκομικών, ο *B. cereus* ταυτοποιήθηκε ως το υπεύθυνο βακτήριο στο 0,9% των περιπτώσεων (Greig & Ravel, 2009).

Η μελέτη αυτή έκανε ανάλυση των τροφιμογενών επιδημιών για να εκτιμηθεί το ποσοστό των ανθρωπίνων κρουσμάτων συγκεκριμένων εντερικών ασθενειών που οφείλονται σε ένα ειδικό τρόφιμο. Ο στόχος της ανασκόπησης ήταν να ελεγχθεί η χρησιμότητα των επιδημιολογικών δεδομένων για τις τροφιμογενείς νόσους που περιγράφονται σε διαθέσιμες ηλεκτρονικές ανακοινώσεις και αναφορές ως προς τη δυνατότητα εκτίμησης των συσχετισμών μεταξύ τροφίμων και επιδημιών, αλλά και μεταξύ των εκτιμήσεων αυτών ανά γεωγραφική περιοχή. Μετά από στατιστική επεξεργασία των 4093 επιδημιών μεταξύ των ετών 1988-2007, δείχθηκε πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αιτίας και πηγής τροφίμου και περιγράφηκαν αρκετές επιδημίες

που οφείλονταν σε λήψη τροφίμων σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Στη μελέτη αυτή υπήρχαν δεδομένα για τροφιμογενείς επιδημίες λόγω *B. cereus* σε σειρά τροφίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση, στις ΗΠΑ, στην Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία, αλλά και στην Ασία (Greig and Ravel, 2009).

Ένα διαφορετικό περιστατικό, επίσης στον Καναδά, αφορούσε το 70% (25 από τους 36) από τους παρευρισκόμενους σε ένα πάρτυ, οι οποίοι έπαθαν γαστρεντερίτιδα. Επικοινωνώντας με τον καθένα εκ των παρευρισκομένων, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η πατατοσαλάτα που σερβιρίστηκε και ειδικότερα η μαγιονέζα που είχε χρησιμοποιηθεί περιείχε – κατ' εκτίμηση - 1000 βακτηριακά κύτταρα ανά γραμμάριο (Gaulin et al., 2002).

Μία Ιταλική μελέτη ταυτοποίησε *B. cereus* σε δύο ταυτόχρονες επιδημίες λόγω κέικ με 95 και 78 νοσούντες αντίστοιχα (Ghelardi et al., 2002).

### 3.3 Η παρουσία του *B. cereus* στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Η παρουσία του *B. cereus* στο παστεριωμένο γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα κρίνεται σημαντική για τον κλάδο της γαλακτοκομίας διότι, αφενός το γάλα μπορεί να οδηγηθεί σε αλλοίωση, γεγονός που με τη σειρά του έχει οικονομικό κόστος για τους παραγωγούς και δεύτερο - και πολύ σπουδαιότερο-, επειδή μπορεί να οδηγήσει και σε τροφιμογενείς νόσους. Η συζήτηση λοιπόν, ανάμεσα στους εμπλεκόμενους φορείς διεξάγεται με κέντρο την ασφάλεια του γάλακτος.

Η παρουσία του *B. cereus* στα ναπά δείγματα γάλακτος είναι σχεδόν αδύνατο να αποφευχθεί εντελώς, διότι τα σπόρια του βρίσκονται παντού στο περιβάλλον των γαλακτοπαραγωγικών μονάδων: στο έδαφος, στην τροφή και στα περιττώματα των ζώων. Έτσι ανάμεσα στα προβλήματα που συνδέονται με μικρόβια, στη βιομηχανία των γαλακτοκομικών, ο *B. cereus* κατέχει υψηλή θέση (Andersson et al., 1995).

Οι ανασυντιθέμενες παιδικές τροφές ειδικότερα, θεωρούνται τρόφιμα υψηλού κινδύνου, λόγω της ευαισθησίας των βρεφών στα εντερικά παθογόνα βακτήρια, τη σοβαρή αντίδρασή τους σε εντεροτοξίνες και την αυξημένη θνησιμότητα τους (Rowan and Anderson, 1997). Χαρακτηριστικά, ενώ η παθογόνος δόση του *B. cereus* θεωρείται ότι βρίσκεται γενικά στο εύρος  $10^5$  έως  $10^7$  κύτταρα (Granum et al., 1993b), στα βρέφη και σε άλλες ευάλωτες πληθυσμιακές ομάδες, οι τροφιμογενείς ασθένειες αποδίδονται σε μολύνσεις από κατανάλωση τροφών που περιέχουν μικρότερους αριθμούς του συγκεκριμένου βακτηρίου, στην περιοχή από  $10^3$  έως  $10^5$  κύτταρα (Giannella and Brasile, 1979). Για αυτά τα τρόφιμα, όπως είναι φυσικό, υπάρχει απαίτηση να είναι στείρα. Ιδιαίτερη λοιπόν ανησυχία προκαλεί η εμφάνιση σε αυτά, του εντεροτοξιγονικού *B. cereus*.

Η παρουσία του *B. cereus* στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σχετικά υψηλή και αυτό έχει αποτυπωθεί στη βιβλιογραφία. Για παράδειγμα, ανεξάρτητες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 1983, το 1988 και το 1994, σε δείγματα τροφίμων, έδειξαν ότι περίπου το 35% των δειγμάτων παστεριωμένου γάλακτος, το 63% των δειγμάτων γάλακτος σε σκόνη, το 50% των δειγμάτων βρεφικής τροφής (που βασίζεται στο γάλα) και το 14% των δειγμάτων παγωτού ήταν μολυσμένα από *B. cereus*, με τιμές από 0,3 έως 800 cfu/g ή cfu/ml (Ahrned et al., 1983, Wong et al., 1988b, Becker et al., 1994).

Ο *B. cereus* απομονώνεται συχνά από το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Wong et al., 1988a). Στο γάλα, ο *B. cereus* προκαλεί αλλοίωση στο προϊόν που μοιάζει με κρέμα που έχει σπάσει σε πολλά κομμάτια («bitty» cream) ή με γλυκό που είναι έτοιμο να πήξει. Ο *B. cereus* απομονώθηκε από το 9, 35, 14 και 48% νωπού γάλακτος, παστεριωμένου γάλακτος, τυριού Cheddar και δειγμάτων παγωτού, αντίστοιχα (Ahmed et al., 1983). Σε μία άλλη εργασία, ο *B. cereus* ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 17 % του γάλακτος που είχε υποστεί ζύμωση, στο 52% των παγωτών, στο 35 % των μαλακών παγωτών, 2 % παστεριωμένου γάλακτος και παστεριωμένου γάλακτος που είχε ανασυσταθεί και είχε γεύση φρούτων ή καρπών και το 29% γάλακτος σε σκόνη, κυρίως γάλακτος με γεύση φρούτων ή καρπών (Wong et al., 1988a).

Ωστόσο, παρά την εγγενή ικανότητα των σπορίων του *B. cereus* να επιβιώνουν σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και την αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων που σχετίζονται με την κατανάλωση μη γαλακτοκομικών, πρωτεϊνικών και αλευρωδών τροφίμων που περιέχουν αυτόν τον οργανισμό (Jackson et al., 1995), η συχνότητα εμφάνισης του *B. cereus* σε τροφιμογενείς νόσους προερχόμενες από κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων παραμένει σχετικά χαμηλή. Η χαμηλή συχνότητα πρόκλησης τροφιμογενών νοσημάτων από τον *B. cereus* μπορεί να οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι το γάλα είναι φτωχό μέσο για την παραγωγή τοξίνης από το βακτήριο, δεδομένου ότι έχει πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερα αμινοξέα και στερείται γλυκόζης (Becker et al., 1994).

Σχετικά με το προηγούμενο, έχει παρατηρηθεί πως γάλα που περιείχε *B. cereus* έδειξε κυτοτοξικότητα στο υπερκείμενο καλλιέργειας μετά από περιόδους φύλαξης σε διάφορες θερμοκρασίες (Beecher and Wong, 1994). Δεν υπάρχουν όμως επαρκή δεδομένα για να αποδείξουν πέραν αμφιβολίας τη σχέση της ύπαρξης του διαρροϊκού τύπου *B. cereus* στο γάλα και της πρόκλησης ασθένειας εξαιτίας της προσχηματισμένης τοξίνης και της απελευθέρωσής της, από τα κύτταρα ή τα σπόρια του βακτηρίου, μέσα στο έντερο του ατόμου που κατανάλωσε το γάλα (Granum et al., 1993a). Οι μελέτες πάντως για τη σταθερότητα της τοξίνης, όταν έχει συλλεχθεί ως προσχηματισμένη από προϊόντα γάλακτος και βρίσκεται πλέον *in vitro*, έξω από το τρόφιμο, δείχνουν ότι είναι ιδιαίτερα σταθερή, (Becker et al., 1994).

Σήμερα πολλές εταιρείες που παράγουν σκόνη γάλακτος για βρέφη, ενσωματώνουν στην παρασκευή του συστατικά υψηλής διατροφικής αξίας, όπως μαλτοδεξτρίνη (παράγωγο της υδρόλυσης του αμύλου), ειδικά στα προϊόντα που προορίζονται για πρόωρα γεννημένα μωρά και για τα παιδιά που απογαλακτίζονται.

