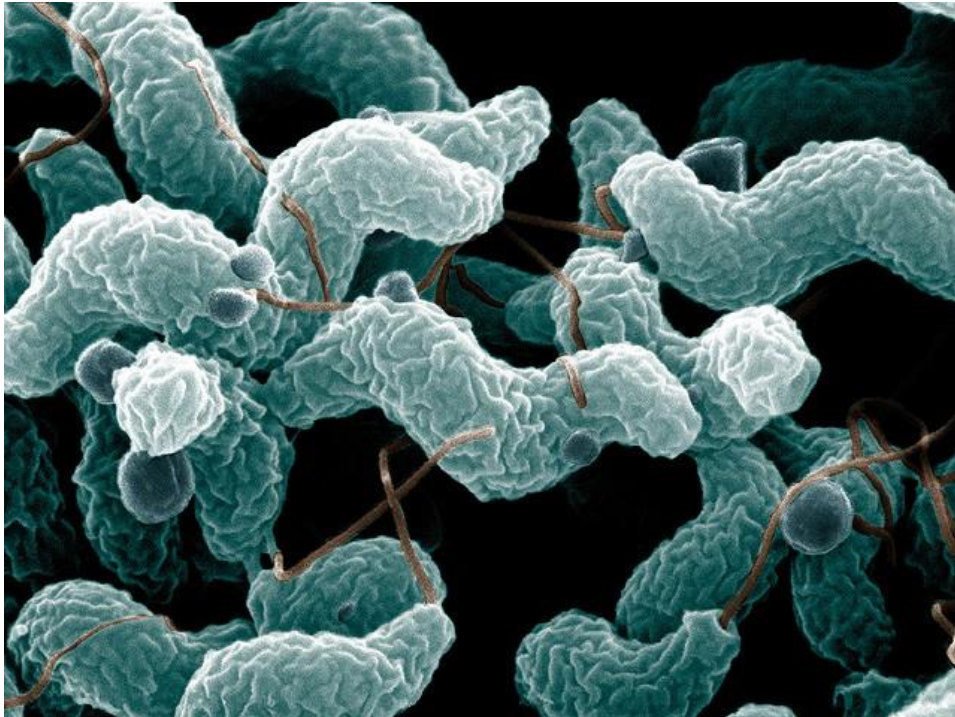




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΙΓΑΙΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (Βιβλιογραφική):

Campylobacter jejuni - ένα αναδύομενο τροφιμογενές παθογόνο

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Πατσιαρίκα Ουρανία

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: 6112017099

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Αναπλ. Καθηγητής Γκιαούρης Ευστάθιος (Επιβλέπων)
2. Καθηγητής Αργυρίου Αναγνώστης
3. Επίκ. Κουτελιδάκης Αντώνιος

ΜΥΡΙΝΑ, ΛΗΜΝΟΣ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2021

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ευστάθιο Γκιαούρη για την εμπιστοσύνη στην παρούσα πτυχιακή μελέτη καθώς και για την βοήθεια και καθοδήγηση του ώστε να ολοκληρωθεί η συγγραφή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου η οποία με στήριξε κατά την διάρκεια των σπουδών μου και στην ολοκλήρωσή τους καθώς και όλους τους υπόλοιπους που με στήριξαν.

Φωτογραφία εξωφύλλου: *Εικόνα του Campylobacter jejuni από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.*
Συνεισφορά από Wikimedia Commons, De Wood (φωτογραφία), Pooley C. (ψηφιακή χρωματική επεξεργασία), Υπουργείο Γεωργίας των Η.Π.Α. (USDA), Υπηρεσία Γεωργικών Ερευνών (ARS), EMU (PD USDA ARS).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	2
1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP	3
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ	4
3. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ	6
3.1. Βιο-υμένια (Biofilms).....	6
3.2. Βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη και κοκκοειδής μορφή	6
3.3. Απόκριση στο στρες (stress response).....	7
3.4. Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά	8
4. ΠΗΓΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ.....	9
5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	12
5.1. Κινητικότητα και μαστίγια	12
5.2. Χημειοταξία - άμεσα συνδεδεμένη με το μαστίγιο	13
5.3. Προσκόλληση.....	14
5.4. Διείσδυση/ Εισβολή.....	15
5.5. Παραγωγή τοξίνης	16
5.6. Σύστημα πρόσληψης σιδήρου	16
5.7. Δομές υδατανθράκων.....	17
5.8. Πιθανές πρωτεάσες (putative proteases).....	18
6. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΑΜΠΥΛΟΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΕΣ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ	20
7. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ <i>CAMPYLOBACTER</i>	22
8. ΤΡΟΠΟΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΟΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗΣ	25

9. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ <i>C. JEJUNI</i> ΑΠΟ ΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ..	26
9.1. Μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργειες ή παραδοσιακές μέθοδοι	26
9.2. Δοκιμές που βασίζονται στην ανοσολογία (immune-based assays)	28
9.3. Μοριακές μέθοδοι ή μέθοδοι ανίχνευσης που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα	32
10. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ <i>C. JEJUNI</i> ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	40
10.1. Φυσικές μέθοδοι για τον έλεγχο του βακτηρίου.....	40
10.2. Αντιμικροβιακές ουσίες, επικαλύψεις τροφίμων και συσκευασίες για τον έλεγχο του βακτηρίου.	43
10.3. Καινοτόμες τεχνολογίες για τον έλεγχο του βακτηρίου.....	48
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	52

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 4.1. Ξενιστές, οδοί μετάδοσης και παραδείγματα παραγόντων κινδύνου.....	11
Εικόνα 5.1. Σχηματική σύνοψη του μηχανισμού παθογένειας, μοριακά και κυτταρικά χαρακτηριστικά της έμφυτης ανοσοαπόκρισης στο <i>C. jejuni</i> σε ανθρώπους.....	19
Εικόνα 7.1. Παγκόσμια επιδημιολογία της καμπυλοβακτηρίωσης.....	24
Εικόνα 7.2. Η τάση στα αναφερόμενα επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης καμπυλοβακτηρίωσης στην Ε.Ε/ Ε.Ο.Χ ανά μήνα	24
Εικόνα 9.2.1. Τύποι της δοκιμασίας ELISA: Άμεση ELISA, Έμμεση ELISA, ELISA τύπου σάντουιτς, ανταγωνιστική ELISA.....	31
Εικόνα 9.2.2. Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας πλευρικής ροής	31
Εικόνα 9.2.3. Σχηματική απεικόνιση ενός SPR βιοαισθητήρα	32
Εικόνα 9.3.1. Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης μέσω ρεκομπινάσης-πολυμεράσης (Recombinase polymerase amplification, RPA).....	38
Εικόνα 9.3.2 Σχηματική απεικόνιση των βασικών βημάτων της μεθόδου ισοθερμικής ενίσχυσης με την βοήθεια βρόχου (LAMP).....	39

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Campylobacter jejuni* αν και ανακαλύφθηκε μικροσκοπικά στις αρχές της δεκαετίας του '70, αποτελεί ένα ανερχόμενο τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο, αφού είναι σήμερα η πιο συχνά αναφερόμενη βακτηριακή αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων παγκοσμίως. Αυτό το παθογόνο κατατάσσεται στα ζωνοσογόνα βακτήρια, δηλαδή σε αυτά που βρίσκονται στα ζώα ως συμβιωτικό βακτήριο, αλλά μπορούν προκαλέσουν λοιμώξεις σε ανθρώπους. Το καμπυλοβακτήριο βρίσκεται πιο συχνά στο κατώτερο γαστρεντερικό σύστημα των πουλερικών, με αποτέλεσμα το κρέας αυτών να είναι η σημαντικότερη οδός μόλυνσης στον άνθρωπο. Το μικροβιακό φορτίο αυτού του παθογόνου βακτηρίου είναι αναγκαίο να μειωθεί στα τρόφιμα με διάφορες μεθόδους καταπολέμησης όπως είναι οι φυσικές μέθοδοι, η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών, διάφορες καινοτόμες συσκευασίες και τεχνικές. Με αυτούς τους τρόπους, θα μπορούσε να μειωθεί η συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων του καμπυλοβακτηρίου στον άνθρωπο από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων. Η παρούσα βιβλιογραφική πτυχιακή μελέτη, παρουσιάζει την ιστορική ανασκόπηση του γένους *Campylobacter*, την ταξινομική κατάταξη και τα διάφορα χαρακτηριστικά του οργανισμού, τους 4 διαφορετικούς τρόπους που χρησιμοποιεί το βακτήριο για να επιβιώσει, τις πηγές μόλυνσης και τις οδούς μεταφοράς του. Επίσης, πραγματεύεται τους μολυσματικούς παράγοντες και το πως δημιουργούν παθογένεια, την κλινική εικόνα της καμπυλοβακτηρίωσης, δηλαδή της λοίμωξης του καμπυλοβακτηρίου, στους ανθρώπους και τις πιθανές επακόλουθες επιπλοκές της, την παγκόσμια επιδημιολογία της καμπυλοβακτηρίωσης, τους τρόπους θεραπείας της λοίμωξης, τις κύριες κατηγορίες μεθόδων ανίχνευσης του βακτηρίου στα τρόφιμα και τέλος τις στρατηγικές μείωσης με τις οποίες θα μπορούσε να ελεγχθεί το βακτήριο στα τρόφιμα. Επομένως, η αυτή η μελέτη προσπαθεί να περιγράψει και να αναλύσει πολυδιάστατα αυτό το βακτήριο, ώστε να γίνει κατανοητός ο τρόπος που δρα και αλληλοεπιδρά με τον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και πως μπορεί ο καταναλωτής να προστατευτεί από τις επιδράσεις του *C. jejuni*.

Λέξεις-Κλειδιά: *Campylobacter jejuni*, παράγοντες μολυσματικότητας, καμπυλοβακτηρίωση, επιδημιολογία, μέθοδοι ελέγχου.

ABSTRACT

Although *Campylobacter jejuni* was discovered microscopically in the early 1970s, it is an emerging foodborne pathogenic bacterium, as it is now the most commonly reported bacterial cause of foodborne infections worldwide. This pathogen is classified as a zoonotic bacterium, i.e. one that is found in animals as a symbiotic bacterium, but can cause infections in humans. *Campylobacter* is most commonly found in the lower gastrointestinal tract of poultry, making their meat the most important route of infection to humans. The microbial load of this pathogenic bacterium needs to be reduced in food by various control methods such as natural methods, use of antimicrobial substances, various innovative packaging and techniques. In these ways, the incidence of human infections of *Campylobacter* from the consumption of contaminated food could be reduced. This literature thesis, presents the historical review of the genus *Campylobacter*, the taxonomic classification and various characteristics of the organism, the 4 different ways the bacterium uses to survive, the sources of infection and its routes of transmission. It also discusses the infectious agents and how they create pathogenicity, the clinical picture of campylobacteriosis, i.e. infection of *Campylobacter*, in humans and its possible subsequent complications, the global epidemiology of campylobacteriosis, the ways of treating the infection, the main categories of methods for detecting the bacterium in food and finally the reduction strategies by which the bacterium in food could be controlled. Therefore, this thesis attempts to describe and analyze this bacterium in a multidimensional way, in order to understand how it acts and interacts with the human body and how the consumer can protect himself from the effects of *C. jejuni*.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, virulence factors, campylobacteriosis, epidemiology, control methods.

1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ *Campylobacter* spp

Η ιστορία του γένους *Campylobacter* ξεκινάει, όταν το 1886 στη Γερμανία ο Δρ. Theodor Escherich παρατήρησε στο μικροσκόπιο σπειροειδείς μικροοργανισμούς (βακτήρια) με την δυνατότητα κίνησης από δείγματα παιδιών που υπέφεραν από διάρροια. Όμως, δεν μπόρεσε να απομονώσει και να καλλιεργήσει αυτά τα βακτήρια. Τα επόμενα χρόνια κάποιες δημοσιεύσεις περιέγραφαν την εμφάνιση τέτοιων σπειροειδών (spirilla) μικροοργανισμών σε περιπτώσεις εντερικών ασθενειών. Όμως, το 1913 δύο ερευνητές οι McFadyean και Stockman απομόνωσαν βακτήριο που μοιάζει με *Vibrio* από ιστούς αμβλωμένων εμβρύων προβάτων και μετά ονομάστηκε *Vibrio fetus* (γνωστό τώρα ως *Campylobacter fetus*). Το 1931, το *Vibrio jejuni* πήρε το όνομά του από την απομόνωση σε αγελάδες και μοσχάρια με εντερικές διαταραχές. Το σπειροειδές βακτήριο απομονώθηκε για πρώτη φορά από δείγματα ανθρώπων μέσω καλλιέργειών αίματος από γυναίκες που είχαν αποβάλλει το 1947. Ωστόσο, η πρώτη τεκμηριωμένη ανθρώπινη λοίμωξη λόγω αυτού, εμφανίστηκε το 1938 σε ένα ξέσπασμα εντερικών διαταραχών που σχετίστηκε με το γάλα σε κρατούμενους στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το 1957, ο Κινγκ περιέγραψε την απομόνωση του βακτηρίου που μοιάζει με το *Vibrio* από δείγματα αίματος παιδιών με διάρροια. Το 1963, τα βακτήρια μετονομάστηκαν από τους Sebald και Veron σε *Campylobacter* λόγω των διαφορών μεταξύ του *Vibrio* και του νέου γένους στη σύνθεση βάσεων DNA, στις απαιτήσεις ανάπτυξης και στον μεταβολισμό. Το 1972, το *Campylobacter jejuni* απομονώθηκε για πρώτη φορά από δείγματα ανθρώπων με υψηλό πυρετό και διάρροια από έναν κλινικό μικροβιολόγο στο Βέλγιο, τον Butzler χρησιμοποιώντας μια ειδική τεχνική φιλτραρίσματος. Ωστόσο, η ανάπτυξη επιλεκτικών μέσων απομόνωσης κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '70 επέτρεψαν την μελέτη του γένους *Campylobacter* και ειδικότερα του *Campylobacter jejuni*, αφού όλο και περισσότερα εργαστήρια μπορούσαν να αναλύσουν δείγματα για την παρουσία ειδών *Campylobacter*. Αυτό οδήγησε στα τέλη της δεκαετίας του '80 στην καθιέρωση των *Campylobacter* spp ως κοινά ανθρώπινα παθογόνα και κοινές αιτίες βακτηριακής διάρροιας παγκοσμίως (Allos, 2001, Altekruze *et al.*, 1999, Garcia-Sanchez *et al.*, 2018).

2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Το *C. jejuni* είναι ένα από τα πολλά είδη του γένους *Campylobacter*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Campylobacteraceae* που με την σειρά του ανήκει στη τάξη (order) *Campylobacterales*. Επίσης, το γένος *Campylobacter* ανήκει στο φύλο *Proteobacteria* που περιέχει την πλειοψηφία των αρνητικών ειδών Gram. Αυτό το φύλλο διαιρείται σε υποδιαιρέσεις: Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- και Epsilon *Proteobacteria*, όπου στο τελευταίο ανήκει και το γένος *Campylobacter*. Επιπλέον, το *C. jejuni* περιλαμβάνει δύο υποείδη: το *C. jejuni* subsp. *jejuni* και *C. jejuni* subsp. *doylei* (Facciola *et al.*, 2017, Gundogdu & Wren, 2020, Hoepers *et al.*, 2016). Το όνομα *Campylobacter* προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις κάμπυλος («kampylos») και βακτήρια («bakteria») και σημαίνει «στραβό ραβδί» περιγράφοντας την τυπική μορφολογία του, ενώ το όνομα του είδους *jejuni* προέρχεται από τις περιοχές, όπου ο οργανισμός προκαλεί βλάβη κατά την λοίμωξη, δηλαδή την νήστιδα και τον ειλεό (Kreling *et al.*, 2020). Τα μέλη του γένους *Campylobacter* είναι Gram-αρνητικοί (Gram⁻), λεπτοί, καμπυλωτοί, σχήματος S ή σπειροειδείς ράβδοι μήκους 0,5-5 μm και πλάτους 0,2-0,9 μm, χωρίς να είναι σποριογόνοι μικροοργανισμοί. Τα περισσότερα είδη έχουν την δυνατότητα κίνησης με ένα μονό πολικό μαστίγιο ή διπολικό μαστίγιο παρουσιάζοντας μία τυπική κίνηση ανοιχτήρι. Επίσης, είναι μικροαερόφιλα βακτήρια, δηλαδή αναπτύσσονται καλύτερα σε ατμόσφαιρα που χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (5% O₂, 10% CO₂ και 85% N₂). Όλα εκτός από ένα είδος είναι θετικά στην οξειδάση (συνθέτουν το ένζυμο της οξειδάσης) και καταλάση, ενώ είναι αρνητικά στην ινδόλη. Τα γονιδιώματά τους είναι μικρά (1,6-2,0 Mbps), είναι πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη και ο λόγος γουανίνης και κυτοσίνης είναι 30%. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται αρκετά αργά και απαιτούνται 72–96 ώρες για πρωτογενή απομόνωση από δείγματα κοπράνων. Ειδικότερα, το *C. jejuni* έχει πολλά από τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω, αλλά έχει και άλλα χαρακτηριστικά. Το συγκεκριμένο χημειοετεροτροφικό είδος είναι μη-σακχαρολυτικό, επομένως οι πεντόζες και οι εξόζες όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη και οι δισακχαρίτες λακτόζη, μαλτόζη, τρεαλόζη και σακχαρόζη δεν μπορούν να ζυμωθούν, ούτε να οξειδωθούν και ούτε να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα ανάπτυξης. Η αδυναμία καταβολισμού των υδατανθράκων οφείλεται στην απουσία γλυκοκινάσης (Gik) και φωσφοφρουκτοκινάσης (Pfk) της βιοχημικής οδού Embden-Meyerhof-Parnas. Το *C. jejuni* καταβολίζει οργανικά οξέα όπως το γαλακτικό, το πυροσταφυλικό, το οξικό οξύ και ενδιάμεσα του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) καθώς και έναν περιορισμένο αριθμό αμινοξέων. Είναι γνωστό πως, η χρήση αμινοξέων παίζει σημαντικό ρόλο στην τροφοδότηση του κεντρικού μεταβολισμού του *C. jejuni*, ωστόσο λίγα γλυκογονικά αμινοξέα αποικοδομούνται και υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό του. Για τα περισσότερα στελέχη του, τα αμινοξέα που προάγουν την ανάπτυξη είναι ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, προλίνη και σερίνη και ο καταβολισμός τους είναι σημαντικός για τον μεταβολισμό του βακτηρίου. Η γλυκονεογένεση που τροφοδοτείται από αμινοξέα διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη φυσιολογία του *C. jejuni*, οπότε η οδός Entner-Doudoroff (ED)

αποτελεί μια εναλλακτική για τη σύνθεση πυροσταφυλικού από εξωκυτταρική γλυκόζη μέσω φωσφογλυκονικού με σκοπό την παράκαμψη της απουσίας Pfk. Συμπληρωματικά με τα παραπάνω, το *C. jejuni* είναι σχετικά εύθραυστο και ευαίσθητο σε ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών, συνεπώς η επιβίωσή του έξω από το έντερο του ξενιστή φαίνεται πως είναι δύσκολη και συνήθως δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί στα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή της αποθήκευσης. Αυτός ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες κάτω από 30°C, λόγω της απουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ που παίζουν ρόλο στην προσαρμογή του σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται από 30°C έως 46°C, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι περίπου 42°C και δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες ίσες ή μεγαλύτερες των 55°C. Το βακτήριο αυτό είναι ευαίσθητο και στην αλλαγή του pH του περιβάλλοντος, δηλαδή τα κύτταρα του μειώνονται σημαντικά όταν το pH του μέσου ανάπτυξης είναι πάνω από 9,0 ή κάτω από 4,0. Το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη και επιβίωση του κυμαίνεται μεταξύ 6,5 και 7,5, με μέγιστο περίπου 9,0. Τέλος, αποδείχθηκε ότι η ανάπτυξη του δεν συμβαίνει σε περιβάλλοντα με ενεργότητα νερού (a_w) μικρότερη από 0,987 (ευαίσθητο σε περιβάλλον με συγκέντρωση NaCl >2% w/w), ενώ η ανάπτυξη είναι βέλτιστη εάν η a_w ισούται με 0,997 (Ganan *et al.*, 2012, Hoepers *et al.*, 2016, Hofreuter, 2014, Jackson *et al.*, 2009, Tresse *et al.*, 2017).

3. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

3.1. Βιο-υμένια (Biofilms)

Τα βιο-υμένια είναι μικροβιακές κοινότητες που συντίθενται από συσσωματώματα μικροβιακών κυττάρων από το ίδιο ή διαφορετικό είδος. Αυτές οι κοινότητες προσκολλώνται σε διαφορετικούς τύπους επιφανειών, παράγοντας εξωκυττάριο πολυμερές υλικό (όπως εξωπολυσακχαρίτες) το οποίο περικλείει και προστατεύει τα κύτταρα. Το *C. jejuni* είναι σε θέση να σχηματίζει βιο-υμένιο είτε μόνο του είτε μαζί με άλλα βακτήρια, ωστόσο έχει βρεθεί και σε προσχηματισμένα βιο-υμένια άλλων βακτηρίων. Αυτά μπορούν να σχηματιστούν, τόσο *in vitro*, όσο και πάνω σε αβιοτικές επιφάνειες όπως πλαστικό πολυστυρολίου, ανοξείδωτο χάλυβα ή γυαλί καθώς και σε υδάτινα περιβάλλοντα. Ωστόσο, η δομή και η συνοχή του εξαρτώνται από το στέλεχος και το περιβάλλον, λόγω των διαφορών στο περιεχόμενο των γονιδίων μεταξύ των στελεχών του, της διαφορετικής έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση των βιο-υμενίων και εκείνων που σχετίζονται με την επιβίωση στο περιβάλλον. Τα γονίδια, που περιγράφονται ως εμπλεκόμενα στην διαδικασία σχηματισμού των βιο-υμενίων, είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για την κινητικότητα των κυττάρων (*flaA, flaB, flaC, flaG, fliA, fliS* και *flhA*), την τροποποίηση της επιφάνειας των κυττάρων (*peb4, pgg1* και *waaF*), το μηχανισμό διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας ή μηχανισμό «αίσθησης απαρτίας» (quorum sensing) όπως αλλιώς αυτός ονομάζεται (*luxS*), καθώς και την απόκριση στο στρες (*rrk1, spoT, cj1556, csrA, cosR, cprS*). Όμως, κάποιες μελέτες έχουν αποδείξει ότι, για το μέγιστο σχηματισμό του βιο-υμενίου σημαντικές είναι οι επιφανειακές πρωτεΐνες του μαστίγιου, καθώς και αυτές της διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας του (Garcia-Sanchez *et al.*, 2018, Joshua *et al.*, 2006).

3.2. Βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη και κοκκοειδής μορφή

Το *C. jejuni*, όπως και πολλά από τα είδη του γένους *Campylobacter*, έχει αποδειχθεί ότι είναι σε θέση να εισάγονται σε μία βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (Viable but Nonculturable, VBNC) ως μηχανισμό επιβίωσης, όταν υπόκεινται σε δυσμενείς συνθήκες, όπως χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών ή και κατά την είσοδο σε στάσιμη φάση. Τα κύτταρα του παθογόνου μετασχηματίζονται από μια κινητή σπειροειδή μορφή σε μορφή κοκκοειδούς, όταν εισέλθουν στη VBNC κατάσταση. Έχει προταθεί ότι, η μετάβαση από τη ραβδοειδή στην κοκκοειδή μορφή δεν είναι μια ενεργή διαδικασία, αφού δεν εντοπίζεται μεταβολή στα προφίλ πρωτεϊνών ή στη σύνθεση πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της μετάβασης. Ωστόσο, μετά από μια περίοδο αναζωογόνησης

των κυττάρων αποκαθίσταται η καλλιεργησιμότητα και συνεπώς και η μολυσματικότητά τους. Η κατάσταση VBNC παραμένει το αντικείμενο πολλών αντιπαραθέσεων, για το εάν αυτή η κατάσταση του *C. jejuni* είναι ικανή να προκαλέσει μόλυνση σε ανθρώπους ή να αποικίσει το έντερο θερμόαιμων ζώων ή πτηνών. Η συνολική σημασία της μη καλλιεργήσιμης μορφής του *C. jejuni* σε σχέση με τον αποικισμό των ζώων είναι αβέβαιη και μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος (strain) του βακτηρίου και το είδος των ζώων (Garcia-Sanchez *et al.*, 2018, Murphy *et al.*, 2006).

3.3. Απόκριση στο στρες (stress response)

Το *C. jejuni* πρέπει να ξεπεράσει ένα ευρύ φάσμα στρεσογόνων καταστάσεων μέχρι να φτάσει στον καταναλωτή δια μέσου της τροφικής αλυσίδας, καθώς στον γαστρεντερικό σωλήνα των ανθρώπων. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), όπως το ανιόν υπεροξειδίου, το υπεροξειδίο του οξυγόνου και η υδροξυλική ρίζα, διεγείρουν οξειδωτικό στρες και προκαλούν βλάβες σε σημαντικά μακρομόρια όπως το DNA και τις πρωτεΐνες του *Campylobacter* με αποτέλεσμα διάφορα προβλήματα στο βακτήριο. Ωστόσο, το βακτήριο μπορεί να αποφύγει την επίδραση των ROS ενεργοποιώντας ή αυξάνοντας τη δραστικότητα του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος στο οποίο κατατάσσονται και οι εξής πρωτεΐνες: υπεροξειδική δισμουτάση SodB (κωδικοποιείται από το ένζυμο *sodB*), αλκυλο-υδροϋπεροξειδική αναγωγάση AhpC (κωδικοποιείται από το ένζυμο *ahpC*) και η καταλάση KatA (κωδικοποιείται από το ένζυμο *katA*). Παρόλο που και τα τρία παραπάνω ένζυμα είναι σημαντικά για το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα, το ένζυμο που κωδικοποιείται από το *ahpC*, παίζει σημαντικότερο ρόλο στην επιβίωση του *C. jejuni* υπό συνθήκες πλούσιες σε οξυγόνο σε σχέση με τα άλλα δύο. Έχει διαπιστωθεί πως το *C. jejuni*, διαθέτει μόνο ένα αντίγραφο των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά. Από μελέτες είναι γνωστό, πως ο μηχανισμός απόκρισης στο οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να συνδέεται με την αντίδραση του βακτηρίου σε άλλα διάφορα στρες, αν και ο τρόπος με τον οποίο σχετίζονται δεν έχει διερευνηθεί ακόμη. Ειδικότερα, μπορεί η δραστικότητα της καταλάσης να αυξάνεται ανάλογα με την θερμοκρασία όμως, ο μικροοργανισμός είναι ευαίσθητος σε υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. 42°C). Από την άλλη πλευρά, επειδή δεν διαθέτει πρωτεΐνες ψυχρού σοκ, είναι πιθανόν να κατέχει άλλους μηχανισμούς ανοχής στα ψυχρά σοκ. Μέχρι στιγμής μελέτες έχουν δείξει ότι η άμυνα του οξειδωτικού στρες, ιδιαίτερα τα γονίδια *sodB* και *cj0358* (κωδικοποιεί τη κυτοχρωμική C551 υπεροξειδάση) παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοχή του *C. jejuni* σε αυτό το σοκ. Όμως, κάποια μετάλλαξη ειδικότερα στο γονίδιο *sodB* μπορεί να επηρεάσει την ανοχή του στο στρες κατάψυξης-απόψυξης. Επιπρόσθετα, στο παθογόνο αυτό η έκφραση γονιδίων ενάντια στο οξειδωτικό στρες, όπως το *dps*, *sodB*, *trxB* και *ahpC*, αυξάνεται με την έκθεσή του σε υδροχλωρικό ή οξικό οξύ. Παράλληλα, λόγω διασταυρούμενης προστασίας (cross protection) η προ-έκθεση των κυττάρων του σε αερόβια καλλιέργεια μπορεί να

αυξάνει ακολούθως την επιβίωση τους στο όξινο στρες (García-Sánchez *et al.*, 2018, Kim J-C *et al.*, 2015, Oh *et al.*, 2019).

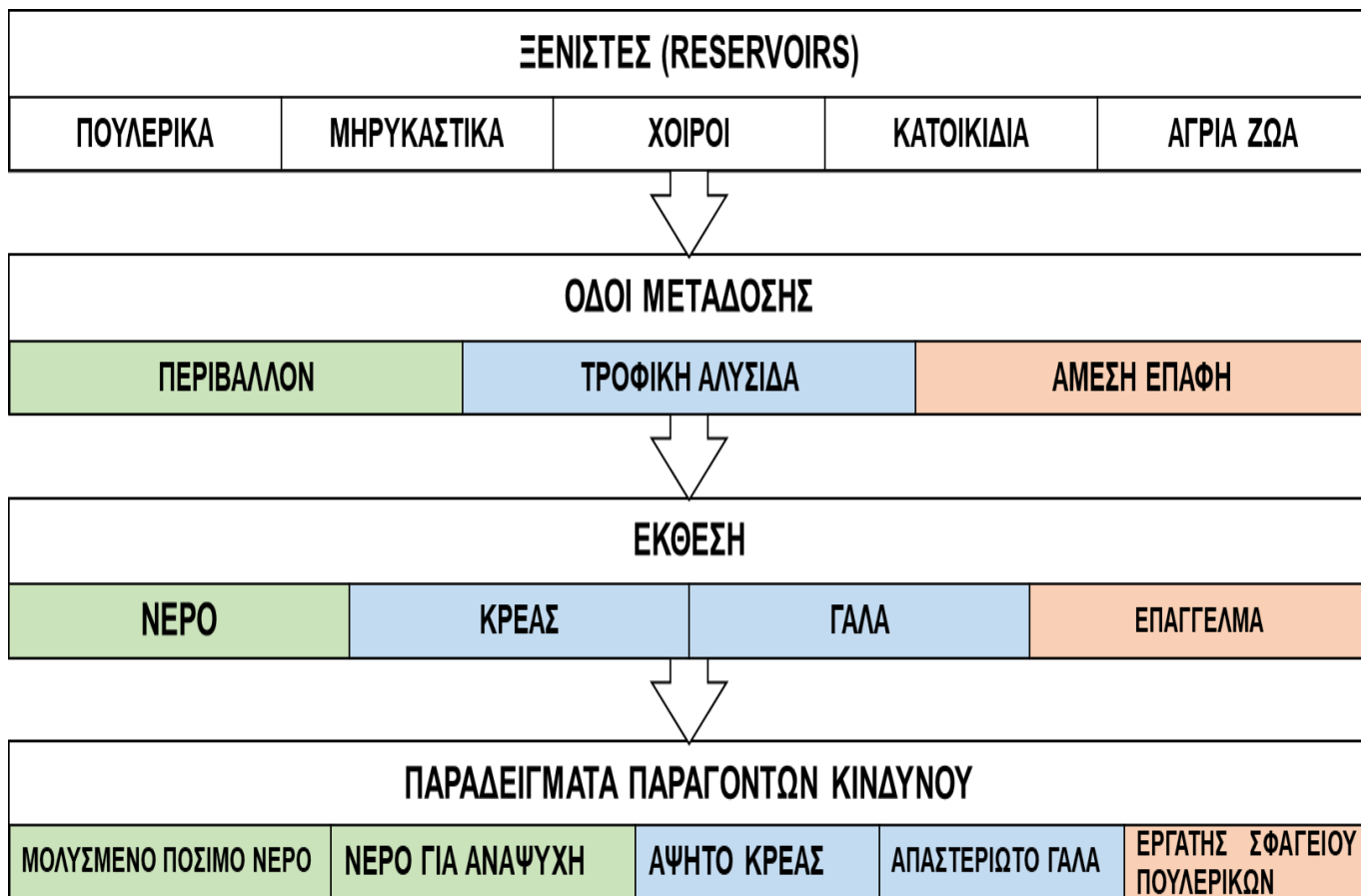
3.4. Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών, αφού δεσμεύονται σ' έναν συγκεκριμένο στόχο κεντρικό για την μικροβιακή βιολογία, όπως είναι η βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη, οι μηχανισμοί για δημιουργία γενετικού υλικού, ή τα ριβοσώματα για την παραγωγή πρωτεϊνών και αναστέλλουν τη φυσιολογική δραστηριότητά τους. Το *C. jejuni* εκτίθεται σε διάφορα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία και στη ιατρική, οπότε έχει αναπτύξει και εξελίξει διάφορους μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε αυτά τα αντιβιοτικά. Οι τέσσερις κοινοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα είναι : i) τροποποίηση ή αδρανοποίηση των αντιβιοτικών μέσω της παραγωγής ενζύμων, ii) τροποποίηση ή προστασία των στόχων των αντιβιοτικών, iii) έκφραση αντλιών εκροής που θα χρησιμοποιηθούν για την εξώθηση (ενεργό μεταφορά) των αντιβιοτικών και iv) μείωση διαπερατότητας μεμβράνης στα αντιβιοτικά μέσω των πορινών (porins), περιορίζοντας έτσι την πρόσβαση των αντιβιοτικών στους στόχους τους. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να δράσουν συνεργιστικά στην ανθεκτικότητα έναντι διάφορων τάξεων αντιβιοτικών. Αναλυτικότερα, η μείωση της μεμβρανικής διαπερατότητας από το *C. jejuni* μπορεί να συμβεί με την αλλαγή στον τρόπο έκφρασης των πορινών, που είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ώστε να μειωθεί η διάχυση χημικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών στον περιπλασματικό και ενδοκυτταρικό χώρο. Ένας άλλος μηχανισμός που αναφέρθηκε παραπάνω, είναι η έκφραση των αντλιών εκροής, που σε πολλές περιπτώσεις οδηγούν σε φαινοτύπους ανθεκτικούς σε πολλά φάρμακα. Αυτές οι αντλίες μεταφέρουν ενεργά δομικά μεταβλητά μόρια, όπως τα αντιβιοτικά από τον περιπλασματικό ή τον κυτταροπλασματικό χώρο στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. Συμπληρωματικά, μια πολύ ισχυρή παραλλαγή της αντλίας εκροής CmeABC έχει περιγραφεί στο *C. jejuni*, που προσδίδει βελτιωμένη αντοχή σε πολλαπλές κατηγορίες αντιβιοτικών. Έτσι, παρέχει ένα ισχυρό μηχανισμό για την προσαρμογή του στις αντιβιοτικές θεραπείες. Οι μεταλλάξεις στο σημείο-στόχο ελαχιστοποιούν τη συγγένεια και τη διαθεσιμότητα του αντιβιοτικού, γεγονός που το καθιστά αναποτελεσματικό. Επίσης, η βιομετατροπή του αντιβιοτικού από βακτηριακά ένζυμα, καθιστά το αντιβιοτικό αναποτελεσματικό. Αυτό συμβαίνει, διότι τα βακτηριακά ένζυμα μπορούν να τροποποιούν τις πλευρικές αλυσίδες των χημικών ομάδων στο αντιβιοτικό και κατά συνέπεια μειώνουν τη συγγένεια δέσμευσης αντιβιοτικών στη θέση στόχο. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας έναντι των σημαντικότερων κατηγοριών αντιβιοτικών (φθοροκινολόνες, μακρολίδια, τετρακυκλίνη και αμινογλυκοσίδη), είναι οι ίδιοι με τους παραπάνω τονίζοντας ότι δεν χρησιμοποιούνται πάντοτε όλοι οι μηχανισμοί από την κάθε κατηγορία, αλλά κάποιοι από αυτούς (Tang *et al.*, 2017, Yang *et al.*, 2019).

4. ΠΗΓΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ

Ο μικροοργανισμός *C. jejuni* είναι ζωνοσογόνος (zoonotic), δηλαδή είναι ένας μικροοργανισμός που απαντάται συνήθως στα ζώα ως μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας, αλλά μπορεί να προκαλέσει ασθένειες στον άνθρωπο. Ειδικότερα, το *C. jejuni* αποτελεί συμβιωτικό βακτήριο όπου κατοικεί μέσα στις κατώτερες γαστρεντερικές οδούς πολλών ξενιστών-ζώων χωρίς να έχει επιβλαβή ή ευεργετικά αποτελέσματα. Ποικίλα ζώα χρησιμοποιούνται ως ξενιστές του συγκεκριμένου βακτηρίου, όπως για παράδειγμα πουλερικά, άγρια πτηνά (κοράκια, ορτύκια, γερανοί και γλάροι), χοίροι, πρόβατα, βοοειδή και κατοικίδια ζώα (σκύλοι, γάτες και πτηνά). Ωστόσο, τα πουλερικά αλλά και τα υδρόβια πτηνά αποτελούν τις κυριότερες πηγές μόλυνσης του βακτηρίου στον άνθρωπο. Οπότε, στα ωμά πουλερικά για παράδειγμα κοτόπουλο, γαλοπούλα, πάπια, χήνα ή πουλερικά θηραμάτων υπάρχει μεγάλος κίνδυνος να περιέχεται το βακτήριο αυτό. Επίσης, μπορεί να περιέχεται σε διάφορα τρωκτικά καθώς και στον εξωσκελετό διάφορων εντόμων. Οι οδοί μετάδοσης του βακτηρίου που ρέουν μέσω του περιβάλλοντος, των οικόσιτων και άγριων ζώων στους ανθρώπους αλληλοεπιδρούν με πολύπλοκους τρόπους. Κάποιοι παράγοντες όπως η αφόδευση των οικόσιτων ή των άγριων πτηνών, η παρουσία κατοικίδιων ζώων, η ροή του νερού, οι κλιματολογικές συνθήκες και οι πολύπλοκοι οικολογικοί παράμετροι επηρεάζουν την μετάδοση του βακτηρίου. Η κύρια οδός μετάδοσης θεωρείται ότι είναι μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων ζωικής προέλευσης και ειδικότερα του κρέατος κοτόπουλου. Από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι, ένα μεγάλο μέρος της παγκόσμιας παραγωγής κοτόπουλου είναι μολυσμένο με *C. jejuni*. Όταν γίνει εισαγωγή του βακτηρίου στο εκτροφείο με τα κοτόπουλα, αυτό εξαπλώνεται γρήγορα και έχει ως αποτέλεσμα τον αποικισμό των εντερικών οδών της πλειονότητας των κοτόπουλων εντός 1 εβδομάδας. Συνεπώς, το κοτόπουλο τις περισσότερες φορές εκτίθεται στο *Campylobacter* όταν βρίσκεται σε εκτροφεία, κυρίως μέσω της οριζόντιας μετάδοσης. Κατά την διάρκεια αυτής της μετάδοσης, η μόλυνση των κοτόπουλων σχετίζεται με την κατάποση μολυσμένου νερού, την επαφή με κόπρανα άλλων μολυσμένων ζώων και μολυσμένων απορριμμάτων. Από την άλλη πλευρά, η κατακόρυφη μετάδοση δηλαδή η μετάδοση από την κότα στον νεοσσό μέσω του αυγού είναι σπάνια και αμφιλεγόμενη. Μελέτες έδειξαν ότι τα εντερικά βακτήρια του κοτόπουλου δεν είναι σε θέση να περάσουν διαμέσου του κελύφους και να μολύνουν το εσωτερικό του αυγού, οπότε το μολυσμένο κοτόπουλο είναι αδύνατον να μολύνει τους απογόνους μέσω του αυγού. Όμως, η κάθετη μετάδοση δεν μπορεί να αποκλειστεί πλήρως ως περιστασιακή οδός. Κατά την επεξεργασία των κοτόπουλων, το *Campylobacter* που αποικεί στο έντερο τους μπορεί να μεταφερθεί στην επιφάνεια του κρέατος. Στη διαδικασία της σφαγής, τα σημεία με τον υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσης του κρέατος λόγω έκθεσής του στα εντερικά περιεχόμενα είναι ο εκσπλαχνισμός, το ζεμάτισμα και η αποπτέρωση. Σε αυτά σημεία μπορεί να προκληθεί

διασταυρούμενη μόλυνση (cross contamination) λόγω της αύξησης του βακτηριακού φορτίου, ενώ και άλλοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το φορτίο όπως η θερμοκρασία του χώρου εκσπλαχνισμού. Ωστόσο, διασταυρούμενη μόλυνση μπορεί να συμβεί και μετά τη διάθεση των πουλερικών στην αγορά κυρίως από το χειρισμό των καταναλωτών, όπως το πλύσιμο των ωμών κοτόπουλων. Με αυτήν την πρακτική αυξάνεται ο κίνδυνος επιμόλυνσης άλλων τροφίμων, καθώς και των εργαλείων κουζίνας μέσω του νερού έκπλυσης που μπορεί να διασπείρει κύτταρα αυτού του βακτηρίου σε άλλες γειτονικές επιφάνειες. Επιπρόσθετα, η αποθήκευση και απόψυξη ενός κοτόπουλου χωρίς κατάλληλες προφυλάξεις μπορεί να ευνοήσει τη επιμόλυνση άλλων τροφίμων στο ψυγείο μέσω επαφής με το μολυσμένο νερό που απομακρύνεται κατά την απόψυξη κοτόπουλου. Για να αποφευχθεί η επιμόλυνση στο ψυγείο, το κοτόπουλο πρέπει να φυλάσσεται κάτω από τους 5°C, κατά προτίμηση σε χαμηλότερα ράφια του ψυγείου ή σε μέρη όπου το στάσιμο νερό που προέρχεται από το κοτόπουλο, δεν μπορεί να μολύνει άλλα τρόφιμα. Επομένως, η κατανάλωση, ο χειρισμός ωμού ή μαγειρεμένου κρέατος κοτόπουλου είναι κύριοι παράγοντες κινδύνου μετάδοσης της καμπυλοβακτηρίωσης. Άλλοι παράγοντες κινδύνου που αποτελούν περιστασιακές αιτίες μετάδοσης του *Campylobacter* είναι η κατανάλωση νωπού γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, αυγών, διάφορων τύπων κρέατος όπως χοιρινό ή βόειο, νωπών φρούτων και λαχανικών καθώς και κατανάλωση μη ασφαλούς νερού. Συγκεκριμένα, το μη παστεριωμένο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι κοινές αιτίες μετάδοσης του *Campylobacter* spp. και είναι γνωστό ότι αποτελούν πηγή ανθρώπινης καμπυλοβακτηρίωσης από το 1978. Μια μελέτη για γαλακτοκομικά προϊόντα, επισήμανε ότι το 12% των δειγμάτων νωπού γάλακτος ήταν μολυσμένα με *C. jejuni*. Οι πιθανές αιτίες μόλυνσης του γάλακτος είναι πιθανή επαφή με περιττώματα βοοειδών μέσω της άρμεξης, μολυσμένο νερό ή άμεση μόλυνση λόγω μαστίτιδας των βοοειδών. Επιπλέον, τα ζώα με κόκκινο κρέας και κυρίως τα βοοειδή αποικίζονται από το *C.jejuni* στην κατώτερη γαστρεντερική οδό, ενώ οι χοίροι δεν αποικίζονται συχνά από το συγκεκριμένο είδος. Τα βοοειδή και οι χοίροι της εντατικής κτηνοτροφίας έδειξαν μεγαλύτερο επιπολασμό του βακτηρίου, σε σχέση με τα ελεύθερα βοσκήσιμα πιθανώς λόγω του μικρότερου χώρου εκτροφής των πρώτων. Παράλληλα, διάφορες μελέτες έχουν δείξει την παρουσία του *C. jejuni* σε διάφορα φρούτα και λαχανικά. Είναι πιθανό η μόλυνση αυτών, να προκύπτει λόγω της άρδευσης με μολυσμένο νερό, τη χρήση φυσικών λιπασμάτων ή μέσω του ίδιου εδάφους που έχει μολυνθεί με περιττώματα κυρίως πτηνών. Είναι επίσης πιθανή διασταυρούμενη μόλυνση, κατά το χειρισμό και τη συσκευασία ενός τροφίμου ή μέσω σκευών κουζίνας που χρησιμοποιούνται για την κοπή άλλων τροφίμων όπως τα πουλερικά (Barakat *et al.*, 2020, El-Zamkan & Abdel Hammed, 2016, Facciola *et al.*, 2017, Goncalves-Tenorio *et al.*, 2018, Humphrey *et al.*, 2007, Johnson *et al.*, 2017, Silva *et al.*, 2018).



Εικόνα 4.1. Ξενιστές, οδοί μετάδοσης και παραδείγματα παραγόντων κινδύνου (Chlebicz & Slizewska, 2018).

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Μέχρι και πρόσφατα πολλοί ερευνητές δεν μπορούν να κατανοήσουν επαρκώς τους μηχανισμούς παθογένειας του *C. jejuni* και αυτό έχει περιορίσει τα μέσα πρόληψης των ανθρώπων ενάντια στα μολυσμένα από το βακτήριο, νερό και τρόφιμα. Παράλληλα, οι παράγοντες μολυσματικότητας είναι αρκετά σημαντικοί για την παθογένεια του βακτηρίου. Η κινητικότητα των μαστίγιων και η χημειοταξία, η προσκόλληση του βακτηρίου στον εντερικό βλεννογόνο, η εισβολή του στο κύτταρο-ξενιστή και η παραγωγή τοξινών αναγνωρίζονται ως σημαντικότεροι παράγοντες μολυσματικότητας. Όμως, εκτός από τους βασικούς παράγοντες μολυσματικότητας υπάρχουν και άλλοι παράγοντες με δευτερεύων ρόλο, όπως είναι το σύστημα πρόσληψης σιδήρου, οι δομές των υδατανθράκων και πιθανές πρωτεάσες του *C. jejuni* (*C. jejuni* putative proteases). Παρά τις περιορισμένες γνώσεις για τον μηχανισμό παθογένειας στον άνθρωπο έχουν αναφερθεί κάποια σημαντικά βήματα για την επαγωγή της γαστρεντερίτιδας, που βασίζονται στους παραπάνω μολυσματικούς παράγοντες. Αρχικά, το λεπτό έντερο και έπειτα το παχύ αποικίζεται από το παθογόνο με την βοήθεια των μαστίγιων. Ακολουθεί η προσκόλληση σε πρωτεΐνες του επιθηλίου του ξενιστή και η εισβολή του βακτηρίου στα ξενιστικά εντερικά κύτταρα. Στην συνέχεια, το βακτήριο πολλαπλασιάζεται στο εντερικό βλεννογόνο και στις εντερικές λάχνες εκκρίνονται οι τοξίνες. Αυτές προκαλούν καταστροφή του επιθηλίου και απώλεια της λειτουργίας του με αποτέλεσμα την μείωση της απορροφητικότητας του εντέρου (Garcia-Sanchez *et al.*, 2018, Rautelin & Hanninen, 2000, Silva J. *et al.*, 2011).

5.1. Κινητικότητα και μαστίγια

Η κινητικότητα του *C. jejuni* είναι αρκετά σημαντική για την διαφυγή του από στρεσογόνα περιβάλλοντα και την επιβίωσή του υπό διαφορετικές χημειοτακτικές συνθήκες, που συναντά στον γαστρεντερικό σωλήνα αλλά και για τον μηχανισμό παθογένειας. Το σύστημα κίνησης του παθογόνου αποτελείται από το μαστίγιο και ένα χημειοισθητήριο σύστημα που κατευθύνει την κίνηση των μαστίγιων ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Το πολικό και αμφίτριχο μαστίγιο του *C. jejuni* αποτελείται από Ο-γλυκοζυλιωμένη φλαγγελίνη (flagellin) και στην ουσία αυτό επιτρέπει στα κύτταρα του βακτηρίου να διεισδύουν με αποτελεσματικό τρόπο μέσα στο εντερικό στρώμα βλεννίνης του ξενιστή αλλά και να το διαπερνάει, διευκολύνοντας τον αποικισμό του εντέρου. Το αξονικό μέρος του μαστίγιου αποτελείται από τα δομικά εξωκυτταρικά νηματώδη συστατικά, το άγκιστρο και το βασικό σώμα. Το σύστημα άγκιστρο-βασικό σώμα (hook-basal body) αποτελείται από i) μία βάση ενσωματωμένη στο κυτταρόπλασμα και την εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου, ii) το επιφανειακά

τοποθετημένο άγκιστρο αλλά και iii) την περιπλαστική ράβδο και τις σχετικές δομές δακτυλίου. Το σύστημα αυτό είναι σύνθετο και αποτελείται από μία σειρά διαφορετικών πρωτεϊνών όπως FliO, FliA, FliG, FliB, FliP, FliF, FliQ, FliR, FliY, FliM και FliN, FlgI, FlgH, FlgE, FliK, FlgE and FliK. Από την άλλη πλευρά, το νηματίο του μαστίγιου απαρτίζεται από δύο ομόλογες φλαγγελίνες FlaA (κωδικοποιείται από το γονίδιο *flaA*) και FlaB (κωδικοποιείται από το γονίδιο *flaB*), όπου η πρώτη αποτελεί την βασική πρωτεΐνη του νηματίου. Η έκφραση των γονιδίων αυτών ρυθμίζεται από δύο σίγμα παράγοντες σ^{28} (*flaA*) και σ^{54} (*flaB*), ενώ το γονίδιο *flaA* φαίνεται να είναι απαραίτητο για την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα. Επίσης, δύο άλλες πρωτεΐνες γνωστές ως FlgP και FlgQ παρουσιάστηκαν ως απαραίτητες για την κινητικότητα του μαστίγιου του παθογόνου, όμως οι λειτουργικοί μηχανισμοί τους παραμένουν ασαφείς. Παράλληλα, ένα σύστημα δύο στοιχείων αποτελούμενο από τον αισθητήρα FlgS και τον ρυθμιστή απόκρισης FlgR είναι σημαντικό για την ρύθμιση του μαστίγιου του *Campylobacter* (Igwaran & Okoh, 2019, Kreling *et al.*, 2020, Silva J. *et al.*, 2011).

5.2. Χημειοταξία - άμεσα συνδεδεμένη με το μαστίγιο

Η χημειοταξία είναι η ελεγχόμενη και κατευθυνόμενη κίνηση ενός οργανισμού, που ενεργοποιείται από χημικά ερεθίσματα. Η χημειο-προσέλκυση λέγεται η κίνηση προς το αντίστοιχο ερέθισμα και η χημειο-απώθηση λέγεται η κίνηση απομάκρυνσης από το ερέθισμα. Μέσω αυτού του συστήματος μικροοργανισμοί όπως το *C. jejuni* μπορούν να βρουν τη τέλεια οικολογική τους θέση. Πολλά L-αμινοξέα όπως η L-σερίνη, οργανικά οξέα ενδιάμεσα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος όπως πυροσταφυλικό, μηλικό κλπ. και γλυκοπρωτεΐνες τύπου βλεννίνη, είναι κοινά χημειο-προσελκυστικά. Το χημειοτακτικό σύστημα του παθογόνου συνδέεται άμεσα με το μαστίγιο και επομένως με την κινητικότητά του. Έχει αποδειχθεί ότι χωρίς καμία ικανότητα ελεγχόμενης χημειοταξίας τα κύτταρα εξαλείφονται λόγω της φυσιολογικής περισταλτικότητας του εντέρου, καθώς αυτή η ικανότητα τα οδηγεί στο στρώμα του βλεννογόνου ή και στα επιθηλιακά κύτταρα κάτω από την βλεννογόνο. Το σύστημα χημειοτακτικής σηματοδότησης για συγκεκριμένη έλξη ή απώθηση βασίζεται στη δέσμευση των εξωγενών μορίων διέγερσης στους συμπληρωματικούς υποδοχείς της βακτηριακής εξωτερικής μεμβράνης και ακολουθείται από μετάδοση του σήματος μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών στον κινητήρα του μαστίγιου. Στην ακολουθία του γονιδιώματος του *C. jejuni*, έχουν εντοπιστεί ορθολογικά γονίδια χημειοταξίας *cheA*, *cheW*, *cheV*, *cheY*, *cheR* και *cheB* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες CheA (μία κινάση ιστιδίνης), CheW, CheV, CheY (ένας ρυθμιστής απόκρισης), CheR (μία μέθυλο-τρανσφεράση) και CheB (μία μέθυλο-εστεράση) αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες CheV και CheB μεσολαβούν στις προσαρμογές του σήματος, ενώ ο ρυθμιστής απόκρισης CheY είναι υπεύθυνος για τον έλεγχο της περιστροφής του μαστίγιου. Επίσης, οι πρωτεΐνες του συστήματος ενεργειακών

μεταφορέων του *C. jejuni* είναι οι CetA και CetB που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *cetA* και *cetB* (Dasti *et al.*, 2010, Igwaran & Okoh, 2019, Kreling *et al.*, 2020).

5.3. Προσκόλληση

Η πρώτη επαφή μεταξύ του *C. jejuni* και του ξενιστή (άνθρωπος ή πουλερικό), λαμβάνει χώρα στην μεμβράνη του εντερικού βλεννογόνου. Στην συνέχεια το παθογόνο διασχίζει την μεμβράνη αυτή και έρχεται σε επαφή με τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Η ικανότητα του παθογόνου να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο του ξενιστή, είναι προϋπόθεση για την εισβολή και κατά συνέπεια για τον αποικισμό. Η κυτταρική προσκόλληση είναι μία πολύπλοκη διαδικασία, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και γίνεται σε δύο βήματα. Στο πρώτο βήμα υπάρχει μία μη ειδική και αναστρέψιμη προσκόλληση που βασίζεται σε υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, ενώ στο δεύτερο βήμα λαμβάνει χώρα μία μη αναστρέψιμη και ειδική προσκόλληση. Η ειδική προσκόλληση ενός παθογόνου σε έναν ξενιστή απαιτεί υποδοχείς, αποτελούμενοι συνήθως από γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια, που βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια του ξενιστή και επίσης από προσκολλητίνες (adhesins), οι οποίες είναι συνήθως πρωτεϊνικά συστατικά της βακτηριακής κυτταρικής επιφάνειας και αλληλοεπιδρούν με το γλυκιδικό τμήμα των ξενιστικών υποδοχέων. Οι προσκολλητίνες και οι υποδοχείς συνήθως λειτουργούν συμπληρωματικά και με ειδικό τρόπο, ενώ το *C. jejuni* διαθέτει μία ποικιλία από προσκολλητίνες, που μεμονωμένα ή συλλογικά μπορούν να επηρεάσουν ή να διαμεσολαβήσουν τη βακτηριακή προσκόλληση σε διαφορετικές κυτταρικές δομές και σε διαφορετικούς ξενιστές. Από μελέτες έχουν γίνει γνωστοί μερικοί πιθανοί παράγοντες προσκόλλησης ή πρόσδεσης, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται η CadF, μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, ο αυτομεταφορέας CarA, η περιπλασματική πρωτεΐνη Peb1, η πρωτεΐνη FliA και η λιποπρωτεΐνη JlpA. Ειδικότερα, η καλύτερα μελετημένη προσκολλητίνη είναι η CadF (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cadF*), μία πρωτεΐνη 37 kDa της εξωτερικής μεμβράνης που συνδέεται με την φιβρονεκτίνη (fibronectin) των επιθηλιακών κυττάρων. Η φιβρονεκτίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 220 kDa, που υπάρχει στην βασική μεμβράνη (basement membrane) και στο χόριο του βλεννογόνου του εντερικού επιθηλίου. Επιπρόσθετα, μία άλλη πρωτεΐνη που δεσμεύεται με την φιβρονεκτίνη είναι η FliA (κωδικοποιείται από το γονίδιο *fliA*), που είναι ένα πολυμερές 46 kDa. Τόσο η πρωτεΐνη CadF, όσο και η FliA είναι απαραίτητες για την προσκόλληση του *C. jejuni* στην φιβρονεκτίνη του ξενιστικού κυττάρου, δρύνε με μη περιπτό τρόπο και αυτές απαιτούνται για τη διανομή των πρωτεϊνών CIA του παθογόνου στο κυτοσόλιο των ξενιστικών κυττάρων-στόχων. Από την άλλη πλευρά, η CarA (κωδικοποιείται από το γονίδιο *carA*) είναι μία λιποπρωτεΐνη εκτεθειμένη στην επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης με λειτουργία αυτόματου μεταφορέα, καθώς και με επίδραση στην προσκόλληση και διείσδυση στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. Επίσης, η Peb1

(κωδικοποιείται από το γονίδιο *reb1A*), είναι μία περιπλασματική δεσμευτική πρωτεΐνη και πιθανώς συμβάλλει στην προσκόλληση στα ξενιστικά κύτταρα με έμμεσο τρόπο λόγω της δράσης ως σαπερόνη (*chaperone*), μεταφέροντας την CadF στην εξωτερική μεμβράνη. Τέλος, η προσκολλητίνη JlpA που κωδικοποιείται από το γονίδιο *jlpA* είναι μία επιφανειακά εκτεθειμένη και γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 42,3 kDa (Ganan *et al.*, 2012, Igwaran & Okoh, 2019, Kreling *et al.*, 2020).