Σε πρόσφατη μελέτη δείχθηκε πως η μαλτοδεξτρίνη επιταχύνει την ανάπτυξη του *B. cereus* σε ανασυντεθημένο γάλα για βρέφη από σκόνη και σε συνθετικά μέσα καλλιέργειας και αυξάνει επίσης τη σύνθεση εντεροτοξίνης από το βακτήριο. Περαιτέρω μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τρία διαρροϊκά στελέχη *B. cereus* για την εξαγωγή συσχέτισης μεταξύ του επιπέδου σύνθεσης της διαρροϊκής τοξίνης και της περιεκτικότητας τού ανασυντεθημένου βρεφικού γάλακτος από σκόνη, σε μαλτοδεξτρίνη.

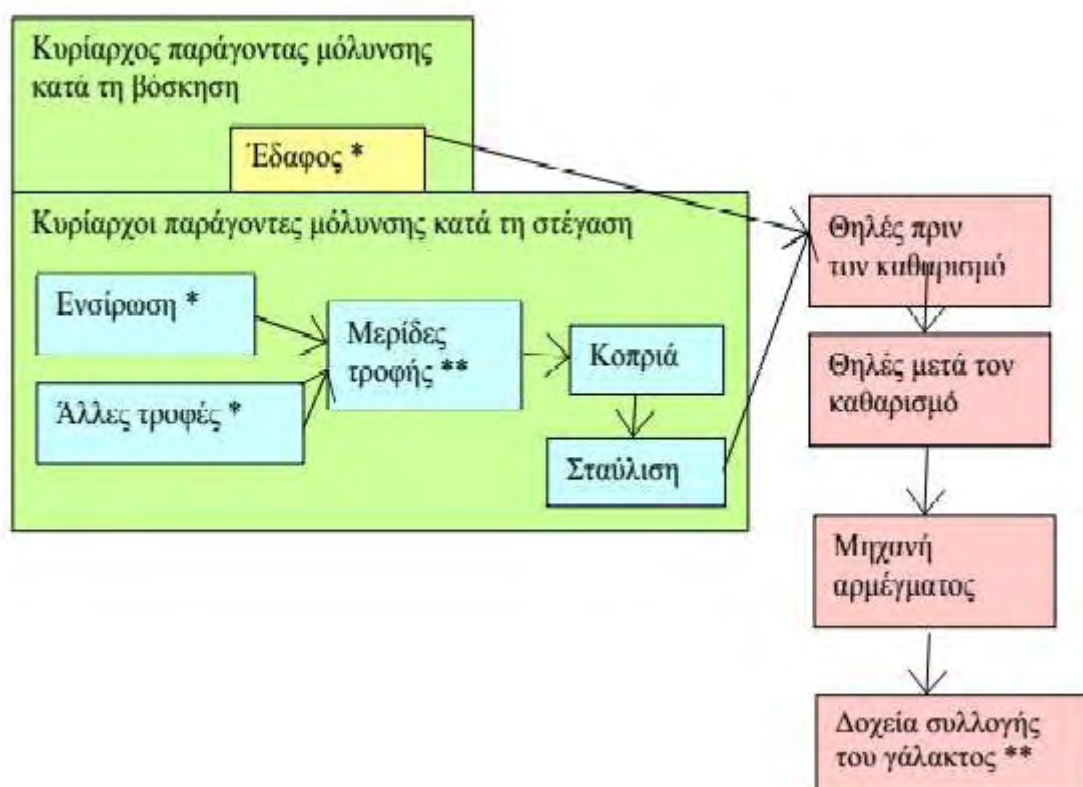
Ο *B. cereus* ανιχνεύθηκε σε 17 δείγματα σκόνης γάλακτος που εξετάστηκαν αμέσως μετά την επανασύστασή τους και μόνο 6 από αυτά περιείχαν την εντεροτοξιγονική μορφή του μικροοργανισμού. Η διαρροϊκή όμως μορφή, παρουσιάστηκε σε κανένα δείγμα, υποδεικνύοντας πως το γάλα σε σκόνη για βρέφη που είναι διαθέσιμο στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, είναι αποδεκτού επιπέδου από άποψη βακτηριολογικής ποιότητας (Becker et al., 1994).

Η αποθήκευση του γάλακτος και η επανασύστασή του σε βάθος χρόνου, είχε σαν αποτέλεσμα την ανεύρεση του μικροοργανισμού σε 63 δείγματα και 6 από αυτά περιείχαν και τους δύο τύπους *B. cereus*, I και II. Σε 4 από τα 38 δείγματα στα οποία αναπτύχθηκε ο *B. cereus* II, ανιχνεύτηκε διαρροϊκή εντεροτοξίνη. Και τα τέσσερα περιείχαν μαλτοδεξτρίνη, ενώ τα τρία από αυτά είχαν και λακτόζη. Έξι δείγματα στα οποία αναπτύχθηκε ο *B. cereus* II χωρίς να παράγει εντεροτοξίνη, περιείχαν μόνο λακτόζη σαν πηγή υδατάνθρακα (Rowan and Anderson, 1997).

### 3.4 Η μόλυνση του γάλακτος από τον *B. cereus* στις μονάδες γαλακτοπαραγωγής

Ο *B. cereus* ανευρίσκεται συχνά στο γάλα και η διάρκεια ζωής των παστεριωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων εξαρτάται εν μέρει από τη συγκέντρωση των σπορίων *B. cereus* στο αρχικό, νωπό γάλα. Η μόλυνση του νωπού γάλακτος από σπόρια του βακτηρίου είναι συχνή, μέσω αρκετών οδών στη συνολική διαδικασία από τη συλλογή έως την διανομή του στις γαλακτοβιομηχανίες.

Με βάση την ανίχνευση των πηγών μόλυνσης στην αλυσίδα γαλακτοπαραγωγής, αναπτύχθηκαν μοντέλα προσομοίωσης, τα οποία κάνουν εκτίμηση, ποιοτική και ποσοτική, των στοιχείων και των παραγόντων που έχουν την μεγαλύτερη επίπτωση στη συγκέντρωση των σπορίων στο νωπό γάλα ( Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Πηγές μόλυνσης από σπόρια του *B. cereus* σε γάλα αγροκτημάτων. Ένας αστερίσκος δηλώνει πηγή μόλυνσης. Δύο αστερίσκοι δηλώνουν τη δυνατότητα ανάπτυξης του μικρόβιου σε αυτό το μέσο (Πηγή :Vissers et al., 2007).



Στα αγροκτήματα που παράγουν το νοπό γάλα, το γάλα μολύνεται συχνότερα λόγω συνθηκών ελλειπούς υγιεινής και τής απουσίας ενός συστήματος ελέγχου.

Τα περισσότερα είδη *Bacillus* είναι κοινά στο αγροτικό περιβάλλον: στο έδαφος, στη ζωοτροφή και στην κοπριά αλλά και στο πεπτικό σύστημα των ασπόνδυλων που ζουν στα υποστατικά ή που παρασιτούν τα ζώα παραγωγής. Από αυτές τις πηγές, τα σπόρια μολύνουν εύκολα τους μαστούς και κατόπιν, κατά το άρμεγμα, το νοπό γάλα (Christiansson et al., 1999). Από εκεί και πέρα, μόλυνση ή επιμόλυνση μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε από τα επόμενα στάδια. Έτσι, τα κύτταρα των βάκιλλων έχουν την πολλαπλές ευκαιρίες να μολύνουν το γάλα, στην παραγωγή και στην αποθήκευση.

Η δυνατότητα μόλυνσης ξεκινάει από το άρμεγμα, εφόσον οι θηλές των αγελάδων είναι μολυσμένες. Αυτό βέβαια, με τη σειρά του υποδεικνύει τη μόλυνση τού ζώου από το περιβάλλον σε προηγούμενο στάδιο. Κατ' αντιστοιχία, υψηλοί αριθμοί του *B. cereus* στο παστεριωμένο γάλα βρέθηκε ότι είναι πιο συχνό όταν οι αγελάδες βόσκουν σε ανοιχτό πεδίο (Slaghuis et al., 1997), και αυτό αποδόθηκε στον αυξημένο πληθυσμό των σε σπορίων στο νοπό γάλα που προκύπτουν καταρχήν από τη μόλυνση των θηλών από το έδαφος (Christiansson et al., 1999).

Η σχετική, μελέτη του Christiansson και των συνεργατών (1999), έγινε σε ομάδα οκτώ αγελάδων κατά τη διάρκεια τριών διαφορετικών περιόδων, διάρκειας δύο εβδομάδων η καθεμία, από τον Ιούνιο έως τον Σεπτέμβριο, επί δύο έτη (Πειραματική φάρμα του Αγροτικού Παν. Σουηδίας, Uppsala).

Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε σπόρια συνδέθηκε σημαντικά με το βαθμό μόλυνσης των θηλών από το χώμα. Η υψηλή περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό και η χαμηλή εξάτμιση του νερού ήταν οι πιο σημαντικοί παράγοντες που συσχετίστηκαν με την υψηλή συγκέντρωση σπορίων. Το φορτίο του εδάφους σε σπόρια κυμάνθηκε από < 50 έως 380.000 ανά gr, ανάλογα με το χρόνο και το σημείο δειγματοληψίας. Ο εξοπλισμός του αρμέγματος δεν συνέβαλλε σημαντικά στην ένταση της μόλυνσης. Το περιεχόμενο των σπορίων στον αέρα κατά τη διάρκεια του αρμέγματος (< 100 cfu/m<sup>3</sup>) αλλά και στις ζωοτροφές (ενσίρωση, σανός, φρέσκο χόρτο και συμπυκνώματα) ήταν πολύ χαμηλά ώστε να κριθούν σημαντικά για τη τελική μόλυνση. Η περιεκτικότητα της κοπριάς σε σπόρια βρισκόταν επίσης σε χαμηλά επίπεδα. Ο προσδιορισμός του εδάφους ως η κύρια πηγή μόλυνσης επιβεβαιώθηκε περαιτέρω, με τη σύγκριση γενετικών αποτυπωμάτων δειγμάτων *B. cereus* από το έδαφος (Christiansson et al., 1999).