5.4. Διείσδυση/ Εισβολή

Μετά την μη αναστρέψιμη βακτηριακή προσκόλληση στα ξενιστικά εντερικά κύτταρα, προκαλείται αναδιάταξη του κυτταροσκελετού των κυττάρων αυτών μέσω μικρονημάτων και μικροσωληνίσκων. Έτσι, το *C. jejuni* μπορεί να διασχίζει τη κυτταρική μεμβράνη και να εισβάλλει στα κύτταρα κυρίως μέσω της ενδοκυττάρωσης. Η ικανότητα διείσδυσης είναι ένας σημαντικός παράγοντας, που σχετίζεται με την παθογένεια, ενώ η διεισδυτική ικανότητα των διάφορων στελεχών του μικροοργανισμού ποικίλει. Ένα αρχικό βήμα στην διαδικασία εισβολής, είναι η προεξοχή της μεμβράνης που προκαλείται, από τις μικρές Rho-GTPασες Rac1 και Cdc42. Στην συνέχεια, οι πρωτεϊνικές εξωκυτταρικές ουσίες των βακτηριών (πρωτεΐνες εισβολής, *invasins*), στις οποίες κατατάσσονται οι πρωτεΐνες CIA (*Campylobacter Invasion Antigens*), είναι απαραίτητες για την εισβολή στα κύτταρα. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες CIA (κωδικοποιούνται από γονίδια *cia*), που είναι γνωστό ότι συντίθενται παρουσία το χολικού συστατικού δεοξυχολικό, φαίνεται ότι αποτελούν το κλειδί για την εισβολή του παθογόνου και μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα ή κυτοσόλιο του ξενιστή με την βοήθεια του συστήματος έκκρισης των μαστίγιων T3SS. Γνωστές πρωτεΐνες CIA είναι η CiaB (κωδικοποιείται από το γονίδιο *ciaB*), που σχετίζεται με την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα και την προσκόλληση στα κύτταρα-στόχους, η CiaC (κωδικοποιείται από το γονίδιο *ciaC*) είναι απαραίτητη για την πλήρη εισβολή στα κύτταρα INT-407 (κύτταρα ανθρώπινου εντερικού επιθηλίου) και είναι εν μέρει υπεύθυνη για τις αναδιατάξεις του κυτταροσκελετού του ξενιστικών κυττάρων, που έχουν ως αποτέλεσμα την ανακατάταξη της μεμβράνης, η CiaI (κωδικοποιείται από το γονίδιο *ciaI*) έχει αναφερθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυτταρική επιβίωση του παθογόνου και πρόσφατα η CiaD (κωδικοποιείται από το γονίδιο *ciaD*) έχει αναγνωριστεί, ως ένας σημαντικός παράγοντας που απαιτείται για την μέγιστη εισβολή στα ξενιστικά κύτταρα. Τα βακτήρια που εισβάλλουν με επιτυχία στα κύτταρα, μπορούν να ζουν ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα του ξενιστικού κυττάρου ή μέσα σε μεμβρανικά επικαλυμμένα (*membrane-coated*) κυστίδια. Μετά την εισβολή, το *Campylobacter* μπορεί να επιβιώσει για μεγάλες χρονικές περιόδους μέσα στο κύτταρο, μέχρι οι περιβαλλοντικές συνθήκες να είναι βέλτιστες, για να προκαλέσει κυτταροτοξική απόκριση (Dasti *et al.*, 2010, Ganan *et al.*, 2012, García-Sánchez *et al.*, 2018, Kreling *et al.*, 2020).

5.5. Παραγωγή τοξίνης

Το *C. jejuni*, διεισδύοντας στο ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο, μπορεί να παράγει τοξίνες, όπως και άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και η πιο μελετημένη από αυτές είναι η κυτταροτοξική διασταλτική τοξίνη (CDT). Η ολοτοξίνη (holotoxin) CDT είναι μία AB₂ πρωτεΐνη, με τρεις υπομονάδες που κωδικοποιούνται από τα τρία γονίδια *cdtA*, *cdtB* και *cdtC* και ανήκουν στο οπερόνιο *cdtABC*. Τα γονιδιακά προϊόντα των *cdtA* και *cdtC* (πρωτεΐνες CdtA και CdtC), μεσολαβούν στην σύνδεση και στην εσωτερίκευση του ξενιστικού κυττάρου, ενώ το προϊόν του γονιδίου *cdtB* (πρωτεΐνη CdtB) αποτελεί το ενεργό/ τοξικό συστατικό της τοξίνης. Οι ετεροδιμερείς υπομονάδες CdtA και CdtC, δεσμεύονται στις λιπιδιακές σχεδίες (lipid rafts) της ευκαρυωτικής κυτταρικής μεμβράνης. Παράλληλα, η CdtB ενεργοποιεί την ενδοκυττάρωση του ξενιστικού κυττάρου, με δέσμευση στις πρωτεΐνες μικρονημάτων του κυτταροσκελετού (π.χ. βινκουλίνη), την αναδιάταξη της αρχιτεκτονικής του κυτταροσκελετού και μεταγενέστερες αλλαγές στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. Ως απόρροια των παραπάνω γεγονότων, πιστεύεται ότι οι δύο πρωτεΐνες CdtA και CdtC, είναι απαραίτητες για την απελευθέρωση της CdtB στο κύτταρο-ξενιστή. Αμέσως μετά τη απελευθέρωση της, η CdtB μεταφέρεται μέσω της συσκευής Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή όπου εκεί προκαλεί βλάβη στο DNA του ξενιστή σπάζοντας την διπλή έλικά του. Αυτό προκαλείται, καθώς η πρωτεΐνη αυτή έχει παρόμοια δράση με αυτή του ενζύμου δεσοξυριβονουκλεάσης I που είναι μία DNAαση. Η βλάβη στο DNA προκαλεί τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₂/M των ευκαρυωτικών κυττάρων, εμποδίζοντας τα να εισέλθουν σε μίτωση και κατά συνέπεια ξεκινά την απόπτωση τους. Στην συνέχεια, ενεργοποιούνται προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-1β, η IL-6, και IL-8 και οδοί σηματοδότησης μέσω του παράγοντα μεταγραφής NF-κB. Αυτή η φλεγμονή οδηγεί σε γαστρεντερίτιδα, που χαρακτηρίζεται σε κυτταρικό επίπεδο, από βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων, μεταβολή της λειτουργικής ικανότητας των ιστών και διευκόλυνση της βακτηριακής εισβολής στον υποκείμενο ιστό (Bolton, 2015, Kreling *et al.*, 2020, Silva J. *et al.*, 2011, Young *et al.*, 2007).

5.6. Σύστημα πρόσληψης σιδήρου

Ο σίδηρος είναι βασικό στοιχείο, αφού είναι συμπαραγόντας σε πολλές πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και στις βασικές κυτταρικές οδούς των παθογόνων και των ξενιστών τους. Υπάρχει όμως, σε περιορισμένη ποσότητα (χαμηλή διαλυτότητα του σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH) σε πολλά βακτήρια. Υπό υδάτινες αερόβιες συνθήκες σε φυσιολογικό pH, ο σίδηρος υπάρχει κυρίως ως τρισθενής σίδηρος Fe⁺³. Η πρόσληψη σιδήρου για πολλούς μικροοργανισμούς, είναι

απαραίτητη για τον αποικισμό και την μόλυνση του ξενιστή και επιτυγχάνεται με την έκκριση σιδηροφορέων (siderophores) με υψηλή συγγένεια και επιλεκτικότητα για το Fe^{+3} (ferric iron). Οι σιδηροφορείς αναγνωρίζονται και δεσμεύονται από τους υποδοχείς της μεμβράνης, με αποτέλεσμα να μεσολαβούν στην πρόσληψη του Fe^{+3} από το κύτταρο. Το *C. jejuni* δεν έχει την ικανότητα να συνθέτει τους δικούς του σιδηροφορείς, αλλά διαθέτει ένα σύστημα πρόσληψης, που χρησιμοποιεί εξωγενείς σιδηροφορείς από τα μικρόβια του εντέρου. Συγκεκριμένα, η πρόσληψη σιδήρου διαμέσου του σιδηροφορέα εντεροβακτίνη (enterobactin), συνδέεται στενά με την παθογένεια του *C. jejuni*. Σε αυτό το βακτήριο, η πρόσληψη σιδήρου προκαλείται από διαφορετικούς υποδοχείς για διαφορετικές πηγές σιδήρου, όπως οι υποδοχείς σιδήρου εντεροβακτίνης (Ferric Enterobactin, FeEnt) της εξωτερικής μεμβράνης, που είναι προϊόντα της μετάφρασης των γονιδίων *cfra* και *cfraB*. Επίσης, σε αυτήν την διαδικασία εμπλέκονται: η CeuE που είναι περιπλασματική λιποπρωτεΐνη σύνδεσης της FeEnt και βοηθάει στην απόκτηση σιδήρου (κωδικοποιείται από το γονίδιο *ceuE*), ο Cj0178 που είναι ένας υποδοχέας της εξωτερικής μεμβράνης και χρησιμοποιείται για την μεταφορά δεσμευμένου σιδήρου (κωδικοποιείται από το γονίδιο *cj0178*) και η πρωτεΐνη Fur που είναι ρυθμιστής των περισσοτέρων γονιδίων που χρησιμοποιούνται στην πρόσληψη σιδήρου και ελέγχει την ομοιόστασή του (κωδικοποιείται από το γονίδιο *fur*). Εάν γίνουν μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια έχει αποδειχθεί ότι μειώνεται η ικανότητα αποικισμού του βακτηρίου στους ξενιστές. Το γονίδιο *chuA* που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα εξωτερικής μεμβράνης για αιμίνη και αιμοσφαιρίνη, υπερεκφράζεται κατά τον αποικισμό. Παράλληλα με τα παραπάνω, ο δισθενής σίδηρος Fe^{+2} (ferrous iron) διαχέεται μέσω της εξωτερικής μεμβράνης απαιτώντας μόνο μια πρωτεΐνη μεταφοράς, διαμέσου της μεμβράνης του κυτοπλάσματος, η οποία είναι η FeoB και κωδικοποιείται από το γονίδιο *feoB* (Bolton, 2015, Garcia-Sanchez *et al.*, 2018, Kreling *et al.*, 2020).

5.7. Δομές υδατανθράκων

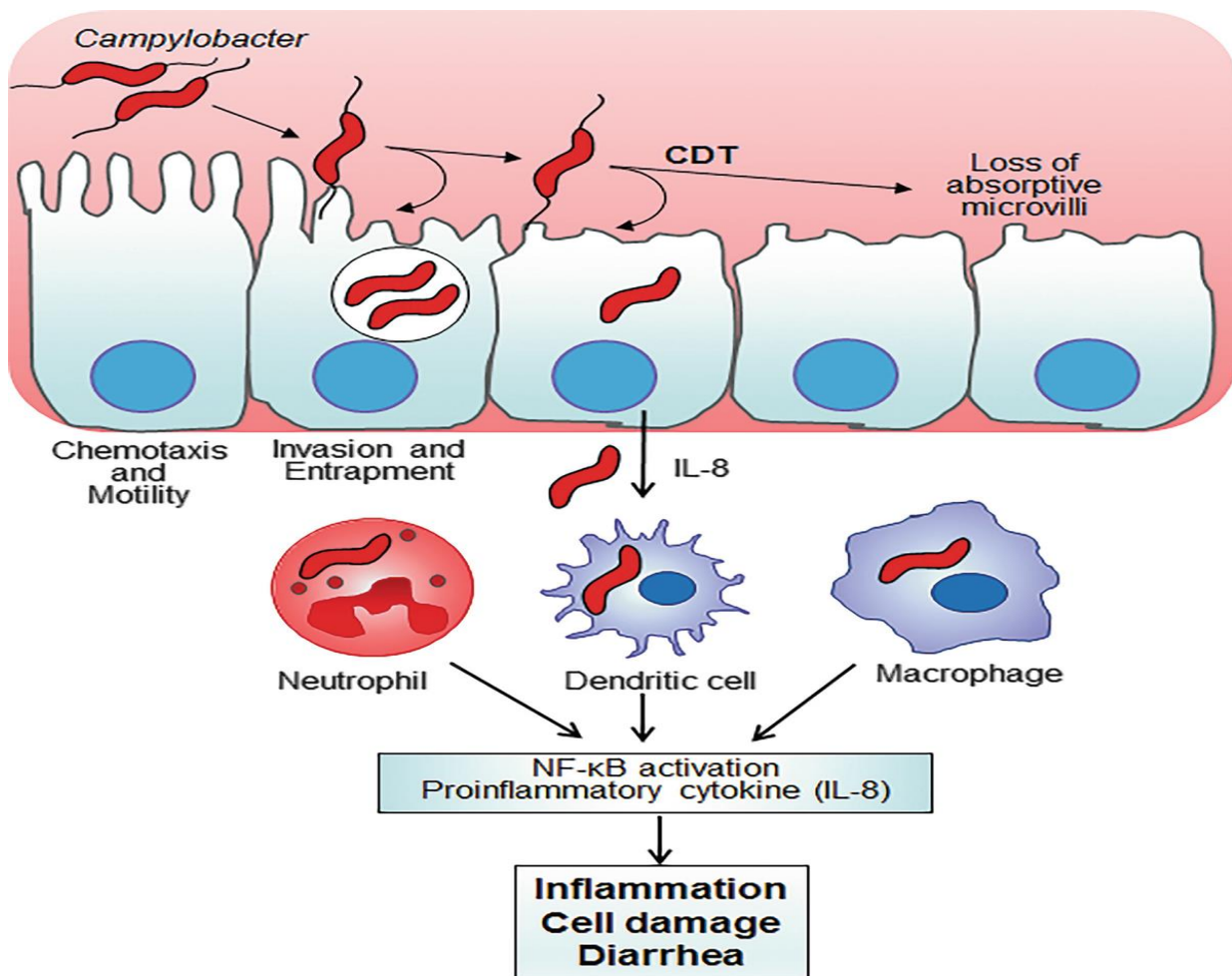
Τέσσερις κατηγορίες δομών υδατανθράκων, μπορούν να βρεθούν στην επιφάνεια του κυττάρου *C. jejuni*, όπως λιπο-ολιγοσακχαρίτες (LOS), πολυσακχαρίτης κάψας (Capsular polysaccharides, CPS), O- και N- συνδεδεμένες γλυκάνες (O- και N-linked glycans). Αυτές οι δομές υδατανθράκων, παίζουν κεντρικό ρόλο στην αλληλεπίδραση ξενιστή-βακτηρίου και είναι σημαντικές για τη μολυσματικότητα και αντιγονικότητα. Αρχικά, το μόριο του LOS σχηματίζεται από έναν πυρήνα ολιγοσακχαρίτη και λιπίδιο A και έχει συσχετιστεί με διάφορες λειτουργίες, όπως ανοσο-διαφυγή, προσκόλληση και εισβολή στα ξενιστικά κύτταρα. Η σιαλυλίωση του LOS, αυξάνει το διεισδυτικό δυναμικό και μειώνει την ανοσογονικότητα (immunogenicity) των στελεχών του *C. jejuni*. Οι σιαλυλωμένοι LOS (Sialylated LOS) του βακτηρίου, μπορούν να μιμηθούν ανθρώπινα αντιγόνα, όπως αυτά που εμπλέκονται στην εμφάνιση του συνδρόμου GBS και Miller Fisher. Από την άλλη

πλευρά, ο πολυσακχαρίτης κάψας (CPS) του *C. jejuni*, βρίσκεται στο εξωτερικό στρώμα της κυτταρικής επιφάνειάς του και αποτελείται από μια σπάνια δομή διαφορετικών επαναλαμβανόμενων μονάδων σακχάρων. Ειδικότερα, το μόριο του CPS, αποτελείται από το σάκχαρο επτόζη, με ασυνήθιστη διαμόρφωση (π.χ. *altro-*, *ido-*, *gulo-* και *talo-*) και μπορούν να γίνουν μη στοιχειομετρικές τροποποιήσεις στα σάκχαρα, όπως αυτές της αιθανολαμίνης, της αμινογλυκερόλης και του φωσφοραμιδικού μεθυλεστέρα (MeOPN). Ο CPS είναι ο κύριος ορο-καθοριστικός (sero-determinant) παράγοντας του συστήματος προσδιορισμού ορότυπων Penner (Penner serotyping scheme), των στελεχών του *C. jejuni* και υπάρχουν αυτήν τη στιγμή περισσότεροι από 47 ορότυποι Penner αυτού του μικροοργανισμού. Ο CPS έχει ρόλο στην παθογένεια, αφού είναι απαραίτητος για την προσκόλληση και διείσδυση στα ξενιστικά εντερικά κύτταρα και για την αποφυγή του ξενιστικού ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά σχετίζεται και με άλλες λειτουργίες, όπως προστασία του βακτηρίου από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και διευκόλυνση στην επιβίωση. Κύτταρα του βακτηρίου χωρίς κάψα, λόγω πιθανής μετάλλαξης στο γονίδιο *kspM* (κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μεταφοράς πολυσακχαρίτη της κάψας KspM), δείχνουν μειωμένη ικανότητα εισβολής στα ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (κύτταρα INT407). Το γονίδιο *kspE* (χρησιμοποιείται για την βιοσύνθεση της κάψας), καθώς και άλλα γονίδια βιοσύνθεσης, βρίσκονται στην υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδιώματος του βακτηρίου και η έκφραση μπορεί να ενεργοποιηθεί και να απενεργοποιηθεί σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του κυττάρου. Παράλληλα, το N-συνδεδεμένο σύστημα γλυκοζυλίωσης του παθογόνου, κωδικοποιείται από τον πολυγονιδιακό τόπο *rgl* (*rgl* multigene locus) και είναι υπεύθυνο για την μετα-μεταφραστική τροποποίηση για παραπάνω από 60 περιπλασματικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της φλαγγελίνης. Η N-γλυκοζυλίωση διευκολύνει την ανοσολογική υπεκφυγή, αφού τα γλυκοζυλιακά τμήματα είναι ανοσοκυρίαρχα. Έτσι, υπάρχει περιορισμένη παραγωγή αντισωμάτων του πρωτεϊνικού κλάσματος και οι N-γλυκάνες προστατεύουν τις επιφανειακές πρωτεΐνες του βακτηρίου από τις πρωτεάσες του εντέρου. Αντιθέτως, η O-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση περιορίζεται μόνο στις υπομονάδες των μαστίγιων (Bolton, 2015, Elmi *et al.*, 2021, García-Sánchez *et al.*, 2018, Young *et al.*, 2007).