Ωστόσο, οι Vissers και οι συνεργάτες του, αναφέρουν όλα τα άλλα στοιχεία τού περιβάλλοντος των γαλακτοπαραγωγών ζώων που σταυλίζονται σε εσωτερικούς χώρους, ως πιθανές πηγές μόλυνσης του γάλακτος, είτε μέσω των θηλών των ζώων είτε απευθείας στο γάλα, κατά το άρμεγμα και την αποθήκευση του. Σημαντικό παράγοντα θεωρούν τις τροφές κάθε τύπου. Μέσα στις ταΐστρες, ο μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται και είναι εύκολο να έρθει σε επαφή με τις θηλές. Η κοπριά και η μηχανή αρμέγματος μπορούν επίσης να μολύνουν τις θηλές. Τελευταία στην αλυσίδα αναφέρουν τα δοχεία στα οποία φυλάσσεται το γάλα έως ότου παστεριωθεί (Vissers et al., 2007).

Στη μελέτη τους εκτίμησαν ότι όταν οι θηλές των ζώων είναι μολυσμένες με χώμα, τότε το 33% του γάλακτος που φυλάσσεται σε δεξαμενή περιέχει πάνω από  $3 \cdot \log(\text{σπόρια} / \text{lt γάλακτος})$ .

Όταν οι ζωοτροφές είναι η κύρια πηγή μόλυνσης, τότε το ποσοστό αυτό είναι μόνο 2 %. Με βάση τις προβλεπόμενες συγκεντρώσεις των σπορίων στις δεξαμενές υπολογίστηκε πως η μέση συγκέντρωση σπορίων στο νωπό γάλα που αποθηκεύεται στα δοχεία γάλακτος κατά τη διάρκεια βοσκής είναι  $3,5 \cdot \log(\text{σπόρια} / \text{lt γάλακτος})$ , ενώ κατά την διάρκεια σταυλισμού είναι  $2,1 \cdot \log(\text{σπόρια} / \text{lt γάλακτος})$ .

Εκτιμήθηκε κατόπιν ότι για τη διάρκεια της βοσκής τα αγροκτήματα μπορούν να επιτύχουν περίπου 99 % μείωση της μόλυνσης εάν ελαχιστοποιήσουν την μόλυνση των θηλών από το έδαφος και βελτιστοποιήσουν τον καθαρισμό των θηλών. Από την άλλη μεριά, μπορεί να επιτευχθεί μείωση της συγκέντρωσης των σπορίων κατά 60% κατά τη διάρκεια του σταυλισμού, εάν εξασφαλιστεί συγκέντρωση σπορίων στις τροφές κάτω από  $3 \cdot \log(\text{σπόρια} / \text{gr τροφής})$  και εάν το pH της τροφής είναι χαμηλότερο του 5. Με την τήρηση μόνο αυτών των μέτρων, οι ερευνητές θεωρούν ότι εξασφαλίζεται μειωμένη συγκέντρωση των σπορίων *B. cereus* στο νωπό γάλα, σε επίπεδα κάτω των  $3 \cdot \log(\text{σπόρια} / \text{lt γάλακτος})$ . (Vissers et al., 2007).

Διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί για την πρόβλεψη των μικροβιακών αποκρίσεων μέσα σε περιβάλλοντα τροφίμων. Επίσης, έχει κατασκευαστεί βάση δεδομένων που περιέχει τις μικροβιακές αποκρίσεις στα τρόφιμα και συσχετίζει την ανάπτυξη του βακτηρίου σε διάφορες τιμές του pH, με την πιθανότητα να αναπτυχθεί σε νωπό γάλα σε επίπεδα που το καθιστούν παθογόνο. Με το μοντέλο, έδειξαν πως υπάρχει θετική σχέση της απότομης ανάπτυξης του μικροβίου με τις χαμηλές τιμές θερμοκρασίας και pH, συνθήκες που υπάρχουν στα στάδια της παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων που δύνανται να οδηγήσουν σε συγκεντρώσεις του μικροβίου πάνω από  $10^5$  cfu/g και στην παραγωγή τοξινών στα προϊόντα του γάλακτος (Soleimaninanadegani, 2013).

Επιπλέον, τα μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της μείωσης της συγκέντρωσης των σπορίων, μέσω μέτρων και μεθόδων στο επίπεδο της κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης. Ένα μοντέλο προβλέπει τη συγκέντρωση των σπορίων στο γάλα, όταν η πηγή τους είναι το έδαφος, κάτι που σχετίζεται με τη διάρκεια βόσκησης των αγελάδων, ενώ ένα άλλο μοντέλο προβλέπει τη συγκέντρωση των σπορίων όταν αυτά προέρχονται κυρίως από ζωοτροφές, το οποίο σχετίζεται με συνθήκες κράτησης των αγελάδων σε εσωτερικούς χώρους.

Τα περισσότερα βακτηριακά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των σπορίων τους, μπορούν να αφαιρεθούν από το γάλα με φυγοκέντρηση σε περίπου 9.000 g. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή σαν βιοκάθαρση (bactofugation) και αφαιρεί περίπου το 3 % του γάλακτος, το οποίο καθιζάνει. Έχει προταθεί ωστόσο, διαδικασία ανάκτησης του ιζήματος. Η διαδικασία περιλαμβάνει θέρμανση του στους 135 °C για 3-4 sec και προσθήκη του σε γάλα που προορίζεται να γίνει τυρί. Η συνολική μέθοδος μπορεί να μειώσει και τον πληθυσμό των βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ, περίπου κατά 98 % (Daamen et al., 1986).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, έχουν γίνει σημαντικά βήματα προόδου στο σύστημα παραγωγής γάλακτος για την ενίσχυση της ποιότητας των προϊόντων από το αγρόκτημα μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή. Επιπλέον, η γαλακτοκομική βιομηχανία έχει αντιμετωπίσει την όποια ανεπάρκεια της εφοδιαστικής αλυσίδας, με συστήματα ελέγχου ποιότητας. Την παρουσία όμως του *B. cereus* στο επεξεργασμένο γάλα θα την δούμε στο επόμενο τμήμα.

### 3.5 Η παρουσία του *B. cereus* στο παστεριωμένο γάλα

Ακόμα και όταν οι αγελάδες στεγάζονται σε εσωτερικούς χώρους, χωρίς να εκτίθενται σε χόμα, οι αριθμοί των σπορίων στο τελικό, παστεριωμένο γάλα μπορεί να βρεθούν υψηλοί. Ωστόσο, αυτό πιθανόν προκαλείται μετά τη συλλογή του γάλακτος από τις γαλακτοπαραγωγικές μονάδες, με μόλυνση του στο εργοστάσιο των γαλακτοκομικών προϊόντων (Svensson et al., 2000, Lin et al., 1998).

Κατά την παστερίωση του γάλακτος, και ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται, τα σπόρια του *B. cereus* επιβιώνουν. Τα ψυχρότροφα στελέχη περνούν αργότερα σε βλαστική φάση, αν το γάλα αποθηκευτεί σε  $T > 6$  °C. Η ανάπτυξη των βακτηρίων περιορίζει χρονικά τη δυνατότητα διατήρησης του, πριν γίνει ακατάλληλο για κατανάλωση (Griffiths, 1992).

Με τη μεγάλη ποικιλία του σε γονίδια για το μεταβολισμό των πρωτεϊνών (Ivanova et al., 2003), ο *B. cereus* είναι άριστα προσαρμοσμένος για ανάπτυξη στο γάλα και τα σπόρια του είναι ικανά να βλαστάνουν στο γάλα με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από ό,τι σπόρια άλλων βακίλλων (Wilkinson & Davies, 1974). Έτσι, παρότι τα σπόρια του *B. cereus* είναι συνήθως, λιγότερο άφθονα στο παραγόμενο γάλα από όσο τα σπόρια άλλων βακίλλων (π.χ. των *B. licheniformis*, *B. sphaericus* και *B. subtilis*), μπορούν να βλαστήσουν γρήγορα και να αναπτυχθούν μετά την παστερίωση, ξεπερνώντας έτσι, «εύκολα», τους πληθυσμούς των άλλων βάκιλλων (Larsen & Jorgensen, 1999). Στην πραγματικότητα τα σπόρια του *B. cereus* μπορούν να βλαστήσουν καλύτερα στο παστεριωμένο γάλα από όσο στο νωπό γάλα (Wilkinson & Davies, 1974).

Επιπλέον, τα σπόρια του *B. cereus* είναι πολύ υδρόφοβα (Koshikawa et al., 1989) και προσκολλώνται στις επιφάνειες του βιομηχανικές εξοπλισμού των μονάδων της επεξεργασίας του γάλακτος (Andersson et al., 1995).

Η προσκόλληση των σπορίων αυξάνει την αντοχή τους στη θερμότητα (Simmonds et al., 2003) κι ενώ οι θερμικές επεξεργασίες έχουν σχεδιαστεί για να καθαρίσουν τον εξοπλισμό (τις επιφάνειες των σκευών), μπορεί πρακτικά να αυξήσουν την υδροφοβικότητα των σπορίων και μέσω αυτού να αυξήσουν ακόμη περισσότερο την προσκόλληση τους στα σκεύη (Wienczek et al., 1990). Τα σπόρια που έχουν προσκολληθεί στις επιφάνειες των σκευών, μπορούν να βλαστήσουν, να πολλαπλασιαστούν και να παράξουν εκ νέου σπόρια (Andersson et al., 1995), με αποτέλεσμα διαρκή μόλυνση σε βάθος χρόνου (Eneroth et al., 2001). Καθώς η παστερίωση είναι ανεπαρκής για να εξοντώσει τα σπόρια, ευνοείται τελικά ο ανταγωνισμός τους με τα κύτταρα των άλλων βακτηρίων που αρχικά είναι κυρίαρχα στο νωπό γάλα (Holm et al., 2004, Lafarge et al., 2004).

Σε συμφωνία με τα παραπάνω οι Eneroth και συνεργάτες παρατήρησαν αλλοίωση παστεριωμένου γάλακτος από θερμοανθεκτικά βακτήρια και σπόρια, συμπεριλαμβανομένου και του *B. cereus*. Η παρουσία αυτών των βακτηρίων στο παστεριωμένο γάλα μπορεί να δικαιολογηθεί από την παρουσία θερμοανθεκτικών σπορίων λόγω ανεπαρκούς καθαρισμού και υγιεινής στις σωληνώσεις και τον εξοπλισμό συσκευασίας (Eneroth et al., 2001).

Σε ανάλογη, μεταγενέστερη μελέτη ο *B. cereus* απομονώθηκε στο 71% των δειγμάτων εμπορικού παστεριωμένου γάλακτος, ύστερα από επώαση στους 30 °C για 6 ώρες (Te Giffel et al., 1996).

Στατιστική μελέτη που έγινε στην Ολλανδία, με συμπλήρωση ερωτηματολογίων, έδειξε ότι στα νοικοκυριά το παστεριωμένο γάλα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία μεταξύ 5-13 °C και καταναλώνεται 2-12 ημέρες μετά την παστερίωση. Το γάλα που οι καταναλωτές θεωρούν, με εμπειρικά κριτήρια (γεύση, όψη κ.λπ.) ότι έχει «αλλοιωθεί» δεν καταναλώνεται. Τη συλλογή των ερωτηματολογίων ακολούθησε πειραματική διαδικασία, στην οποία παστεριωμένο γάλα του εμπορίου αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασίες 6, 8, 10 και 12 °C και κατόπιν εξετάστηκε για την παρουσία спорίων και βλαστικών κυττάρων του *B. cereus*. Η κατανομή των απαντήσεων σε συνδυασμό με τα πειραματικά αποτελέσματα οδηγεί στην εκτίμηση ότι στα ιδιωτικά νοικοκυριά της Ολλανδίας, το 4 % του συνόλου των μερίδων γάλακτος που καταναλώνονται περιέχουν περισσότερο από  $10^6$  cfu/ml του *B. cereus* και το 7% περιέχουν περισσότερο από  $10^5$  cfu/ml.

Θεωρώντας τεκμηριωμένο πως η κατανάλωση παστεριωμένου γάλακτος που περιέχει πάνω από  $10^5$  cfu/ml μπορεί να προκαλέσει ασθένεια στον καταναλωτή, οι συγγραφείς της έρευνας πρότειναν πως η ημερομηνία λήξης του παστεριωμένου γάλακτος που παράγεται στην Ολλανδία, μπορεί να οριστεί στις 7 ημέρες μετά την παστερίωση και με τήρηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης / συντήρησης στους 7 °C. Οι ίδιες συνθήκες είχαν συμφωνηθεί και στο παρελθόν, ωστόσο οι ερευνητές θεωρούν ότι η συζήτηση μεταξύ των παραγωγών και των καταναλωτών καθίσταται αναγκαία κατά χρονικά διαστήματα, καθώς νέα στοιχεία έρχονται στο φως και προκειμένου να επικαιροποιούνται οι κανόνες ασφαλείας για την αποφυγή της έκθεσης των καταναλωτών σε συγκεντρώσεις ικανές να προκαλέσουν την νόσο (Notermans et al., 1997).

Αναφερθήκαμε ήδη στη ιδιαίτερη σημασία που δίνεται για την ασφάλεια των βρεφικών τροφών. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Γερμανία και δημοσιεύτηκε το 1994, συλλέχθηκαν 261 δείγματα βρεφικών τροφών, παρασκευασμένων ή συσκευασμένων, που είχαν κατανεμηθεί σε 17 χώρες και ελέγχθηκαν για την ύπαρξη *B. cereus*. Το 54% από αυτά βρέθηκαν θετικά, σε επίπεδα που κυμάνθηκε από 0,3 έως 600 κύτταρα ανά γραμμάριο προϊόντος. Τιμές άνω των 10/g βρέθηκαν σε 27 δείγματα (~10%). Τα περισσότερα από τα θετικά δείγματα (44%) περιείχαν 0,3 ως 10 κύτταρα *B. cereus* /g. Τέσσερα δείγματα (1,5%) ήταν μολυσμένα με πάνω από 100 κύτταρα /g, φθάνοντας έτσι το επίπεδο των 600 κ./g. Όταν ταξινομήθηκαν σε διαφορετικά είδη τροφών, το 50% των δειγμάτων γάλακτος σε σκόνη για νεογνά αποδείχθηκε μολυσμένο, καθώς και το 69% των τροφών που βασίζονταν στη σόγια και το 92% ειδικών διαιτητικών τροφών.

Συγκρίνοντας αυτά τα αποτελέσματα με παλιότερες μελέτες των ετών 1982 & 1983, η έρευνα έδειξε ότι το ποσοστό των μολυσμένων δειγμάτων από τη Γερμανία αυξήθηκε: από 31% σε 70% στις σκόνες γάλακτος για νεογνά, από 28% σε 55% στις σκόνες γάλακτος δεύτερης βρεφικής ηλικίας και από 40% σε ~100% στις διαιτητικές τροφές. Πάντως, ο αριθμός των βακτηρίων που ανιχνεύτηκαν ανά μολυσμένο δείγμα, δεν ήταν ανάλογα αυξημένος σε σχέση με τον αριθμό των βακτηρίων που βρέθηκαν παλαιότερα, καθώς η υψηλότερη τιμή ήταν 460 /g το 1982/83, ενώ 600 /g το 1992. (Becker et al., 1994)

Αφήσαμε για το τέλος την συσχέτιση των τροφιμογενών ασθενειών και της παρουσίας *B. cereus* στο γάλα που φτάνει στον καταναλωτή.

Λαμβάνοντας υπόψη το υψηλό ποσοστό γάλακτος που καταναλώνεται παγκόσμια (περίπου  $10^9$ - $10^{10}$  μερίδες / έτος) και την απουσία γενικά αποδεκτών επιδημιολογικών στοιχείων που να συνδέουν τον *B. cereus* που βρίσκεται στο γάλα με την εκδήλωση τροφιμογενών ασθενειών, καθίσταται αναγκαία η εξέταση της σχέσης δόσης και απόκρισης, μεταξύ του μικροοργανισμού και του ανθρώπου-καταναλωτή.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων από πειράματα αποθήκευσης - λαμβάνοντας υπόψιν την χειρότερη δυνατή περίπτωση -, παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση των παραμέτρων της μόλυνσης: τη θερμοκρασία αποθήκευσης, τη διάρκεια και τον βαθμό έκθεσης του ανθρώπου στον *B. cereus*. Παρόμοιες πληροφορίες λαμβάνονται με την εφαρμογή μοντέλων πρόβλεψης, οι οποίες επιπλέον επιτρέπουν την εκτίμηση των αρχικών αριθμών σπορίων που μπορεί να θεωρηθούν επικίνδυνοι για την πρόκληση τροφιμογενούς ασθένειας στους καταναλωτές .

Οι σχετικές έρευνες είναι όμως, ακόμα, υπό εξέλιξη.

### **3.6 Τυροκομικά προϊόντα**

Πρόσθετα με τις γενικές μεθόδους προστασίας των γαλακτοκομικών προϊόντων από την μόλυνση με βάκιλλους, οι τυροκόμοι μπορούν να προσθέτουν σε υψηλό τίτλο, οξυγαλακτικά βακτήρια (βακτήρια γαλακτικού οξέος) στο ακατέργαστο γάλα, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του, η παρουσία των οποίων μειώνει το ρυθμό αύξησης των ψυχρόφιλων μικροβίων. Για το νωπό, ακατέργαστο γάλα, τα ελαττώματα που προκύπτουν από την παραγωγή αερίου από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, μπορούν να μειωθούν εάν γίνει αλάτιση του τυροπήγατος πριν την εμβάπτιση σε άλμη και μειώνοντας τη θερμοκρασία της άλμης κάτω από τους 12 °C. Η παστερίωση επίσης, εξαλείφει τον κίνδυνο από τα περισσότερα ψυχρόφιλα βακτήρια, τα κολοβακτηρίδια και πολλούς γαλακτοβάκιλλους και έτσι τυριά που παρασκευάζονται από παστεριωμένο γάλα έχουν χαμηλό ελάχιστο αέριο μέσα τους (που οφείλεται στα οξυγαλακτικά).