5.8. Πιθανές πρωτεάσες (putative proteases)

Ο πρόσφατος χαρακτηρισμός των πιθανών (putative) πρωτεασών του *C. jejuni*, αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό βήμα για την αναστολή της παθογένειας του βακτηρίου. Μέσω πρωτεϊνωματικής ανάλυσης σε συνδυασμό με σκιαγράφιση μολυσματικότητας, βασισμένη σε ένζυμα (enzymatic-based virulence profiling, EBVP), ανακαλύφθηκε ο ακριβής ρόλος των πιθανών πρωτεασών του βακτηρίου στην προσκόλληση και την εισβολή σε ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (IEC) *in vitro*. Αρχικά, το βακτήριο εκκρίνει κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης (OMVs), που περιέχουν τις

δραστικές πρωτεάσες σερίνης HtrA, Cj0511 και Cj1365c. Ωστόσο ο υπεύθυνος μηχανισμός για την πληθώρα αυτών των πρωτεασών σερίνης στα OMVs παραμένει αόριστος. Οι πρωτεάσες του βακτηρίου, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στις στοχευμένες βλάβες στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* και από άλλες *in vitro* μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι, η στοχευμένη πρωτεολυτική δραστηριότητα των OMVs του βακτηρίου, ενισχύει την προσκόλληση και την εισβολή στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Τέλος, μία μελέτη παρακολούθησης έδειξε ότι, το χολικό άλας ταυροχολικό νάτριο (ST), διεγείρει την έκφραση των γονιδίων *htrA*, *cj0511*, *cj1365* και του σπερονίου *cdtABC*, τονίζοντας την σημασία προσαρμογής των βακτηρίων στους ξενιστικούς μεταβολίτες (Elmi *et al.*, 2021).



Εικόνα 5.1. Σχηματική σύνοψη του μηχανισμού παθογένειας, μοριακά και κυτταρικά χαρακτηριστικά της έμφυτης ανοσοαπόκρισης στο *C. jejuni* σε ανθρώπους (Bhunia, 2018).

6. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΑΜΠΥΛΟΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΕΣ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Η καμπυλοβακτηρίωση ή εντερίτιδα του *Campylobacter* ορίζεται η εντερική λοίμωξη προκαλούμενη κυρίως από το *C. jejuni*. Τα κλινικά συμπτώματα της ποικίλουν από άτομο σε άτομο και συχνά αυτά δεν διακρίνονται από τα συμπτώματα της εντερίτιδας άλλων εντερικών παθογόνων όπως *Salmonella* και *Shigella*. Σύμφωνα με μελέτες, η ασθένεια φαίνεται να είναι λιγότερο σοβαρή στις αναπτυσσόμενες χώρες που κυρίως εκδηλώνεται στα παιδιά, από ότι στις αναπτυγμένες χώρες όπου εκδηλώνεται στις ηλικιακές ομάδες 0-4 ετών, 20-25 ετών και στην ηλικιακή ομάδα των 65 ετών και άνω. Η μολυσματική δόση για την εδραίωση της μόλυνσης από το *C. jejuni* θεωρείται χαμηλή και κυμαίνεται από 500 έως 800 κύτταρα. Η μέση περίοδος εμφάνισης συμπτωμάτων είναι 3 ημέρες με χρονικό εύρος από 1-7 ημέρες και αυτά συνήθως διαρκούν 2-3 ημέρες, αλλά μπορεί να παραμείνουν για περισσότερες μέρες (1 έως και 3 εβδομάδες). Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν διάρροια που διαρκεί 3-7 ημέρες (ήπια έως σοβαρή), κοιλιακό άλγος, ναυτία, πυρετό, κεφαλαλγία και έμετο. Η διάρροια που εμφανίζεται είναι είτε χαλαρή και υδαρής, είτε έντονα αιματηρή και στο αποκορύφωμα της ασθένειας λαμβάνουν χώρα 8-10 κινήσεις του εντέρου ανά ημέρα, ενώ ο πυρετός στους ασθενείς είναι είτε χαμηλού βαθμού, είτε πάνω από 40°C. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το βακτήριο είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενες εντός μίας εβδομάδας, αλλά περίπου στο 20% των ασθενών τα συμπτώματα μπορεί να διαρκέσουν μέχρι και 3 εβδομάδες. Επίσης, υποτροπές της ασθένειας συμβαίνουν στο 10%-25% των περιπτώσεων και ορισμένες περιπτώσεις απαιτούν ιατρική περίθαλψη, συμπεριλαμβανομένης της νοσηλείας. Ο θάνατος από αυτές τις λοιμώξεις είναι σπάνιος και περιορίζεται σε ασθενείς που είναι εξασθενημένοι από άλλες ασθένειες όπως καρκίνο, ηπατικές ασθένειες και AIDS/HIV. Οι οξείες μετα-μολυσματικές επιπλοκές είναι ασυνήθιστες και σε αυτές περιλαμβάνονται η σοβαρή γαστρεντερική αιμορραγία, το τοξικό megacolon, το αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο, η παγκρεατίτιδα, η μηνιγγίτιδα, η υποτροπιάζουσα κολίτιδα, η οξεία χολοκυστίτιδα, η μεσεντερική αδενίτιδα, η σκωληκοειδίτιδα, η σηψαιμία, η περιτονίτιδα, η βακτηριαιμία (παρατηρείται σε λιγότερο από το 1% των περιπτώσεων), η ενδοκαρδίτιδα, η οστεομυελίτιδα, η αποβολή των εγκύων, η μυοκαρδίτιδα και η περιμυοκαρδίτιδα. Όμως, οι ασθενείς εκτός από τα παραπάνω κινδυνεύουν από την εμφάνιση αυτοάνοσων ασθενειών, όπως είναι το σύνδρομο Guillain-Barré (GBS), το σύνδρομο Miller Fisher (MFS), ή δραστική αρθρίτιδα (Reactive Arthritis, RA) που συνήθως προκύπτουν 1-2 εβδομάδες μετά από την αρχική γαστρεντερική εκδήλωση. Επιπλέον, η λοίμωξη που προκαλεί το *C. jejuni* αποτελεί πιθανό έναυσμα για σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (irritable bowel syndrome, IBS), κοιλιοκάκη και φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Inflammatory bowel disease, IBD), που ίσως παραμείνουν δια βίου. Αρχικά, το σύνδρομο Guillain-Barré είναι οξεία αυτοάνοση ασθένεια που χαρακτηρίζεται από απομυελίνωση, δηλαδή απώλεια της προστατευτικής

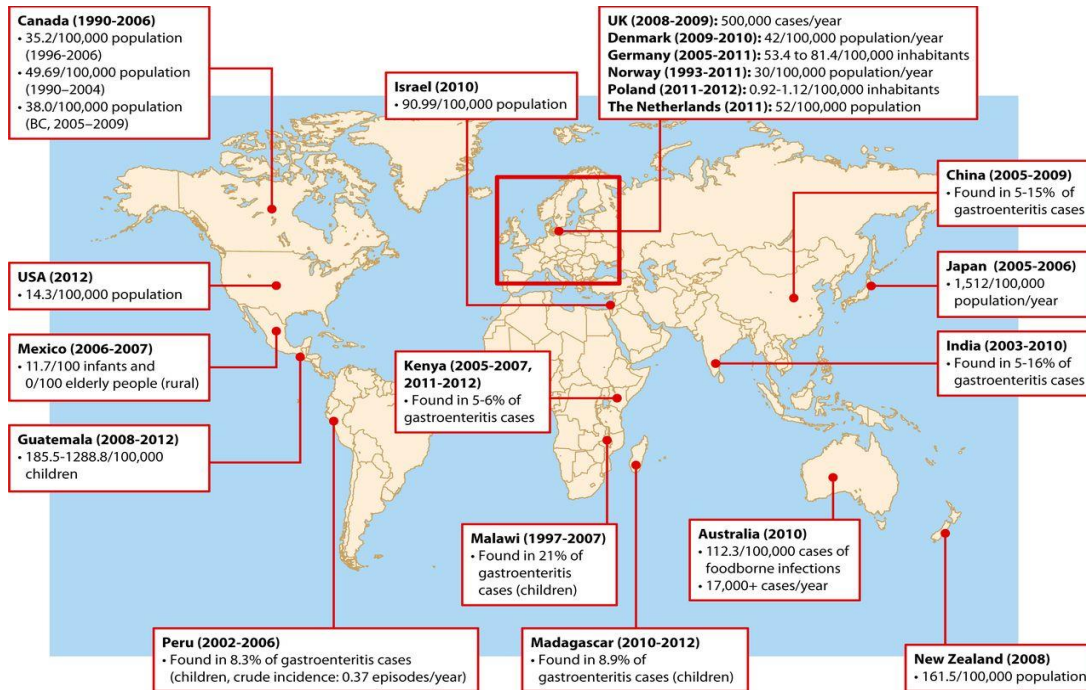
θήκης της μυελίνης, που περιβάλλει το νεύρο στο περιφερειακό νευρικό σύστημα. Το GBS οδηγεί σε οξεία φλεγμονή των περιφερικών νεύρων που εμποδίζει τη διεξαγωγή της διέγερσης των νεύρων από τον εγκέφαλο στους μύς και αντίστροφα. Η διαταραχή οδηγεί σε παράλυση, που διαρκεί αρκετές εβδομάδες έως χρόνια, συνήθως απαιτεί εντατική θεραπεία και συχνά αναπνευστική φροντίδα. Το σύνδρομο αυτό επηρεάζει 1-2 άτομα ανά 100.000 κατοίκους στις ΗΠΑ κάθε χρόνο και παρόλο που οι λοιμώξεις από *C. jejuni* αποτελούν συχνή αιτία του GBS, ο κίνδυνος εμφάνισης του μετά τη μόλυνση είναι στην πραγματικότητα αρκετά μικρός (κάτω από 1 περίπτωση GBS ανά 1000 λοιμώξεις του *C. jejuni*). Από μελέτες ορότυπων του *Campylobacter* έχει αποδειχθεί ότι στις ΗΠΑ οι περιπτώσεις GBS συνδέονται με τον ορότυπο O:19 του *C. jejuni*. Το GBS μπορεί να προκληθεί από σιαλυλιωμένο LOS στην κυτταρική επιφάνεια του βακτηριακού ορότυπου O:19, καθώς αυτός παρουσιάζει μοριακή ομοιότητα με γαγγλιοσίδες στα ανθρώπινα περιφερικά νεύρα. Η μίμηση γαγγλιοσίδων (ganglioside mimicry), είναι σημαντικός παράγοντας στην παθογένεια του GBS που σχετίζεται με το *C. jejuni*. Επίσης, η δραστική (ασηπτική) αρθρίτιδα ή σύνδρομο του Reiter, είναι μια αυτοάνοση απόκριση που προκαλεί φλεγμονή σε διάφορες αρθρώσεις κυρίως οι αστράγαλοι, τα γόνατα, οι καρποί και οι μικρές αρθρώσεις των χεριών (με μεταναστευτικό τρόπο) ως απόκριση στην μόλυνση του *C. jejuni*. Η αρθρίτιδα αυτή επηρεάζει περίπου το 1% των ασθενών και ιδιαίτερα εκείνους που έχουν το ανθρώπινο αντιγόνο λεμφοκυττάρων B27 (HLA-B27). Τέλος, η λοιμώδης γαστρεντερίτιδα λόγω του *C. jejuni* είναι ένας από τους κύριους παράγοντες προδιάθεσης για την ανάπτυξη του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου (IBS). Ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει ότι έως 36% των ατόμων με οξεία καμπυλοβακτηριδίωση αναπτύσσουν IBS εντός 1-2 ετών. Οι μελέτες σε ασθενείς που εμφάνισαν μετα-μολυσματικά το IBS, έδειξαν αύξηση των ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων και αύξηση της ρύθμισης των κυτοκινών στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου, χαρακτηριστικό μιας επίμονης ανοσολογικής ενεργοποίησης (Allos, 2001, Baaboua *et al.*, 2017, Facciola *et al.*, 2017, Hansson *et al.*, 2016, Heimesaat *et al.*, 2021, Hessulf *et al.*, 2016, Mousavi *et al.*, 2020, Silva *et al.*, 2018, Skirrow, 2003, Young *et al.*, 2007).

7. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ *Campylobacter*

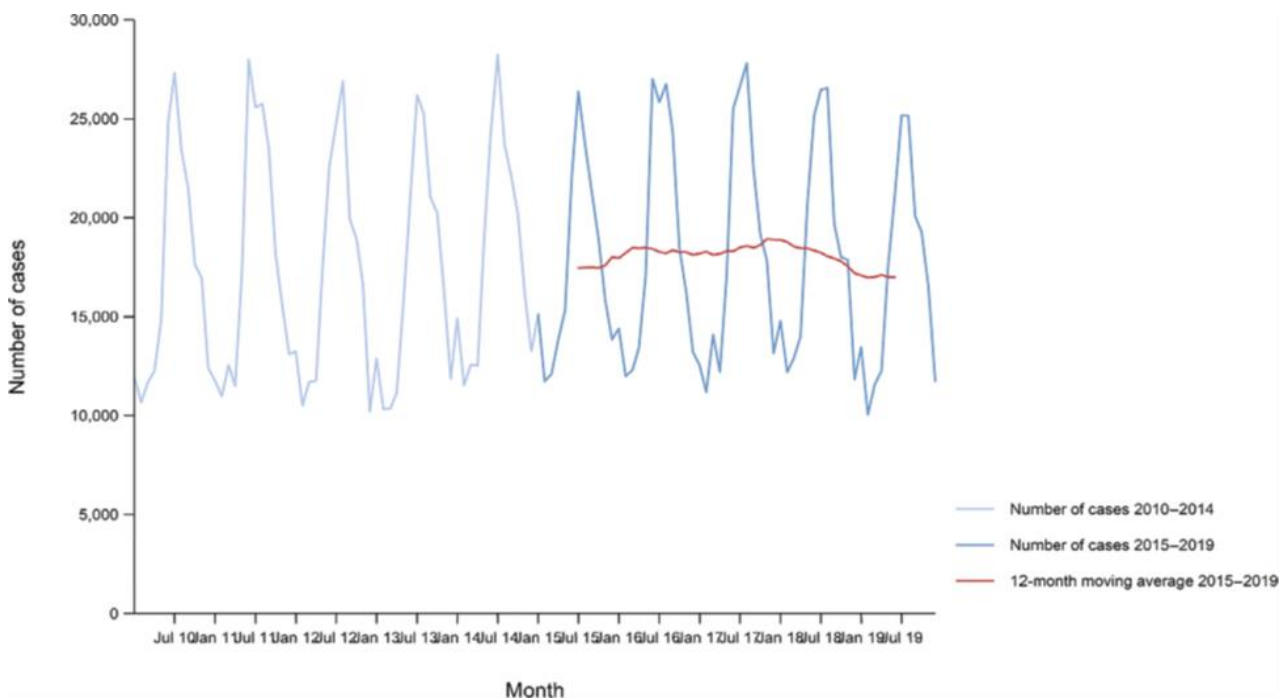
Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το *C. jejuni*, είναι ένας από τους βασικότερους αιτιολογικούς παράγοντες γαστρεντερίτιδας παγκοσμίως και έγινε γνωστή η αύξηση της παγκόσμιας συχνότητας εμφάνισης καμπυλοβακτηρίωσης από το 2005 και μετά. Ο αριθμός των περιπτώσεων καμπυλοβακτηρίωσης, έχει αυξηθεί στη Βόρεια Αμερική, Ευρώπη και Αυστραλία. Αν και τα επιδημιολογικά δεδομένα από την Αφρική, την Ασία και τη Μέση Ανατολή εξακολουθούν να είναι ελλιπή, δείχνουν ότι η μόλυνση από *Campylobacter* είναι ενδημική. Τα ελλιπή δεδομένα προκύπτουν, λόγω της έλλειψης προγραμμάτων επιτήρησης για την καμπυλοβακτηρίωση, γεγονός που καθιστά δύσκολη την εκτίμηση του βάρους αυτής της τροφικής ασθένειας. Ειδικότερα, στις ΗΠΑ υπάρχει ένα ενεργό σύστημα παρακολούθησης (FoodNet), που παρακολουθεί την εξάπλωση τροφιμογενών ασθενειών και ασχολείται με τον έλεγχο 7 βακτηριακών λοιμώξεων, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η καμπυλοβακτηρίωση (προκαλούμενη κυρίως από το *C. jejuni*). Ο ετήσιος αριθμός των κρουσμάτων καμπυλοβακτηρίωσης στις Ηνωμένες Πολιτείες με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα των χρονολογιών 1998-2008, εκτιμήθηκε σε 845.024 περιπτώσεις που είχαν ως αποτέλεσμα 8.463 νοσηλείες και 76 θανάτους. Σύμφωνα με το FoodNet, το 2012 το *Campylobacter* κατέλαβε την δεύτερη θέση ως αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων μετά από την *Salmonella* αφού οι λοιμώξεις (περιστατικό ανά 100.000 πληθυσμού) ήταν 6.793 των οποίων οι 2.082 ήταν του *C. jejuni*. Εκείνη την χρονιά, σημειώθηκε αύξηση κατά 14% της συχνότητας εμφάνισης καμπυλοβακτηρίωσης σε σύγκριση με την περίοδο 2006-2008 και το ποσοστό των νοσηλευόμενων ατόμων ήταν 31%. Το CDC την επόμενη χρονιά ανέφερε ότι, ο αριθμός επιβεβαιωμένων κρουσμάτων ήταν 6621 και το ποσοστό επίπτωσης ήταν 13,8 ανά 100.000 κατοίκους. Το κόστος της καμπυλοβακτηρίωσης είναι 1,7 δισεκατομμύρια δολάρια στις ΗΠΑ κάθε χρόνο, ενώ διαγιγνώσκονται ετησίως περίπου 20 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού και πολλά περιστατικά δεν διαγιγνώσκονται ή δεν αναφέρονται. Επίσης, η καμπυλοβακτηρίωση, είναι πιο συχνά κοινοποιηθείσα τροφιμογενής λοίμωξη στην Αυστραλία το 2010 με 16.968 περιπτώσεις και ο επιπολασμός της λοίμωξης αυτής αυξήθηκε κατά 6% σε σύγκριση με τα δεδομένα από το 2008 και το 2009. Έτσι, εκείνη την χρονιά το *Campylobacter* αναφέρθηκε ως δεύτερη κύρια αιτία οξείας γαστρεντερίτιδας μετά τον νοροϊό. Τέλος, στην Ευρώπη όλα τα δεδομένα που αφορούν την επιδημιολογία τροφιμογενών λοιμώξεων δημοσιεύονται ετησίως από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA). Στοιχεία της αρχής αυτής από το 2005 και μετά, δείχνουν ότι η καμπυλοβακτηρίωση, είναι η τροφιμογενής νόσος, που κοινοποιείται συχνότερα με πάνω από 190.000 αναφερόμενες περιπτώσεις κάθε χρόνο. Όμως, θεωρείται ότι ο πραγματικός αριθμός των περιπτώσεων, είναι περίπου εννέα εκατομμύρια κάθε χρονιά και το κόστος της καμπυλοβακτηρίωσης για τα συστήματα υγείας είναι περίπου 2,4 δισεκατομμύρια ευρώ ετησίως. Το 2009 από μία επιδημιολογική αξιολόγηση της καμπυλοβακτηρίωσης σε 27 κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, έγινε γνωστό πως οι περιπτώσεις λοιμώξεων από *Campylobacter* κυμαίνονταν