### **3.7 Τροφιμογενείς νόσοι λόγω *B. cereus* στα γαλακτοκομικά προϊόντα**

Σειρά κρουσμάτων τροφιμογενούς νόσου λόγω *B. cereus* έχουν δημοσιευθεί κι εδώ θα γίνει μία προσπάθεια παρουσίασης των. Ο πίνακας 5 παρουσιάζει όλα τα περιστατικά που περιγράφονται παρακάτω.

Στη Μεγάλη Βρετανία, έως τον Ιούλιο 2014, έχουν αναφερθεί 19 επιβεβαιωμένα κρούσματα μόλυνσης βρεφών (εκ των οποίων τρία απεβίωσαν) από *B. cereus* που ήταν παρών σε παρασκευάσματα τροφής για βρέφη (total parenteral nutrition, TPN) (HPA, 2014).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και μία πρόσφατη μελέτη από τη Γαλλία, στην οποία περιγράφηκαν δύο κρούσματα εντερικής μόλυνσης λόγω *B. cereus* σε πρόωρα βρέφη. Το μικρόβιο δεν απομονώθηκε στη μονάδα εντατικής θεραπείας του νοσοκομείου (από το περιβάλλον) όπου βρίσκονταν τα βρέφη. Οι ερευνητές όμως, απομόνωσαν το μικρόβιο, τόσο από τον εντερικό σωλήνα των βρεφών όσο και από το συλλεγμένο μητρικό γάλα το οποίο έδιναν οι μητέρες τους. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν πως κατά τη συλλογή του γάλακτος από τις μητέρες, το γάλα μολύνθηκε με ακόλουθη μόλυνση των βρεφών και άρα συνέστησε την αυξημένη προσοχή τόσο κατά τη συλλογή, όσο και κατά την χορήγηση του μητρικού γάλακτος σε τέτοιους πληθυσμούς αυξημένης επικινδυνότητας, όπως τα πρόωρα βρέφη που βρίσκονται σε μονάδα εντατικής θεραπείας πρόωρων σε νοσοκομεία (Decousser et al., 2013).

Στον Καναδά τα έτη 1988 και 1989 αντίστοιχα, ανακοινώθηκαν κρούσματα από μόλυνση λόγω *B. cereus* που ανιχνεύθηκε σε γαλακτοκομικά προϊόντα (FPS, 2002). Στην πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση (1988), 35 άτομα νόσησαν λόγω κατανάλωσης μιλκσέικ σε κατάσταση φαστ φουντ στο Οντάριο ενώ μερικές μέρες αργότερα ένα ακόμη άτομο νόσησε μετά από κατανάλωση γάλακτος. Έναν χρόνο αργότερα το έτος 1989, 74 άτομα νόσησαν λόγω κατανάλωσης γάλακτος.

Στις ΗΠΑ τα έτη 1998-2008, ένα κρούσμα καταγράφηκε, το οποίο συσχετίστηκε με την ύπαρξη *B. cereus* σε γαλακτοκομικά προϊόντα χωρίς όμως να επιβεβαιωθεί η αιτιολογία της μόλυνσης (Bennett et al., 2013). Αντίθετα, η ίδια μελέτη περιγράφει 38 επιβεβαιωμένα και 115 καθ'υποψίαν κρούσματα οφειλόμενα στον *B. cereus* κατά την ίδια χρονική περίοδο. Η πλειοψηφία των κρουσμάτων αυτών οφειλόταν σε κατανάλωση μολυσμένου κρέατος (ειδικά πουλερικών) και ρυζιού (Bennett et al., 2013).

Στη Γαλλία, σε 15 εστίες μόλυνσης από *B. cereus* ασθένησαν 245 άτομα, κατά την περίοδο 1999-2000, με 24 άτομα να νοσηλεύονται (Haeghebaert et al., 2002). Στη μελέτη δεν περιγράφεται το είδος των τροφών που καταναλώθηκαν. Η μόλυνση από *B. cereus* όμως, αντιστοιχούσε στο 2,8% του συνόλου των τροφιμογενών μολύνσεων που είχαν καταγραφεί κατά την περίοδο αυτή.

Πίνακας 5: Τροφιμογενή κρούσματα από *B. cereus* σε γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα

Χρόνος	Χώρα	Αριθ. Κρουσμάτων (άτομα που νόσησαν)	Προϊόν	Πηγή
2014	Αγγλία	1(19)	Τροφή για βρέφη	HPA, 2014
2013	Γαλλία	1(2)	Συλλεγμένο μητρικό γάλα	Decousser et al., 2013
1998-2008	ΗΠΑ	1 (υποψία <i>B. cereus</i> )	Γαλακτοκομικά προϊόντα	Bennett et al., 2013
2002-2003	Γαλλία	2	Τυρί	De Buyser et al., 2004
1999-2000	Γαλλία	15/245	-	Haeghebaert et al., 2002
1988	Καναδάς/Οντάριο	2/37	Μιλκσέικ/Γάλα	FPS, 2002
1989	Καναδάς	1/74	Γάλα	FPS, 2002
1989	Ισπανία/Ολλανδία	3	Γαλακτοκομικά προϊόντα	Van Netten et al., 1990
1991	Ιαπωνία	1(201)	Γάλα υψηλής παστερίωσης	Christiansson, 1992
1993	Ιαπωνία	1	Γάλα υψηλής παστερίωσης	Shinagawa, 1993

Στην περίοδο 2002-2003, σε σύνολο 25 τροφιμογενών επιδημιών λόγω γαλακτοκομικών προϊόντων στη Γαλλία, ο *B. cereus* ταυτοποιήθηκε σαν υπεύθυνο αίτιο για τη μόλυνση σε 2 περιπτώσεις, ενώ το εμπλεκόμενο μολυσμένο τρόφιμο ήταν τυρί (De Buysse et al., 2004).

Σε μία μελέτη που έγινε για τρεις επιδημίες λόγω *B. cereus* σε γαλακτοκομικά προϊόντα, ανιχνεύθηκαν ψυχότροφα στελέχη *B. cereus* τόσο σε παστεριωμένο γάλα όσο και γλυκά τύπου μους (van Netten et al., 1990).

Μία άλλη μεγάλη επιδημία εμετικού συνδρόμου από *B. cereus* λόγω κατανάλωσης μολυσμένου γάλακτος UHT (ultra-high temperature sterilized) αναφέρθηκε στην Ιαπωνία, το 1993 (Shinagawa, 1993).

Μία μελέτη που περιγράφει μία επιδημία που εκδηλώθηκε στην Ιαπωνία το 1991, αφορούσε μόλυνση και κατανάλωση γάλακτος υψηλής παστερίωσης και την ακόλουθη μόλυνση 201 ατόμων (Christiansson, 1992).

### 3.8 Προληπτικά μέτρα

Τα σπόρια του *B. cereus* είναι ιδιαίτερα θερμοαθεκτικά, κι έτσι ακόμη και η υψηλή θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στο μαγείρεμα δεν αρκεί για να τα εξοντώσει, τη στιγμή που οι μέσες θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται στη μαγειρική είναι ικανές να καταστρέψουν την πλειοψηφία των παθογόνων στα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των βλαστικών κυττάρων του *B. cereus*. Η αύξηση της θερμοαθεκτικότητας των σπόρων επιτυγχάνεται με υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και τη σταδιακή θέρμανση, ενώ μείωση της επιτυγχάνεται σε όξινο περιβάλλον. Συνιστάται επίσης η εφαρμογή συγκεκριμένων πρακτικών στα σφάγια για να απομακρυνθούν τα βακτήρια που βρίσκονται στα κόπρινα, την απολύμανση επιφανειών με υποχλωριώδη και την χρήση μίας διαδικασίας θέρμανσης για την καταστροφή των βλαστικών κυττάρων με παράλληλη χρήση μίας ταχείας διαδικασίας ψύξης για την αποφυγή εκβλάστησης των σπόρων.

Ο καθαρισμός των επιφανειών και των μηχανημάτων είναι ένα σημαντικό βήμα για να αποφευχθεί η ικανότητα των σπορίων να αναπτυχθούν. Η χρήση των υποχλωριωδών με pH <8 συνιστάται τουλάχιστον στους αγωγούς που υπάρχουν στο χώρο, εάν η εφαρμογή τους στις επιφάνειες δεν είναι δυνατή. Αυτή η πρακτική μπορεί να ελαττώσει δραστικά τον αριθμό των σπόρων, καθώς η εφαρμογή ελαφρών οξέων στους 30-40 °C για 20-30 λεπτά μπορεί να δράσει σαν εναλλακτικός τρόπος αντί χρήσης χημικών που πιθανά μπορούν να βλάψουν τα μηχανήματα παστερίωσης γάλακτος ή άλλων συσκευών (Andersson et al., 1995). Οι σπόροι του *B. cereus* έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στις επιφάνειες ανοξειδωτου ατσάλιου που συχνά χρησιμοποιείται στην κατασκευή επιφανειών στις εγκαταστάσεις βιομηχανίας τροφίμων και έτσι αυτές οι επιφάνειες μπορεί να γίνουν μία δεξαμενή σπόρων *B. cereus* και αυτό να είναι ένα τεράστιο πρόβλημα για τη βιομηχανία. (Peng et al, 2001). Η παρουσία σπόρων στις επιφάνειες των εγκαταστάσεων καθιστά δύσκολο τον έλεγχο τους. Ως εκ τούτου, συχνά είναι απαραίτητη η εντατικοποίηση των καθαρισμών για την παροχή καθαρών και ασφαλών προϊόντων στους καταναλωτές (Lelieveld, 1985, Pontefract, 1991).

Για τα τρόφιμα, συνιστάται η συντήρηση των ζεστών φαγητών σε θερμοκρασίες άνω των 60 °C και των κρύων τροφών κάτω από τους 4 °C.

Επιβάλλεται το πλύσιμο των χεριών, των εργαλείων με σαπούνι μετά την επαφή με ωμό κρέας ή πουλερικά, ή πριν την παρασκευή γεύματος .

Είναι σημαντικό να μαγειρεύεται το κρέας και τα πουλερικά για αρκετή ώρα, ενώ πρέπει τα περισσεύματα του φαγητού να ψύχονται αμέσως.

Οι ελάχιστα απαιτούμενες πρακτικές υγιεινής για τις εγκαταστάσεις χειρισμού και τυποποίησης τροφίμων είναι οι εξής:

1. Καθιέρωση αυστηρών τυποποιημένων διαδικασιών λειτουργίας για την κάθε εγκατάσταση.
2. Έλεγχος σε κάθε εγκατάσταση από τις αρχές ελέγχου σχετικά με την ασφάλεια πάνω στα τρόφιμα και τη συμμόρφωση με τους νόμους και τους κανονισμούς. Καθώς υπάρχει ένα μικρό ποσοστό διακύμανσης ανάμεσα στις διάφορες περιοχές ως προς τους νόμους συνιστάται η λήψη καθοδήγησης από την τοπική αρχή για ορθή πληροφόρηση.
3. Εκτός από την γνώση και την τήρηση των αυστηρών κανόνων υγιεινής σε κάθε εγκατάσταση, είναι απαραίτητο να τεθούν σημεία ελέγχου για κάθε λειτουργία που λαμβάνει χώρα μέσα στην εγκατάσταση, όπως για παράδειγμα για την παραλαβή, την αποθήκευση των τροφίμων και των διαφόρων συστατικών. Επιπλέον, εάν η εγκατάσταση παρασκευάζει ή επεξεργάζεται τρόφιμα περαιτέρω, τότε πρέπει να τηρούνται οι αντίστοιχοι κανονισμοί.

Παραδείγματα οδηγιών είναι η συντήρηση πιθανά επικινδύνων τροφίμων σε θερμοκρασίες κάτω των 4 °C, η παραλαβή τους να γίνεται σε θερμοκρασία τουλάχιστον 6 °C, να μην υπάρχει κάποια ένδειξη πως τρόφιμα αυτής της κατηγορίας έλυσαν στη διάρκεια της μεταφοράς τους. Η ενδεδειγμένη και πλέον σίγουρη μέθοδος για την αποφυγή τροφιμογενών νόσων από *B. cereus* είναι το σωστό και επαρκές μαγείρεμα των τροφών και η μετέπειτα ταχεία ψύξη τους εάν δεν πρόκειται να καταναλωθούν γρήγορα. Μία σημαντική αιτία τροφιμογενών μολύνσεων από *B. cereus* είναι η λανθασμένη συντήρηση παρασκευασμένων τροφίμων.

Το αρχικό μαγείρεμα των τροφών πρέπει να γίνει έτσι ώστε εσωτερικά η τροφή να έχει τουλάχιστον θερμοκρασία 62-63 °C και πάνω για τουλάχιστον 15 δευτέρα και η τροφή πρέπει μετέπειτα να διατηρηθεί σε θερμοκρασία 60 °C ή υψηλότερη, να ψυχθεί ακόλουθα και να ξαναζεσταίνεται σε θερμοκρασία τουλάχιστον 63°C. Σε ό,τι αφορά την αποθήκευση τροφίμων, τα κατεψυγμένα τρόφιμα πρέπει να παραμένουν κατεψυγμένα έως τη χρήση τους και πρέπει να ξεπαγώνουν σε θερμοκρασία 5°C σε όσο χρόνο απαιτείται. Εναλλακτικά, μπορεί να ξεπαγωθούν και κάτω από τρεχούμενο νερό σε θερμοκρασία κάτω των 21 °C.

Κάθε μαγειρεμένο προϊόν πρέπει να ψύχεται επαρκώς αλλά και να σημαίνεται ευκρινώς.

Η προσωπική υγιεινή είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η φράση 'πλύνε τα χέρια σου' αποτυπώνει απλά μία ορθή μέθοδο για την αποφυγή τροφιμογενών νόσων καθώς κύρια αιτία τους είναι η έλλειψη στοιχειώδους προσωπικής υγιεινής. Μέσω των βρώμικων χεριών, η τροφή μπορεί να μολυνθεί και τα μικρόβια να μεταφερθούν μέσα στον οργανισμό. Το πλύσιμο των χεριών δεν



πρέπει να γίνεται γρήγορα αλλά προσεκτικά και σε όλο το χέρι. Κάθε φορά που ένα άτομο που παρασκευάζει φαγητό έρχεται σε επαφή με εργαλεία ή αντικείμενα ή ακουμπά κάτι άλλο (π.χ το πρόσωπο του/της) που δεν αποτελούν κομμάτι της διαδικασίας παρασκευής του γεύματος, πρέπει να ξαναπλένει τα χέρια του (Schneider et al., 2004)

Ακόμη και εάν έχουν ληφθεί πολλά προληπτικά μέτρα για την αποφυγή ανάπτυξης των σπόρων αλλά και των βλαστικών κυττάρων του *B. cereus*, είναι σημαντικό να κρατηθεί ο αρχικός αριθμός κυττάρων σε χαμηλά επίπεδα στις όποιες τροφές ώστε να μην δίνεται η δυνατότητα στο βακτήριο να δημιουργεί biofilm στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφών.

Τέλος, να αναφέρουμε ότι η επιστήμη της μικροβιολογίας, πέρα από την έρευνα στο πεδίο και την εκτέλεση πειραμάτων, χρησιμοποιεί την κατασκευή μοντέλων, για να προβλέπει βάσει αυτών, τη μικροβιακή αλλοίωση των προϊόντων τροφίμων (προορητική μικροβιολογία). Η δυνατότητα πρόβλεψης καθιστά πιο εύκολη και γρήγορη την εκτίμηση του μικροβιακού ρίσκου στα τρόφιμα, σε κάθε επί μέρους στάδιο παραγωγής, με αποδεκτή έως υψηλή ακρίβεια.

### 3.9 Νομοθεσία

Για την προστασία του καταναλωτή, στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπάρχει νομοθεσία που υιοθετεί τη φιλοσοφία του HACCP και καθορίζει τις απαιτήσεις για την υγιεινή την ασφάλεια των τροφίμων. Αρχικά, η νομοθεσία ορίζει τα μικρόβια ανάλογα και με τη δυνατότητα πρόκλησης νόσου (πχ. η *Salmonella* είναι πιο επικίνδυνη από τον *B. cereus*) και φυσικά ορίζει και τα επιτρεπτά όρια ύπαρξης μικροβίων σε κάθε τρόφιμο ώστε να θεωρούνται αυτά ασφαλή για κατανάλωση. Ο στόχος είναι πάντα η μείωση της επικινδυνότητας των κινδύνων στα τρόφιμα.

Ο *B. cereus* ορίζεται σαν μέτριας επικινδυνότητας και εξάπλωσης μικρόβιο με περιορισμένη εξάπλωση και τα όρια της παθογένειας του είναι  $3,4 \times 10^4$  -  $9,5 \times 10^8$  μικροοργανισμών ανά γραμμάριο τροφίμου. Τα επιτρεπτά όρια πάντως που χρησιμοποιούνται σαν κριτήρια για χρήση σε τελικό προϊόν είναι  $< 10^1$  -  $10^2$  /g τροφίμου.

Η σημερινή νομοθεσία περιλαμβάνει τον κανονισμό 852/2004/EK 'για την Υγιεινή των Τροφίμων'. Με αυτόν τον κανονισμό, καθιερώνεται σαν υποχρεωτική η κατάρτιση και εφαρμογή προγραμμάτων και διαδικασιών ασφαλείας των τροφίμων με βάση τις αρχές του συστήματος HACCP. Ο κανονισμός 852/2004/EK καθιερώθηκε σα νόμος τους Ελληνικού Κράτους από την 1/1/2006 και καλύπτει τις υποχρεώσεις μίας επιχείρησης ως προς την ασφάλεια και την υγιεινή των τροφίμων.

Ο κανονισμός 2073/2005/EK 'περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα' καθορίζει τα μικροβιολογικά όρια για συγκεκριμένα τρόφιμα και προσφέρει σαφείς οδηγίες για τις δειγματοληψίες και την μέθοδο αναφοράς για κάθε μικροοργανισμό.

Σχετικά με το *B. Cereus* δεν υπάρχουν αντίστοιχες διατάξεις για όλα τρόφιμα.