από 29,9 έως 13500 ανά 100.000 πληθυσμού που συνολικά ισοδυναμεί με 9,2 εκατομμύρια περιπτώσεις (με τα χαμηλότερα κρούσματα στη Φινλανδία και τη Σουηδία και τα υψηλότερα στη Βουλγαρία). Το 2011 υπήρξε συνεχή αύξηση των αναφερόμενων περιπτώσεων, δηλαδή αναφέρθηκαν συνολικά 220.209 περιπτώσεις μόλυνσης (2,2% περισσότερες σε σχέση με το 2010). Αντιθέτως, την χρονιά 2012 τα περιστατικά καμπυλοβακτηρίωσης, μειώθηκαν ελαφρά δηλαδή 214.268 περιπτώσεις μόλυνσης με μείωση 4,3% συγκριτικά με το 2011, ενώ το ποσοστό κοινοποίησης ήταν 55,49/100.000 κάτοικοι. Λαμβάνοντας υπόψη τον υψηλό αριθμό κρουσμάτων, η σοβαρότητα (αναφερόμενοι θάνατοι) ήταν χαμηλή (0,03%). Την επόμενη χρονιά, ο αριθμός των επιβεβαιωμένων αναφερθέντων κρουσμάτων ήταν 214.779, με ποσοστό κοινοποίησης της Ε.Ε. 64,8/100.000, σε παρόμοια επίπεδα με το 2012. Η θνησιμότητα ήταν χαμηλή (0,05%). Την περίοδο 2012-2013, το σύνολο των περιπτώσεων αυξήθηκε λόγω των δεδομένων της Κροατίας, όπου το 2013 ανέφερε για πρώτη φορά περιπτώσεις καμπυλοβακτηρίωσης. Σύμφωνα με την EFSA, το έτος 2015 αναφέρθηκαν 229.213 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης καμπυλοβακτηρίωσης, γεγονός αντιπροσωπεύει μία μείωση κατά 7.605 περιπτώσεις από την προηγούμενη χρονιά και το ποσοστό κοινοποίησης ήταν 65,5 ανά 100.000 κατοίκους με μείωση κατά 5,8% συγκριτικά με το 2014 (69,5 ανά 100.000 κατοίκους), αλλά σε παρόμοιο επίπεδο με την περίοδο 2012-2013. Ο αριθμός των αναφερόμενων θανάτων που προκλήθηκαν από καμπυλοβακτηρίωση αυξήθηκε από 25 θανάτους το 2014 σε 59 θανάτους το 2015 με αποτέλεσμα το ποσοστό θνητότητας να είναι 0,03% το οποίο είναι παρόμοιο με το μέσο ποσοστό των προηγούμενων πέντε χρόνων. Για το 2016, τα δεδομένα για την καμπυλοβακτηρίωση αναφέρθηκαν από 27 κράτη μέλη της ΕΕ και ο αριθμός των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων ήταν 246.307 αντιπροσωπεύοντας αύξηση κατά 14.173 περιπτώσεις από το 2015. Το ποσοστό κοινοποίησης ήταν 66,3 ανά 100.000 κατοίκους, δηλαδή αυξημένο κατά 6,1% συγκριτικά με την προηγούμενη χρονιά. Ο αριθμός των αναφερόμενων θανάτων ήταν 62, με το ποσοστό θνητότητας να παραμένει σταθερό (0,03%). Την επόμενη χρονιά με δεδομένα 27 κρατών μελών πάλι τα επιβεβαιωμένα κρούσματα ήταν 246.158 και το ποσοστό κοινοποίησης ήταν 64,8 περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμούς. Από τα παραπάνω, παρατηρήθηκε μια ελαφριά μείωση σε σύγκριση με το 2016. Ο αριθμός των αναφερόμενων θανάτων λόγω του *Campylobacter* ήταν 72, με αποτέλεσμα μία πολύ μικρή αύξηση στο ποσοστό θνητότητας (0,04%), σε σχέση με τα προηγούμενα χρόνια. Για το έτος 2018 με δεδομένα από 28 κράτη μέλη, οι επιβεβαιωμένες περιπτώσεις ανθρώπινης καμπυλοβακτηρίωσης ήταν 246.571, αντιστοιχώντας σε ποσοστό κοινοποίησης 64,1 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους, που ήταν σε παρόμοιο επίπεδο με το 2017. Εκείνη την χρονιά σημειώθηκαν 60 θάνατοι που οφειλόταν στο *Campylobacter* και έτσι το ποσοστό θνητότητας ήταν 0,03%, οπότε υπήρξε μια πολύ μικρή μείωση συγκριτικά με το 2017. Όσον αφορά το 2019, τα επιβεβαιωμένα κρούσματα που αναφέρθηκαν από 28 κράτη μέλη ήταν 220.682, με ποσοστό κοινοποίησης 59,7 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους. Από αυτό διαφαίνεται, πως υπήρξε μείωση κατά 6,9% σε σύγκριση με το 2018, ενώ αναφέρθηκαν 47 θάνατοι εξαιτίας της καμπυλοβακτηρίωσης με το ποσοστό θνητότητας να παραμένει σταθερό. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, το διάστημα 2009-2018 έχει

σημειωθεί αυξανόμενη τάση στον αριθμό των κρουσμάτων σε επίπεδο Ε.Ε., ενώ τα τελευταία 5 χρόνια (2015-19) η τάση των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων στην Ε.Ε. έχει σταθεροποιηθεί (European Food Safety Authority EFSA & European Centre for Disease Prevention and Control ECDC, 2016, 2017, 2018, 2019, 2021, Facciola *et al.*, 2017, Kaakoush *et al.*, 2015).



Εικόνα 7.1. Παγκόσμια επιδημιολογία της καμπυλοβακτηρίωσης (Kaakoush *et al.*, 2015).



Εικόνα 7.2. Η τάση στα αναφερόμενα επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινης καμπυλοβακτηρίωσης στην Ε.Ε/Ε.Ο.Χ ανά μήνα (EFSA & ECDC, 2021).

8. ΤΡΟΠΟΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΟΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗΣ

Ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας για την ανθρώπινη καμπυλοβακτηρίωση, είναι η διατήρηση της ενυδάτωσης (αντικατάσταση υγρών) και η ισορροπία των ηλεκτρολυτών. Οι σοβαρά αφυδατωμένοι ασθενείς, πρέπει να λαμβάνουν ταχεία αύξηση όγκου (rapid volume expansion), με ενδοφλέβια υγρά, ενώ για τους περισσότερους ασθενείς συνιστάται στοματική ενυδάτωση. Οι λοιμώξεις του *C. jejuni* είναι συνήθως αυτό-περιοριζόμενες και δεν ενδείκνυται η θεραπεία με αντιβιοτικά για απλές λοιμώξεις του *Campylobacter*. Η θεραπεία με αντιβιοτικά, είναι απαραίτητη σε συγκεκριμένες κλινικές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε ασθενείς με υψηλό πυρετό, αιματηρή διάρροια ή περισσότερα από οκτώ κόπρανα σε 24 h, σε βρέφη ή ηλικιωμένους, ασθενείς των οποίων τα συμπτώματα επιδεινώνονται ή επιμένουν για περισσότερο από 1 εβδομάδα από τη στιγμή της διάγνωσης, εγκυμονούσες γυναίκες και ασθενείς με σοβαρές ασθένειες, όπως εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, AIDS/HIV, θαλασσαιμία και υπογαμαγλοβουλιμία. Η αντιμικροβιακή θεραπεία αμέσως μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων, μπορεί να μειώσει τη μέση διάρκεια της ασθένειας από περίπου 10 ημέρες σε 5 ημέρες, ωστόσο εάν η θεραπεία καθυστερήσει (π.χ. έως ότου επιβεβαιωθεί η λοίμωξη από *C. jejuni* από ιατρικό εργαστήριο), μπορεί να μην είναι επιτυχής. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνταν πολύ συχνά στο παρελθόν, ήταν η κατηγορία αντιβιοτικών φθοροκινολόνες, με αποτέλεσμα να υπάρχει αντίσταση σε αυτά και να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Άλλα αντιβιοτικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η ερυθρομυκίνη (ανήκει στα μακρολίδια), όπου χορηγείται εύκολα, δεν προκαλεί σοβαρή τοξικότητα και έχει υψηλό βαθμό αποτελεσματικότητας, οι κινολόνες, αντιβιοτικά που ανήκουν στις βηταλακτάμες κ.α. Η χορήγηση αντιβιοτικών θα πρέπει να γίνεται με σύνεση και όπου είναι απαραίτητο, αλλιώς προκαλείται αντίσταση στα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και αυξάνεται η συχνότητα μόλυνσης από στελέχη του *Campylobacter* με αντίσταση σε πολλά από τα παραπάνω αντιβιοτικά. Αυτό καθιστά την αντιμετώπιση αυτής της ασθένειας ολοένα και δυσκολότερη (Allos, 2001, Altekruse *et al.*, 1999, Dai *et al.*, 2020, Igwaran *et al.*, 2019).

9. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ *C. jejuni* ΑΠΟ ΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Όπως έχει λεχθεί προηγουμένως, το *C. jejuni* και γενικότερα το γένος *Campylobacter*, βρίσκεται στο επίκεντρο πολλών ερευνητικών ομάδων στον κόσμο, λόγω των τροφιμογενών επιπτώσεων που προκαλεί. Οπότε, είναι μεγάλης σημασίας η ανίχνευσή του στα τρόφιμα, σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, κάτι το οποίο πραγματοποιείται με διάφορες μεθόδους ανίχνευσης και αυτές περιγράφονται παρακάτω.

9.1. Μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργειες ή παραδοσιακές μέθοδοι

Οι συμβατικές μέθοδοι μικροβιακής καλλιέργειας εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται στην καθημερινή εργαστηριακή ρουτίνα για την ανίχνευση, αλλά και για την απομόνωση των ειδών *Campylobacter* από δείγματα τροφίμων. Πολλά επίσημα πρωτόκολλα για την ανίχνευση του *Campylobacter* spp. σε τρόφιμα, όπως η μέθοδος ISO (ISO 10272), η μέθοδος FDA-CFSAN (BAM), η μέθοδος του Ηνωμένου Βασιλείου (PHLS) κ.λπ., είναι βασισμένες σε αυτές. Η απομόνωση του *C. jejuni* από τρόφιμα, βασίζεται στον εμπλουτισμό των δειγμάτων σε επιλεκτικούς ζωμούς, στον εμβολιασμό των πλακών επιλεκτικού άγαρ με μέρος από το εμπλουτισμένο δείγμα και στον προσδιορισμό των υποτιθέμενων, που καλλιεργούνται σε αυτές τις πλάκες. Τα τρόφιμα μπορεί να φιλοξενούν μικρό αριθμό κυττάρων *Campylobacter* ή τα κύτταρα αυτά μπορεί να είναι σοβαρά τραυματισμένα από τις διαδικασίες επεξεργασίας (ψύξη, αλάτιση, κατάψυξη, θέρμανση). Οπότε, έχουν αναπτυχθεί υγρά μέσα εμπλουτισμού, για την ανίχνευση χαμηλού αριθμού κυττάρων *Campylobacter* και για την προώθηση της ανάκτησης κυττάρων, που έχουν υποστεί βλάβη. Το βήμα του εμπλουτισμού για την ανίχνευση και απομόνωση των κυττάρων του *C. jejuni*, είναι αρκετά σημαντικό. Τα επιλεκτικά μέσα εμπλουτισμού, που συνήθως χρησιμοποιούνται, είναι ο ζωμός Bolton (BB), ο ζωμός εμπλουτισμού για *Campylobacter* (CEB) και ο ζωμός Preston (PB), ενώ χρησιμοποιούνται και άλλοι ζωμοί σε κάποια πρότυπα, όπως ο ζωμός Exeter στη μέθοδο PHLS και ο ζωμός Park και Sanders στην μέθοδο ISO. Μετά την προσθήκη των δειγμάτων στους επιλεκτικούς ζωμούς εμπλουτισμού, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, ακολουθεί η επώαση που πραγματοποιείται σε μικροαερόφιλη ατμόσφαιρα (ατμόσφαιρα με μειωμένη ποσότητα O₂, 5 έως 7% οξυγόνου, 10% διοξειδίου του άνθρακα και 80% αζώτου ή / και υδρογόνου) και σε υψηλή θερμοκρασία συνήθως στους 41,5-42°C (ιδίως σε δείγματα από κοτόπουλο) για 48 ώρες. Αυτές οι συνθήκες είναι απαραίτητο να επικρατούν κατά τον εμπλουτισμό και την καλλιέργεια σε τρυβλία, αφού το βακτήριο είναι μικροαερόφιλο και αναπτύσσεται βέλτιστα στους 42°C, αλλά και για την αυξημένη επιλεκτικότητα.

Ωστόσο, σε ορισμένα πρωτόκολλα, για να επιτραπεί ανάκτηση των τραυματισμένων κυττάρων, υποδεικνύεται μία αρχική θερμοκρασία επώασης στους 37°C για τις πρώτες 4 h του εμπλουτισμού και στην συνέχεια αυτή θερμοκρασία αυξάνεται στους 41,5-42°C για 44 h. Μόλις περάσουν οι 48 h, γίνεται επίστρωση (εμβολιασμός) σε μέσα απομόνωσης. Τα μέσα για την απομόνωση του *Campylobacter* από τρόφιμα ή και νερό, βασίζονται στα μέσα που είχαν αρχικά σχεδιαστεί για την ανίχνευση του βακτηρίου από δείγματα ανθρώπινων κοπράνων. Λόγω της ευαισθησίας του βακτηρίου στο οξυγόνο και στις οξειδωτικές ρίζες, έχουν αναπτυχθεί επιλεκτικά μέσα που περιέχουν έναν ή περισσότερους παράγοντες δέσμευσης του οξυγόνου, όπως αποστειρωμένο αίμα προβάτου ή αλόγου, σιδηρούχος σίδηρος, πυροσταφυλικό, καθώς και κάρβουνο ή άνθρακα (charcoal). Αυτές οι ουσίες προστίθενται και για λόγους διαφοροποίησης στα μέσα απομόνωσης. Εκτός από τους παραπάνω παράγοντες, στα μέσα απομόνωσης χρησιμοποιείται μία ποικιλία αντιβιοτικών με μία πιο μεγάλη συχνότητα των αντιβιοτικών κεφοπεραζόνη, αμφοτερικίνη Β, τριμεθοπρίμη και βανκομυκίνη. Αυτές οι εκλεκτικές ουσίες προστίθενται στο άγαρ ώστε να αναστείλουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών πέραν του *C. jejuni* ή γενικότερα *Campylobacter* spp., που είναι εγγενώς ανθεκτικά σε αυτές. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στα μέσα απομόνωσης, είναι τα ίδια και στις ίδιες συγκεντρώσεις, με αυτά που χρησιμοποιούνται στους ζυμούς εμπλουτισμού για να μην παρουσιαστούν προβλήματα ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Αρκετά επιλεκτικά μέσα έχουν αναπτυχθεί και δοκιμασθεί για την αποτελεσματικότητά τους, στην απομόνωση των *Campylobacter* spp. και ειδικότερα του *C. jejuni*, ενώ το πρώτο επιλεκτικό μέσο καλλιέργειας για την απομόνωση του *C. jejuni* αναπτύχθηκε το 1977 από τον Skirrow. Τα κοινά επιλεκτικά μέσα που χρησιμοποιούνται είναι το άγαρ Preston, το άγαρ Butzler Virion, το άγαρ Blase, το άγαρ αίματος Skirrow (Skirrow blood agar), το άγαρ αίματος Bolton καθώς και τα χρωμογόνα μέσα CCDA (charcoal cefoperazone deoxycholate agar, άγαρ με άνθρακα, κεφοπεραζόνη και δεοξυχολικό) και το mCCDA, που είναι τροποποίηση του CCDA. Τα δύο άγαρ που αναφέρθηκαν τελευταία, περιλαμβάνονται στην μέθοδο ISO και χρησιμοποιούνται ευρέως από τα εργαστήρια μικροβιολογίας τροφίμων. Ωστόσο, έχει αναπτυχθεί ένα νέο χρωμογόνο μέσο (CM-HT) για την ανίχνευση του *C. jejuni* σε ωμά πουλερικά και μέσα από μελέτες έχει αποδειχθεί κατάλληλο, αφού έχει ισοδύναμη ικανότητα ανίχνευσης του βακτηρίου με εκείνη του mCCDA, έχει επιλεκτική ικανότητα έναντι του *E. coli*, που παράγει εκτεταμένο φάσμα β-λακταμάσης (ESBL-producing *E. coli*) και παράγει μωβ αποικίες του βακτηρίου, οι οποίες διακρίνονται εύκολα σε φωτεινό υπόβαθρο. Οπότε, το CM-HT μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό μέσο απομόνωσης του βακτηρίου. Στην συνέχεια, αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της επίστρωσης σε κάποιο μέσο απομόνωσης, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, τα τρυβλία ή πλάκες άγαρ επωάζονται για 48 h στους 41,5-42 °C με μικροαερόφιλη ατμόσφαιρα σε προσαρμοσμένους επωαστήρες CO₂. Μετά την επώαση των τρυβλίων είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί ότι οι υποτιθέμενες αποικίες που σχηματίζονται στο μέσο ανήκουν στο *C. jejuni*. Οι υποτιθέμενες αποικίες επιλέγονται βάση μορφολογίας, η οποία επιβεβαιώνεται μικροσκοπικά και στην συνέχεια διάφορες τεχνικές και βιοχημικά τεστ διενεργούνται για τον θετικό προσδιορισμό του *C. jejuni*. Σε αυτά ανήκει η δοκιμή

οξειδάσης, κατά την οποία εάν εμφανιστεί σκούρο μωβ χρώμα στη περιοχή επαφής μεταξύ της προς εξέταση αποικία και του στυλεού (swab), που προηγουμένως έχει βυθιστεί σε ένα φρεσκοπααρασκευασμένο αντιδραστήριο οξειδάσης, τότε η αντίδραση είναι θετική που επιβεβαιώνει το *C. jejuni*. Με την πάροδο των χρόνων, η χρήση των βιοχημικών μεθόδων έχει μειωθεί και έχουν κυριαρχήσει άλλοι μέθοδοι, όπως είναι η δοκιμή συγκόλλησης σε λάτεξ (latex agglutination assay), η δοκιμή ELISA, καθώς και η PCR. Ανακεφαλαιωτικά, οι μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργειες για την απομόνωση και την ανίχνευση του *C. jejuni* στα διάφορα τρόφιμα, είναι ευαίσθητες και φθινές, ωστόσο παρουσιάζουν αρκετά προβλήματα. Οι μέθοδοι καλλιέργειας είναι χρονοβόρες, αφού συχνά διαρκούν περισσότερο από 48 h (συχνά 5-7 ημέρες για θετική ταυτοποίηση), κουραστικές, δυσκίνητες και ανιχνεύουν μόνο καλλιεργήσιμα *Campylobacter* και όχι την μη καλλιεργήσιμη μορφή τους (VBNC), που εξακολουθεί να αποτελεί απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Γι' αυτόν τον λόγο, εξετάζονται και άλλες μέθοδοι ανίχνευσης του βακτηρίου από τρόφιμα (Hadush & Pal, 2013, Hsieh *et al.*, 2018, Jackson *et al.*, 2009, Jacobs-Reitsman *et al.*, 2008, Natsos *et al.*, 2019, Oyarzabal & Fernández, 2016, Silva J. *et al.*, 2011, Suzuki & Yamamoto, 2009, Teramura *et al.*, 2015, Thornval & Hoorfar, 2021).