Στον κανονισμό αυτό ορίζεται πως για τα παρασκευάσματα για βρέφη σε σκόνη και τρόφιμα που προορίζονται για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, για βρέφη ηλικίας κάτω των έξι μηνών πρέπει να γίνεται δειγματοληψία από αριθμό 5 μονάδων δειγματοληψίας (n) και αριθμό 2 μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεταξύ m και M (c). Τα όρια είναι από  $m < 50$  cfu/g έως  $M < 500$  cfu/g και τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά, εάν όλες οι τιμές που παρατηρούνται είναι  $\leq m$ ,

αποδεκτά, εάν ένας μέγιστος αριθμός τιμών  $c/n$  είναι μεταξύ  $m$  και  $M$  και οι υπόλοιπες τιμές που παρατηρούνται είναι  $\leq m$  και τέλος είναι μη ικανοποιητικά, εάν μία ή περισσότερες από τις τιμές που παρατηρούνται είναι  $> M$  ή αριθμός τιμών μεγαλύτερος από  $c/n$  είναι μεταξύ  $m$  και  $M$ .

Το στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο είναι στο τέλος της διαδικασίας παρασκευής του τροφίμου, ενώ σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων, πρέπει να γίνουν βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής, πρόληψη της επαναμόλυνσης, επιλογή των πρώτων υλών. (Πίνακας 6)

Πίνακας 6: Κριτήρια ασφαλείας για το *B. Cereus* σύμφωνα με το Κανονισμό 2073/2005/EK (Πηγή : Καν. 2073/2005/EK)

Κατηγορία Τροφίμων		Παρασκευάσματα για βρέφη σε σκόνη και τρόφιμα που προορίζονται για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, για βρέφη ηλικίας κάτω των έξι μηνών.
Μικροοργανισμοί		Πιθανός <i>B. cereus</i>
Πλάνο δειγματοληψίας	$n^*$	5
	$c^*$	1
Όρια	$m^*$	50cfu/g
	$M^*$	500cfu/g
Αναλυτική μέθοδος αναφοράς		EN/ISO 7932
Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο		Τέλος της διαδικασίας παρασκευής
Μέτρα σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων		Βελτιώσεις στην υγιεινή της παραγωγής. Πρόληψη της επαναμόλυνσης. Επιλογή των πρώτων υλών

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> : Συμπεράσματα - Σύνοψη

Η ευρεία ύπαρξη του *B. cereus* στο περιβάλλον και η ικανότητα των σπορίων να επιβιώνουν σε συνθήκες μακροχρόνιας αποθήκευσης σε αποξηραμένα προϊόντα, καθώς και η θερμική τους αντίσταση, συντελούν στο να εξηγηθεί το μεγάλο φάσμα τροφίμων που έχουν ενοχοποιηθεί στο παρελθόν για κρούσματα τροφιμογενών νοσημάτων από το βακτήριο *B. cereus*. Ως εκ τούτου, είναι ασφαλές να θεωρείται πως ο *B. cereus* είναι συνεχώς παρών και αντίστοιχα να λαμβάνονται μέτρα προφύλαξης για την πρόληψη της ανάπτυξης του κατά το χειρισμό των τροφίμων. Μεταξύ άλλων, τα μέτρα αυτά περιλαμβάνουν :

α) την επίτευξη του ελάχιστου δυνατού χρόνου μεταξύ της λήψης των πρώτων υλών, της παρασκευής, της απόδοσης στον καταναλωτή και της κατανάλωσης κάθε τροφίμου,

β) όπου η αποθήκευση είναι απαραίτητη, τη χρήση ταχείας, επαρκούς και ελεγχόμενης καταψύξης, σε θερμοκρασία κάτω από  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , προκειμένου να μην πολλαπλασιάζεται ο οργανισμός.

Η παρουσία του *B. cereus* στο παστεριωμένο γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντική έγνοια για τον κλάδο της γαλακτοκομίας διότι, αφενός το γάλα μπορεί να οδηγηθεί σε αλλοίωση, το οποίο με τη σειρά του έχει οικονομικό κόστος για τους παραγωγούς και δεύτερο, μα πολύ περισσότερο, επειδή μπορεί να οδηγήσει και σε τροφιμογενείς νόσους. Η συζήτηση λοιπόν, ανάμεσα στους εμπλεκόμενους φορείς διεξάγεται ως προς την ασφάλεια του γάλακτος.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, έχουν γίνει σημαντικά βήματα προόδου στο σύστημα παραγωγής γάλακτος για την ενίσχυση της ποιότητας των προϊόντων από το αγρόκτημα μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή. Επιπλέον, η γαλακτοκομική βιομηχανία έχει αντιμετωπίσει την όποια ανεπάρκεια της εφοδιαστικής αλυσίδας, με συστήματα ελέγχου ποιότητας.

Σημαντικές ωστόσο έρευνες για την ασφάλεια των προϊόντων βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη ή υπό σχεδιασμό.

Η σύγχρονη έρευνα στοχεύει στην κατανόηση των μηχανισμών του *B. cereus* για επιβίωση και ανάπτυξη και για τους παράγοντες που ρυθμίζουν το πέρασμά του από την βλαστική μορφή στη μορφή του σπορίου και το αντίστροφο. Τα παραπάνω μελετώνται όχι μόνο στο φυσικό πεδίο, αλλά ιδιαίτερα στα διάφορα σημεία της αλυσίδας παραγωγής και επεξεργασίας των τροφίμων (π.χ.: αγροκτήματα, ζωοτροφικές μονάδες, βιομηχανίες τροφίμων, χώροι αποθήκευσης, μονάδες μεταφοράς κ.λπ.) στα οποία το βακτήριο μπορεί να παραμένει και δύναται να αναπτυχθεί.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahrned, A. A.-H., Moustafa, M. K. & Marth, E. H. 1983. "Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products". **J. Food Protect**, 46, 126- 128.
- Andersson, A., Ronner, U. & Granum, P. E. 1995. "What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?" **International Journal of Food Microbiology** 28, 145-55.
- Barrie, D., Wilson, J. A., Hoffman, P. N. & Kramer, J. M. 1992. "*Bacillus cereus* meningitis in two neurosurgical patients: an investigation into the source of the organism". **J Infect**, 25, 291-7.
- Becker, H., Schaller, G., Von Wiese, W. & Terplan, G. 1994. "*Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products". **Int J Food Microbiol**, 23, 1-15.
- Beecher, D. J., Olsen, T. W., Somers, E. B. & Wong, A. C. 2000. "Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis". **Infect Immun**, 68, 5269-76.
- Beecher, D. J. & Wong, A. C. 1994. "Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits". **Appl Environ Microbiol**, 60, 4614-6.
- Bennett, S. D., Walsh, K. A. & Gould, L. H. 2013. "Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*--United States, 1998-2008". **Clin Infect Dis**, 57, 425-33.
- Blakey, L. J. & Priest, F. G. 1980. "The occurrence of *Bacillus cereus* in some dried foods including pulses and cereals". **J Appl Bacteriol**, 48, 297-302.
- Bottone, E. J. 2010. "*Bacillus cereus*, a volatile human pathogen". **Clin Microbiol Rev**, 23, 382-98.
- Brillard, J. & Lereclus, D. 2007. "Characterization of a small *PlcR*-regulated gene co-expressed with cereolysin O". **BMC Microbiol**, 7, 52.
- CDC 2013. Surveillance for foodborne disease outbreaks--United States, 2009-2010. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 62, 41-7.
- Ceuppens, S., Timmery, S., Mahillon, J., Uyttendaele, M. & Boon, N. 2013. "Small *Bacillus cereus* ATCC 14579 subpopulations are responsible for cytotoxin K production". **J Appl Microbiol**, 114, 899-906.
- Christiansson, A. 1992. "The toxicology of *Bacillus cereus*". **Bull Intl Dairy Fed** . 275.

- Christiansson, A., Bertilsson, J. & Svensson, B.** 1999. "*Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period". **J Dairy Sci**, 82, 305-14.
- Cowell, J. L., Grushoff-Kosyk, P. S. & Bernheimer, A. W.** 1976. "Purification of cereolysin and the electrophoretic separation of the active (reduced) and inactive (oxidized) forms of the purified toxin". **Infect Immun**, 14, 144-54.
- Davey, R. T., JR. & Tauber, W. B.** 1987. "Posttraumatic endophthalmitis: the emerging role of *Bacillus cereus* infection". **Rev Infect Dis**, 9, 110-23.
- De Buyser, M., Brisabois, A., Espié, E., Delmas, D. & Dufour, B.** 2004. *Implication du lait et des produits laitiers dans les maladies infectieuses d'origine alimentaire en France de 1988 à 2003*. Bulletin Épidémiologique - AFSSA, n° 16, 2005/03, pages 1-2, 4 tabl., 5 réf., ISSN 1630-8018, FRA 6
- Decousser, J. W., Ramarao, N., Duport, C., Dorval, M., Bourgeois-Nicolaos, N., Guinebretiere, M. H., Razafimahefa, H. & Doucet-POpulaire, F.** 2013. "*Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: Putative role of pooled breast milk". **Am J Infect Control**, 41, 918-21.
- Drobniewski, F. A.** 1993. "*Bacillus cereus* and related species". **Clin Microbiol Rev**, 6, 324-38.
- EFSA** 2005. "*Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs". **The EFSA Journal** 175, 1-48.
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M. H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P. E., Martlbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M. & Scherer, S.** 2005. *Emetic toxin formation of Bacillus cereus is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains*. **Microbiology**, 151, 183-97.
- El-Sayed, M. Y. & Roberts, M. F.** 1983. *Lanthanide derivatives of phospholipase C from Bacillus cereus*. **Biochim. Biophys. Acta**, 744, 291-297.
- El Saleeby, C. M., Howard, S. C., Hayden, R. T. & Mccullers, J. A.** 2004. "Association between tea ingestion and invasive *Bacillus cereus* infection among children with cancer". **Clin Infect Dis**, 39, 1536-9.
- Eneroth, A., SveNsson, B., Molin, G. & Christiansson, A.** 2001. "Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine". **J Dairy Res**, 68, 189-96.
- Fagerlund, A., Lindback, T., Storset, A. K., Granum, P. E. & Hardy, S. P.** 2008. *Bacillus cereus* *Nhe* is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the *ClyA* (*HlyE*, *SheA*) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. **Microbiology**, 154, 693-704.
- FDA** 2009. Management of Food Safety Practices – Achieving Active Managerial Control of Foodborne Illness Risk Factors.