9.2. Δοκιμές που βασίζονται στην ανοσολογία (immune-based assays)

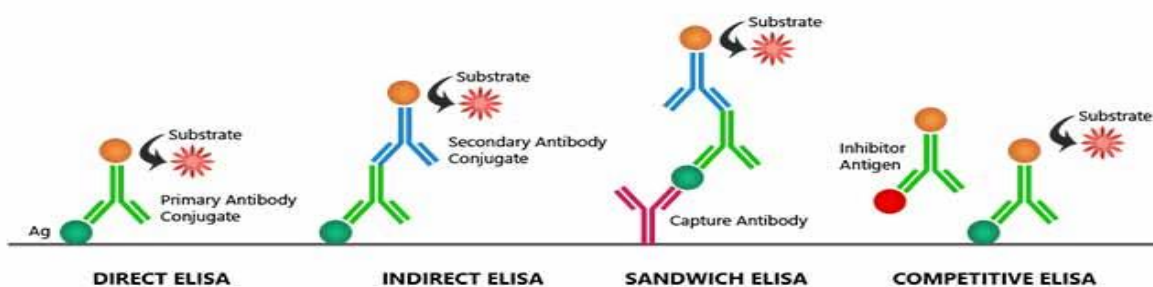
Λόγω της αναζήτησης εναλλακτικών μεθόδων για την ταυτοποίηση βιολογικών μορίων, αναπτύχθηκε η ενζυμικά συνδεδεμένη ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA ή EIA), κατά τη περίοδο 1960-70, ενώ η ανάπτυξη ανοσολογικών δοκιμών που βασίζονται στην αντίδραση αντιγόνου/αντισώματος για την ταυτοποίηση παθογόνων βακτηρίων, ήρθε με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των υβριδωμάτων για τη σύνθεση μονοκλωνικών αντισωμάτων στα μέσα της δεκαετίας του '70. Έκτοτε, έχουν αναπτυχθεί πολλές ανοσοδοκιμές για την ανίχνευση και ταυτοποίηση τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου του *Campylobacter* spp.. Αυτές οι δοκιμασίες κατατάσσονται στις ταχείες μεθόδους ανίχνευσης, όπου είναι αρκετά διαδεδομένες, αφού χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο από τα εργαστήρια μικροβιολογίας τροφίμων. Η απλούστερη δοκιμή είναι η δοκιμή συγκόλλησης ή συσσωμάτωσης με λάτεξ, κατά την οποία τα έγχρωμα σφαιρίδια λάτεξ επικαλυμμένα με αντισώματα ή κολλοειδή σωματίδια χρυσού, όταν έρθουν σε επαφή με συγκεκριμένα αντιγόνα του *Campylobacter*, παράγουν μια ορατή αντίδραση συσσωμάτωσης ή συγκόλλησης. Αυτή η μέθοδος είναι γρήγορη, αλλά δεν είναι τόσο ευαίσθητη, αφού χρειάζονται πάνω από 10^6 cfu για να είναι ορατή η αντίδραση. Η ELISA είναι η πιο δημοφιλής ανοσολογική δοκιμασία, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση παθογόνων συμπεριλαμβανομένου του *C. jejuni* στα τρόφιμα. Οι δοκιμές ELISA εκτελούνται συνήθως σε πλάκες πολυστυρενίου με 96-κοιλότητες (ή 384-κοιλότητες) που παθητικά δεσμεύουν αντισώματα και πρωτεΐνες και οι πλάκες αυτές ονομάζονται

‘πλάκες ELISA’ ή ‘πλάκες μικροπιλοδότσης’. Η μορφή της ELISA που χρησιμοποιείται συχνότερα είναι η ELISA τύπου σάντουιτς (sandwich ELISA), κατά την οποία ένα αντίσωμα συνδεδεμένο σε μία στερεή βάση (συνήθως πλάκες πολυστυρενίου) χρησιμοποιείται για τη σύλληψη ενός αντιγόνου του βακτηρίου-στόχου και μόλις ακινητοποιηθεί το αντιγόνο, προστίθεται ένα αντίσωμα ανίχνευσης με αποτέλεσμα τον σχηματισμό συμπλόκου με το αντιγόνο του βακτηρίου-στόχου. Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένα ένζυμο ή μπορεί να ανιχνεύεται από ένα δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με ένα ένζυμο μέσω βιοσύζευξης. Στην συνέχεια, αφού γίνει η έκπλυση των πλακών, για απομάκρυνση των μη ειδικά δεσμευμένων αντισωμάτων, προστίθεται ένα ενζυμικό υπόστρωμα στην πλάκα για την παραγωγή ενός ορατού σήματος, που δείχνει την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Τα ένζυμα που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η υπεροξειδάση αγριοραπανιού (Horse Radish Peroxidase, HRPO) και η αλκαλική φωσφατάση (AP). Διατίθενται εμπορικές EIA για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των καμπυλοβακτηρίων στα τρόφιμα και οι πιο κοινές είναι το VIDAS/MiniVIDAS CAM, η οπτική ανοσοδοκιμασία για *Campylobacter* TECRA (TECRA *Campylobacter* Visual Immunoassay), η Singlepath EIA μικροκυψελών τύπου σάντουιτς για *Campylobacter* (Singlepath *Campylobacter* microwell sandwich EIA) και η NH Immunochromato για *Campylobacter*. Το VIDAS/MiniVIDAS CAM, μία αυτοματοποιημένη ενζυμικά συνδεδεμένη ανοσοπροσοφητική δοκιμασία για την ανίχνευση του θερμοανθεκτικού *C. jejuni* και έχει λάβει την μεγαλύτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια. Σε αυτήν την δοκιμασία, τα δείγματα τροφίμων επωάζονται σε ζωμό εμπλουτισμού για 48 h, μετά τον εμπλουτισμό τα δείγματα βράζουν για 15 min και τέλος αναλύονται με ένα αυτοματοποιημένο ενζυμικό ανοσοαναλυτή. Μελέτες που έχουν γίνει δείχνουν ότι, η μέθοδος αυτή έχει παρόμοιες επιδόσεις με τις μεθόδους καλλιέργειας για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των φυσικών *Campylobacter* spp. στα τρόφιμα. Η TECRA για το *C. jejuni* χρησιμοποιεί αερόβιο εμπλουτισμό 40 h σε αποκλειστικό ζωμό, ακολουθούμενο από EIA 2 h. Η Singlepath ήταν συγκρίσιμη με τις συνήθεις μεθόδους καλλιέργειας, σε μια προκαταρκτική μελέτη με τεχνητά εμβολιασμένο κρέας. Η NH Immunochromato *Campylobacter* είναι μια δοκιμασία εμπλουτισμού σε δύο στάδια, που χρησιμοποιεί ανοσοχρωματογραφική ταυτοποίηση με αναφερόμενη ευαισθησία 55 CFU/ 25 g κρέατος κοτόπουλου, που έχει εμπλουτιστεί για δείγματα που δεν έχουν υποστεί κατάψυξη, αφού η κατάψυξη των δειγμάτων μειώνει την ευαισθησία περίπου 10 φορές. Οι εμπορικές ανοσοδοκιμές μπορούν να αποτελέσουν εργαλεία για τον γρήγορο έλεγχο των δειγμάτων τροφίμων, αφού μειώνουν το χρόνο εξέτασης και αποδίδουν με την ίδια ειδικότητα, όπως οι μέθοδοι καλλιέργειας, αλλά έχουν ευαισθησία $>10^4$ cfu/ml και απαιτούν ένα βήμα εμπλουτισμού πριν την εκτέλεσή τους. Τα θετικά αποτελέσματα της ELISA για το καμπυλοβακτήριο, επιβεβαιώνονται από καλλιέργειες του μικροοργανισμού σε επιλεκτικά μέσα. Επίσης, η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος πλευρικής ροής (lateral flow immunochromatographic method), είναι μία τροποποιημένη μέθοδος EIA, συσκευασμένη σε μία απλή συσκευή (ράβδο μέτρησης ή μέσα σε ένα πλαστικό περίβλημα) και χρησιμοποιείται για την ταχεία ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων και των καμπυλοβακτηρίων. Το δείγμα μετακινείται από το επίθεμα δείγματος

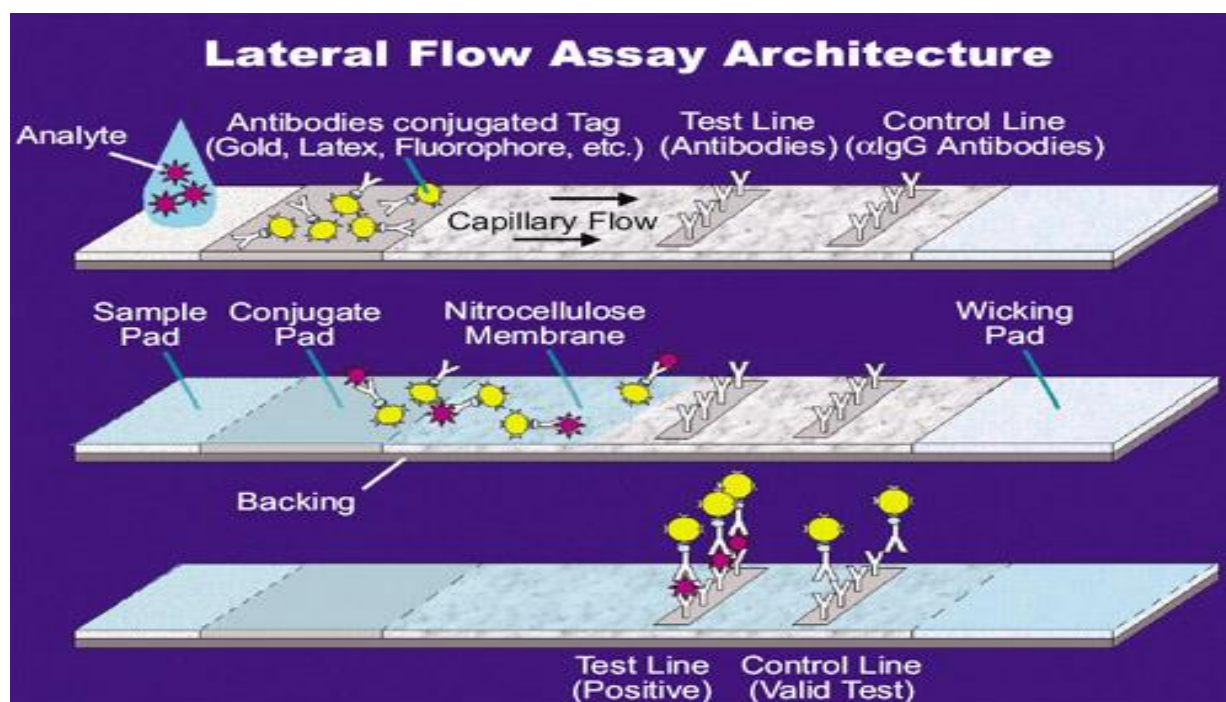
στη ζώνη σύλληψης (capture zone), διαμέσου του επιθέματος σύζευξης, όπου εκεί ο αναλυτής-στόχος (*C. jejuni*) δεσμεύεται στο αντίσωμα συζευγμένο με έγχρωμα σωματίδια. Στη ζώνη σύλληψης, το σύμπλοκο στόχου/συζεύγματος, συνδέεται με τα ακινητοποιημένα αντισώματα παράγοντας μια ορατή γραμμή στη μεμβράνη. Για να εξασφαλιστεί μια λειτουργική δοκιμή, το δείγμα μετακινείται περαιτέρω έως ότου φτάνει στη ζώνη ελέγχου, όπου η περίσσεια του συζεύγματος δεσμεύεται για να παραχθεί μια δεύτερη ορατή γραμμή στη μεμβράνη. Δύο σαφείς γραμμές στη μεμβράνη υποδηλώνουν θετικό αποτέλεσμα, ενώ μία μόνο γραμμή στη ζώνη ελέγχου, υποδηλώνει αρνητικό αποτέλεσμα. Οι ανοσοδοκιμασίες πλευρικής ροής πλεονεκτούν από την άποψη της απλότητας, του χρόνου λήψης αποτελέσματος (συνήθως εντός 15 min), της σταθερότητας με μεγάλη διάρκεια ζωής και του χαμηλού κόστους της δοκιμασίας, αλλά μπορεί να έχουν υψηλότερο όριο ανίχνευσης σε σύγκριση με την EIA. Τέλος, μία άλλη μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία ανίχνευση των καμπυλοβακτηρίων και ειδικότερα του *C. jejuni* στα τρόφιμα, είναι ο βιοαισθητήρας επιφανειακού πλασμονικού συντονισμού (surface plasmon resonance biosensor, SPR). Ο βιοαισθητήρας SPR είναι ένας από τους πιο ευαίσθητους οπτικούς βιοαισθητήρες, ενώ δεν χρειάζεται αντιδραστήρια ή ετικέτες (labels) για την ανίχνευση του αναλυτή-στόχου. Το ακινητοποιημένο βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιοϋποδοχέας), μπορεί να αναγεννηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί για συνεχή ή πολλαπλή ανίχνευση και επειδή ο βιοϋποδοχέας και ο μετατροπέας ενσωματώνονται σε έναν ενιαίο αισθητήρα. Οπότε, η επιτόπια ανίχνευση μπορεί να επιτευχθεί εύκολα. Παρόλο που διάφορα βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης είναι διαθέσιμα ως υποδοχείς (ένζυμα, αντισώματα, μικρόβια και οργανίδια), τα αντισώματα χρησιμοποιούνται ευρέως ως αποτελεσματικός συνεργάτης δέσμευσης στον βιοαισθητήρα SPR. Αν και έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο τα μονοκλωνικά, όσο και τα πολυκλωνικά αντισώματα, τα πολυκλωνικά έχουν αναφερθεί ως η κυρίαρχη μορφή αντισώματος που χρησιμοποιείται σε αρκετές μελέτες που έχουν διεξαχθεί. Κατά την μέτρηση ενός αναλύτη με βιοαισθητήρα SPR, ο συνδέτης (ligand) ή ο βιοϋποδοχέας αρχικά ακινητοποιείται στην επιφάνεια του αισθητήρα και στην συνέχεια ο αναλύτης διέρχεται από ένα μικρορευστονικό κανάλι (microfluidic channel) πάνω από τον συνδέτη. Η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του αναλύτη και του συνδέτη, δημιουργεί ένα μετρήσιμο σήμα που ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται. Στον συμβατικό βιοαισθητήρα επιφανειακού πλασμονικού συντονισμού, η αλληλεπίδραση μεταξύ του αναλύτη και της επιφάνειας του αισθητήρα, έχει ως αποτέλεσμα μία ταχεία προσρόφηση που οδηγεί σε μία αρχική αύξηση της γωνίας SPR (φάση σύνδεσης) ακολουθούμενη από κορεσμό της επιφάνειας (φάση διαχωρισμού) που παρατηρείται ως εμφάνιση οριζοντίωσης (plateau) στο αισθητηρογράφημα. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την αντικατάσταση (φάση αναγέννησης) του αναλύτη με ρυθμιστικό διάλυμα, για την απομάκρυνση των χαλαρά συνδεδεμένων υλικών και την αναγέννηση της επιφάνειας. Μέχρι σήμερα για την ανίχνευση του *C. jejuni* μέσω του βιοαισθητήρα SPR, χρησιμοποιείται η μορφή άμεσης δοκιμασίας (direct assay format), ενώ άλλες μορφές, όπως είναι η δοκιμασία σάντουιτς και η δοκιμασία σάντουιτς με ενίσχυση νανοϋλικών, δεν έχουν δοκιμαστεί ακόμη. Ο βιοαισθητήρας αυτός πλεονεκτεί έναντι των άλλων μεθόδων λόγω του μικρότερου χρόνου ανίχνευσης, των αξιόπιστων και

αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων. Ωστόσο, η ευαισθησία είναι ένα ζήτημα λόγω του περιορισμένου βάθους διείσδυσης των κυμάτων ευρείας ροής στον SPR, ιδίως στην περίπτωση μελέτης ενός παθογόνου μεγάλου μεγέθους όπως το *C. jejuni* (Khan *et al.*, 2018, Masdor *et al.*, 2017, Ricke *et al.*, 2019, Oyarzabal & Battie, 2012).

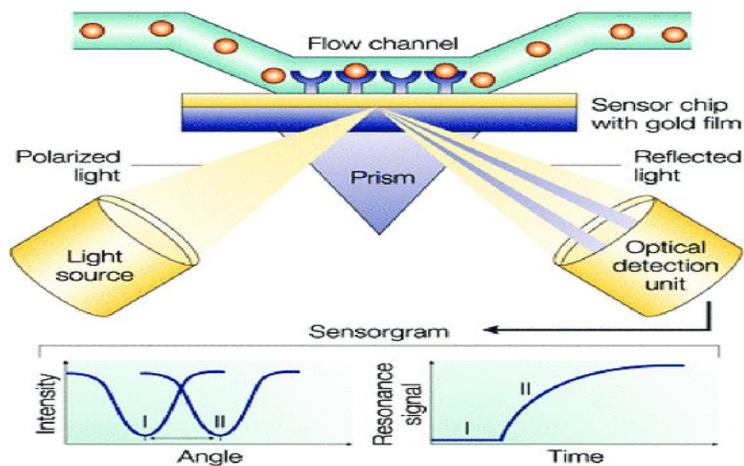
Types of ELISA



Εικόνα 9.2.1. Τύποι της δοκιμασίας ELISA: Άμεση ELISA, Έμμεση ELISA, ELISA τύπου σάντουιτς, ανταγωνιστική ELISA. Πηγή φωτογραφίας: <https://microbenotes.com/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>.