- FPS. 2002. Foodborne Illness Outbreaks. *Bacillus cereus* [Online]. Available: [http://www.bccdc.ca/NR/rdonlyres/34B36D22-D767-4140-B032-35FE8AAD409F/0/Outbreak\\_Bacillus\\_Milk.pdf](http://www.bccdc.ca/NR/rdonlyres/34B36D22-D767-4140-B032-35FE8AAD409F/0/Outbreak_Bacillus_Milk.pdf). Προσπέλαση 1 Σεπτεμβρίου 2014.
- Gaulin, C., Viger, Y. B. & Fillion, L.** 2002. "An outbreak of *Bacillus cereus* implicating a part-time banquet caterer". **Can J Public Health**, 93, 353-5.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A. & Senesi, S.** 2002. "Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks". **FEMS Microbiol Lett**, 208, 129-34.
- Giannella, R. A. & Brasile, L.** 1979. "A hospital food-borne outbreak of diarrhea caused by *Bacillus cereus*: clinical, epidemiologic, and microbiologic studies". **J Infect Dis**, 139, 366-70.
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Okstad, O. A., Gominet, M., Kolsto, A. B. & Lereclus, D.** 2008. "The *PlcR* virulence regulon of *Bacillus cereus*". **PLoS One**, 3, e2793.
- Granum, P. E.** 2001. *Bacillus cereus*. In: **Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Monteville, T.J.** (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC, pp. 373-381.
- Granum, P. E., Brynstad, S. & Kramer, J. M.** 1993a. "Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections". **Int J Food Microbiol**, 17, 269-79.
- Granum, P. E., Brynstad, S., O'Sullivan, K. & Nissen, H.** 1993b. "The enterotoxin from *B. cereus*: production and biochemical characterization". **Neth. Milk Dairy J.**, 47, 63-70.
- Granum, P.E.** 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. **J. Appl. Bacteriol. Symp.**, suppl., 76, 61S-66S
- Granum, P. E. & Lund, T.** 1997. "Bacillus cereus and its food poisoning toxins". **FEMS Microbiol Lett**, 157, 223-8.
- Granum, P. E., Nrestvold, A. & Gundersby, K. N.** 1995. "An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning during the Norwegian Ski Championship for juniors abstract" . **Norsk Veterinærtidsskr.** , 107, 945- 948.
- Granum, P. E., O'Sullivan, K. & Lund, T.** 1999. "The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*". **FEMS Microbiol Lett**, 177, 225-9.
- Greig, J. D. & Ravel, A.** 2009. "Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution". **Int J Food Microbiol**, 130, 77-87.
- Griffiths, M. W.** 1992. "Bacillus cereus in milk". **Bulletin of International Dairy Federation**, 287.
- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, S., Gomez, M. & Vaillant, V.** 2002. *Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000*. **BEH** n° 23/2002, 105-110.

HPA. 2014. Publication of the main findings from the PHE and MHRA investigation into the *Bacillus cereus* outbreak [Online]. Available: <https://www.gov.uk/government/news/bacillus-cereus-infections-1-july-2014>. Προσπέλαση 1 Σεπτεμβρίου 2014.

Jackson, S. G., Goodbrand, R. B., Ahmed, R. & Kasatiya, S. 1995. "*Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation". **Lett Appl Microbiol**, 21, 103-5.

Kramer, J.M., and Gilbert, R.J. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species,. In: M.P. Doyle (ed.), *Foodborne Bacterial Pathogenes*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.21-70

Lelieveld, H. L. M. 1985. "*Hygienic design and test methods*". **Journal Society Dairy Technology** 14-16.

Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J. A. & Griffiths, M. W. 1998. "*Identification of contamination sources of Bacillus cereus in pasteurized milk*". **Int J Food Microbiol**, 43, 159-71.

Lund, T. & Granum, P. E. 1996. "*Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from Bacillus cereus isolated after a foodborne outbreak*". **FEMS Microbiol Lett**, 141, 151-6.

Martinelli, D., Fortunato, F., Tafuri, S., Cozza, V., Chironna, M., Germinario, C., Pedalino, B. & Prato, R. 2013. *Lessons learnt from a birthday party: a Bacillus cereus outbreak, Bari, Italy, January 2012*. **Ann Ist Super Sanita**, 49, 391-4.

Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, J., Beumer, R., Te Giffel, M. & Peeters Weem, P. 1997. "*A risk assessment study of Bacillus cereus present in pasteurized milk*". **Food Microbiology**, 14, 143-151.

Oda, M., Takahashi, M., Matsuno, T., Uoo, K., Nagahama, M. & Sakurai, J. 2010. "*Hemolysis induced by Bacillus cereus sphingomyelinase*". **Biochim Biophys Acta**, 1798, 1073-80.

Pontefract, R. D. 1991. "*Bacterial adherence: its consequences in food processing*". **Canadian Institute Science and Tecnology Journal** 24, 113-117.

Rowan, N. J. & Anderson, J. G. 1997. "*Maltodextrin stimulates growth of Bacillus cereus and synthesis of diarrheal enterotoxin in infant milk formulae*". **Appl Environ Microbiol**, 63, 1182-4.

Ryan, P. A., Macmillan, J. D. & Zilinskas, B. A. 1997. "*Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from Bacillus cereus*". **J Bacteriol**, 179, 2551-6.

Sato, K., Ichiyama, S., Ohmura, M., Takashi, M., Agata, N., Ohta, M. & Nakashima, N. 1998. "*A case of urinary tract infection caused by Bacillus cereus*". **J Infect**, 36, 247-8.

- Schneider, K. R., Parish, M. E., Goodrich, R. M. & Cookingham, T.** 2004. Preventing Foodborne Illness: *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* [Online]. Available: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FS/FS10300.pdf>.
- Shinagawa, K.** 1993. "Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. Neth". **Milk Dairy J.**, 47, 89-103.
- Slaghuis, B. A., Te Giffel, M. C., Beumer, R. R. & Andre, G.** 1997. "Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk Int". **Dairy J.**, 7, 201-205.
- Soleimaninanadegani, M.** 2013. Evaluation of critical level in *Bacillus Cereus* growth curve in milk products with different conditions based on experimental data and ComBase Predictive Models. Available: <http://www.webmedcentral.com>.
- Spira, W. M. & Goepfert, J. M.** 1975. "Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*". **Can J Microbiol**, 21, 1236-46.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. & Granum, P. E.** 2008. "From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins". **FEMS Microbiol Rev**, 32, 579-606.
- Svensson, B., Eneroth, A., Brendehaug, J., Molin, G. & Christiansson, A.** 2000. "Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant". **J Dairy Res**, 67, 455-60.
- Te Giffel, M. C., Beurrier, R. R., Bonestroo, M. H. & F.M.R.** 1996. "Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in two dairy processing plants. Neth". **Milk Dairy J.**, 50, 479-492.
- Todar, K.** 2008. *Bacillus cereus* [Online]. Available: [http://textbookofbacteriology.net/B.cereus\\_2.html](http://textbookofbacteriology.net/B.cereus_2.html).
- Tuazon, C. U., Murray, H. W., Levy, C., Solny, M. N., Curtin, J. A. & Sheagren, J. N.** 1979. "Serious infections from *Bacillus sp*". **JAMA**, 241, 1137-40.
- Turnbull, P. C.** 1981. "*Bacillus cereus* toxins". **Pharmacol Ther**, 13, 453-505.
- Turnbull, P. C. & Kramer, J. M.** 1983. "Non-gastrointestinal *Bacillus cereus* infections: an analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period". **J Clin Pathol**, 36, 1091-6.
- Van Netten, P., Van De Moosdijk, A., Van Hoensel, P., Mossel, D. A. & Perales, I.** 1990. "Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin". **J Appl Bacteriol**, 69, 73-9.
- Vissers, M. M., Te Giffel, M. C., Driehuis, F., DE Jong, P. & Lankveld, J. M.** 2007. "Predictive modeling of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk during grazing and housing periods". **J Dairy Sci**, 90, 281-92.
- WHO** 2000. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe 7th Report.



**Wong, H. C., Chang, M. H. & Fan, J. Y.** 1988a. "*Incidence and characterization of Bacillus cereus isolates contaminating dairy products*". **Appl Environ Microbiol**, 54, 699-702.

**Wong, H. C., Chen, Y. L. & Chen, C. L. F.** 1988b. "*Growth, germination and toxigenic activity of Bacillus cereus in milk products*". **J. Food Protect**, 51, 707-710.