Εικόνα 9.2.2. Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας πλευρικής ροής. Πηγή: Εθνική Υπηρεσία Αεροναυτικής και Διαστήματος των ΗΠΑ, US NASA μέσω Wikimedia Commons.



Εικόνα 9.2.3. Σχηματική απεικόνιση ενός SPR βιοαισθητήρα. Copyright 2002 από Nature Reviews Drug Discovery.

9.3. Μοριακές μέθοδοι ή μέθοδοι ανίχνευσης που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα

Τις τελευταίες δεκαετίες οι μοριακές μέθοδοι, δηλαδή μέθοδοι με βάση το νουκλεϊκό οξύ θεωρούνται ως πολλά υποσχόμενες εναλλακτικές λύσεις για γρήγορη και ακριβή ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των καμπυλοβακτηρίων σε τρόφιμα. Αρχικά, η πιο δημοφιλής μοριακή μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του *C. jejuni*, είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction). Η συμβατική PCR βασίζεται στη αρχή της ενζυμικής αντιγραφής νουκλεϊκών οξέων και εφαρμόζεται για τον γρήγορο και εύκολο πολυμερισμό ή ενίσχυση (amplification) του DNA. Το DNA, ως το κύριο μόριο που εξετάζεται από τις τεχνικές αυτές, εξάγεται από δείγματα τροφίμων ή καλλιέργειες εμπλουτισμού για περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Η ολική εξαγωγή DNA είναι απαραίτητη πριν από την PCR και επιτυγχάνεται με κατάλληλες τεχνικές εκχύλισης, κάποιες από τις οποίες είναι ο βρασμός των δειγμάτων (πχ. κρέας πουλερικών), ένα kit εκχύλισης βακτηριακού DNA και η εκχύλιση φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Για τη τεχνική PCR, παρασκευάζεται ένα μίγμα αντιδραστηρίων, ώστε να παραχθεί ένα ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, που περιλαμβάνει χλωριούχο μαγνήσιο, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs, δηλαδή βάσεις γουανίνης, αδερίνης, θυμίνης και κυτοσίνης), ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές PCR) συμπληρωματικά προς το γονίδιο ενδιαφέροντος, το ένζυμο Taq πολυμεράση και το δείγμα DNA. Οι εκκινητές μπορεί να είναι μεταξύ 18 και 35 ζεύγη βάσεων (base pair, bp) και συνήθως πολυμερίζουν τμήματα DNA 200-800 bp. Το μείγμα τοποθετείται σε έναν θερμοκυκλοποιητή, που προγραμματίζεται για μία σειρά κύκλων ανάλογα τον μικροοργανισμό και τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται. Τα τρία βασικά βήματα που διενεργούνται είναι: η μετουσίωση (denaturation), ο υβριδισμός (annealing) και η

επιμήκυνση ή πολυμερισμός (extension). Στο πρώτο βήμα, το δίκλωνο DNA, γνωστό ως μήτρα DNA, αποδιατάσσεται στις δύο μονές του αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94°C για το *Campylobacter*), στην συνέχεια σε θερμοκρασία 52-54°C ακολουθεί η συνένωση και ο υβριδισμός των εκκινητών σε καθένα από τα δύο μονόκλινα DNA και στο τέλος σε θερμοκρασία 72°C, οι εκκινητές επεκτείνονται με την βοήθεια της θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης (Taq πολυμεράση). Με την επιμήκυνση και την επέκταση των εκκινητών δημιουργείται 1 δίκλωνο DNA, από κάθε κλώνο της μήτρας DNA, πανομοιότυπο με τη μήτρα DNA. Στο τέλος του κάθε κύκλου (ο καθένας αποτελείται από τα παραπάνω τρία στάδια), η ποσότητα των προϊόντων της PCR θεωρητικά διπλασιάζεται. Οι εκκινητές PCR στοχεύουν τυπικά αλληλουχίες rDNA και rRNA μοναδικές για το *C. jejuni*. Συνήθως, κεντρικοί στόχοι είναι η περιοχή 16S rRNA και η περιοχή 16S rDNA, ενώ με την πάροδο των ετών έχουν μελετηθεί πιο συγκεκριμένοι γονιδιακοί στόχοι, όπως είναι περιοχές ανάντη (upstream regions) των γονιδίων φλαγγελίνης *flaA* και *flaB* για τη διαφοροποίηση των *C. jejuni* και *C. coli*, το γονίδιο της ιππουρικάσης (*hipO*) ειδικό για το *C. jejuni*, καθώς εξετάζονται γονίδια παθογένειας και τοξινών, όπως τα *cadF* και *cdtB*. Μετά τον πολυμερισμό, τα προϊόντα της PCR μπορούν να οπτικοποιηθούν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, όπου έχει γίνει χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide). Η συμβατική PCR είναι ένα ποιοτικό μέτρο ανίχνευσης του *C. jejuni* και δεν επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του βακτηρίου, καθώς και είναι απαιτητική στο τεχνικό προσωπικό λόγω της εμπειρίας που απαιτείται για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης με ενισχυμένο DNA. Υπάρχουν αρκετές εναλλακτικές μέθοδοι της συμβατικής PCR, που είτε χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια μικροβιολογίας τροφίμων ήδη, είτε εξετάζεται η χρήση τους και αυτές είναι η πολλαπλή ή πολυπλεξική PCR (multiplex, mPCR), ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) και η ψηφιακή PCR (dPCR). Η πολλαπλή PCR (mPCR, multiplex PCR), που έχει αναπτυχθεί πρόσφατα, επιτρέπει την γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση 2 ή περισσότερων ειδών στο ίδιο δείγμα. Αυτή η προσέγγιση έχει καθιερωθεί για την ταχεία αναγνώριση διάφορων ειδών *Campylobacter* συμπεριλαμβανομένου του *C. jejuni*. Ως εκ τούτου, είναι μια ελκυστική μεθοδολογία για τον έλεγχο του επιπολασμού στη βιομηχανία πουλερικών, καθώς ένα δείγμα μπορεί να αποδώσει πολλές ταυτοποιήσεις γρήγορα και αποτελεσματικά. Η mPCR για την ανίχνευση του *Campylobacter* spp. έχει αποδειχθεί χρήσιμη για την ταυτοποίηση πολλαπλών ειδών σε δείγματα παραγωγής τροφίμων. Οι δοκιμασίες πολλαπλής PCR έχουν τη δυνατότητα να προσδιορίσουν πολύ συγκεκριμένα εάν υπάρχει καμπυλοβακτήριο. Όμως, η τεχνική αυτή έχει αρκετούς περιορισμούς, όπως ο εντοπισμός ή η απόκτηση εκκινητών, που έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες υβριδισμού και απαιτούνται πολύπλοκες μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος, καθώς και χειρισμού των προϊόντων ενίσχυσης, δηλαδή μέθοδοι ανίχνευσης με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή, γεγονός που εμποδίζει τη χρήση ρουτίνας αυτών των μεθόδων σε εργαστήρια μικροβιολογίας τροφίμων. Για αυτό τον λόγο, έχουν αναπτυχθεί πιο γρήγορες τεχνικές PCR, όπως είναι η PCR πραγματικού χρόνου. Η PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR (qPCR), είναι μία τεχνολογία που ποσοτικοποιεί αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων των βακτηρίων-στόχων και δίνει την δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης κατά την διάρκεια της εξέλιξής της. Αυτό

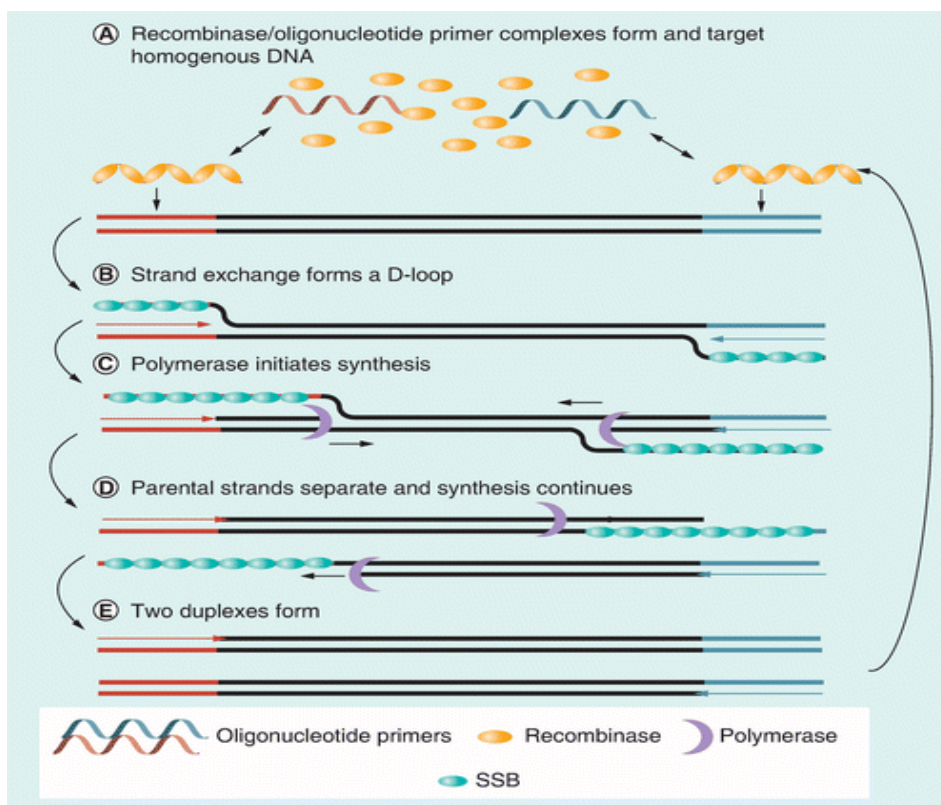
κατέστη δυνατό, με την βοήθεια παρεμβαλλόμενων χρωστικών φθορισμού που μπορούν να ανιχνευθούν με εξειδικευμένα συστήματα απεικόνισης λέιζερ. Οι χρωστικές αυτές συσσωρεύονται με κάθε κύκλο έχοντας ένταση, που είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα του πρότυπου DNA-στόχου. Ο φθορισμός μπορεί, είτε να εισαχθεί στην αντίδραση μέσω μη ειδικών χρωστικών, που συνδέονται με το DNA, όπως το πράσινο SYBR, είτε χρησιμοποιώντας ανιχνευτές με διαφορετικές φθορίζουσες ετικέτες, που συνήθως αναφέρεται ως σύστημα TaqMan. Μία μέθοδος που ανήκει στο σύστημα TaqMan, είναι η TaqMan 5 nuclease PCR method. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί έναν φθοριογενώς επισημασμένο ανιχνευτή, που όταν υβριδοποιείται και διασπάται, επιτρέπει την ανίχνευση του προϊόντος PCR που συσσωρεύεται κατά την αντίδραση πολυμερισμού. Η εκπομπή φθορισμού είναι το άμεσο αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης αυτού του ανιχνευτή από το συγκεκριμένο προϊόν της PCR. Η αύξηση αυτή μπορεί να παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας την ακριβή ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας DNA ή RNA. Παρόλο που, σκοπός της PCR πραγματικού χρόνου είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός βακτηρίων-στόχων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ποιοτική ανάλυση. Η qPCR χρησιμοποιείται από τους επιστήμονες τροφίμων, για τη διαχείριση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων, αφού η εφαρμογή της στην βιομηχανία τροφίμων υποστηρίζει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τροφιμογενών παθογόνων. Οπότε, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διάφορων ειδών *Campylobacter* και οι χρησιμοποιούμενοι εκκινητές είναι ειδικοί για 16 γονίδια rRNA. Ειδικότερα, για την ανίχνευση του *C. jejuni*, οι εκκινητές μπορεί να είναι ειδικοί για το γονίδιο της ιππουρικάσης (*hipO*), το γονίδιο κυτοχρωμικής C οξειδάσης (*ccoM*), το γονίδιο *hypO*, ή το γονίδιο *proB*. Η ποσοτική PCR προσφέρει ταχύτητα, στιβαρότητα, υψηλή ευαισθησία (μπορεί να ανιχνεύσει τον παθογόνο παράγοντα ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις) και ακρίβεια στην ανάλυση. Αυτή η μέθοδος διακρίνει επιτυχώς το DNA-στόχο από τους άλλους μικροοργανισμούς (100% αποκλειστικότητα), δεν απαιτεί επεξεργασία μετά την διαδικασία της PCR (ετοιμασία γέλης) και είναι ασφαλέστερη αφού δεν απαιτείται η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου. Ωστόσο, βασικό μειονέκτημα της πραγματικού χρόνου PCR, αλλά και της συμβατικής, είναι η αδυναμία διάκρισης ζωντανών έναντι νεκρών κυττάρων, καθώς ποσοτικοποιούν όλα τα νουκλεϊκά οξέα που υπάρχουν και είναι ικανά να υβριδοποιούνται στα ολιγονουκλεοτίδια. Οπότε, δημιουργείται πρόβλημα στην εκτίμηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος έχει προταθεί, ή η χρήση ενός σταδίου ανάπτυξης προ-εμπλουτισμού (pre-enrichment growth stage) για την ανάκτηση των βιώσιμων κυττάρων ή η χρήση φθορίζουσών χρωστικών ουσιών που διεισδύουν και εκμεταλλεύονται τη φυσιολογία των νεκρών κυττάρων. Η χρήση των χρωστικών αυτών είναι ολοένα και πιο δημοφιλής, καθώς μπορούν να διεισδύσουν στα τοιχώματα των νεκρών κυττάρων. Ένα παράδειγμα, είναι η επεξεργασία με μονοαζίδη βρωμιούχου αιθιδίου (EMA) σε συνδυασμό με PCR πραγματικού χρόνου, για την ποσοτικοποίηση βιώσιμων κυττάρων. Η qPCR έχει αναπτυχθεί για την ποσοτικοποίηση βιώσιμων κυττάρων. Το EMA είναι μια παρεμβατική χρωστική ουσία, που δεν μπορεί να διεισδύσει στις κυτταρικές μεμβράνες των βιώσιμων κυττάρων, αλλά δεσμεύεται με DNA λυμένων και νεκρών

κυττάρων. Τα σύμπλοκα DNA-EMA δεν πολυμερίζονται με PCR, επομένως οι αριθμοί κυττάρων βασίζονται σε DNA των βιώσιμων κυττάρων. Άλλοι περιορισμοί είναι η απαίτηση πρότυπης καμπύλης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του DNA-στόχου, η προσεκτική εξαγωγή DNA από πολύπλοκες μήτρες καθώς αυτές ίσως περιέχουν αναστολείς που μπορούν επηρεάσουν τον πολυμερισμό PCR, η απαίτηση πολύ ειδικών εκκινητών και το κόστος που είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τη συμβατική PCR. Άλλη μία εναλλακτική μέθοδος της συμβατικής PCR, είναι η ψηφιακή PCR (digital PCR, dPCR), κατά την οποία το δείγμα αραιώνεται και κατανέμεται σε εκατοντάδες ή ακόμη και εκατομμύρια ξεχωριστούς θαλάμους αντίδρασης (reaction chambers), έτσι ώστε ο καθένας να περιέχει ένα ή κανένα αντίγραφο της αλληλουχίας-στόχου. Ο αριθμός των θετικών αντιδράσεων (ανίχνευση αλληλουχίας) έναντι των αρνητικών αντιδράσεων (μη ανίχνευση), αποκαλύπτει τον ακριβή αριθμό αντιγράφων ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο δείγμα εξέτασης μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, σε αντίθεση με την qPCR που ακολουθεί την ένταση του φθορισμού κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού. Η ψηφιακή PCR χρησιμοποιεί τους ίδιους εκκινητές και ανιχνευτές με την qPCR, προσδίδοντας όμως μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια. Άλλα πλεονεκτήματα είναι, ότι η ποσοτικοποίηση είναι λιγότερο ευάλωτη στους αναστολείς ενζυμικού πολυμερισμού που υπάρχουν στη μήτρα του δείγματος και δεν απαιτεί βαθμονόμηση και εσωτερικούς ελέγχους. Όμως, η ψηφιακή PCR δεν μπορεί να διαφοροποιήσει τα νεκρά από τα ζωντανά κύτταρα και έτσι υπάρχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να αποδώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Μία παραλλαγή της ψηφιακής PCR είναι η ddPCR (droplet digital PCR), όπου τιτλοδοτημένα γαλακτώματα ελαίου, νερού και σταθεροποιητικών χημικών ουσιών, δημιουργούν σταγονίδια. Τα σταγονίδια αυτά μεταφέρονται σε σωληνάρια που μπορούν να τοποθετηθούν σε θερμοκυκλοποιητή για PCR, όπου στην συνέχεια τα σωληνάρια μεταφέρονται σε μηχανήμα ανάγνωσης σταγονιδίων για να αποδειχθεί, εάν έχει συμβεί ή όχι η αντίδραση. Η ddPCR δεν απαιτεί πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του DNA-στόχου και επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό χαμηλού αριθμού μορίων-στόχων (10 CFU/mL), αλλά δεν μπορεί να ποσοτικοποιήσει υψηλές συγκεντρώσεις του *C. jejuni* (συγκεντρώσεις $\geq 10^5$ CFU/ml), πιθανώς επειδή τα σταγονίδια ddPCR έγιναν εντελώς κορεσμένα. Οι εφαρμογές της dPCR και της ddPCR στην ανίχνευση του *Campylobacter* είναι σχετικά περιορισμένη, αλλά η χρήση τους είναι ενδιαφέρουσα για την διασφάλιση της ασφάλειας τροφίμων σε διάφορες βιομηχανίες τροφίμων και ιδιαίτερα σε βιομηχανίες πουλερικών (Baker, 2012, Barakat *et al.*, 2020, Frasao *et al.*, 2017, Jackson *et al.*, 2009, Peruzzy *et al.*, 2020, Ricke *et al.*, 2019). Από την άλλη πλευρά, η ισοθερμική ενίσχυση με την βοήθεια βρόχου (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), είναι άλλη μία μέθοδος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *C. jejuni*. Η δοκιμασία βασίζεται στην αυτόματη κυκλική σύνθεση DNA με μετατόπιση της αλυσίδας από την Bst DNA πολυμεράση υπό ισόθερμες συνθήκες με ένα σύνολο τεσσάρων ή έξι ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών, που υβριδοποιούνται σε έξι ή οκτώ διαφορετικά τμήματα της αλληλουχίας του DNA-στόχου. Το σύνολο των εκκινητών αποτελείται από δύο εξωτερικούς εκκινητές και δύο εσωτερικούς εκκινητές (μπροστινός εσωτερικός εκκινητής FIP και οπίσθιος εσωτερικός

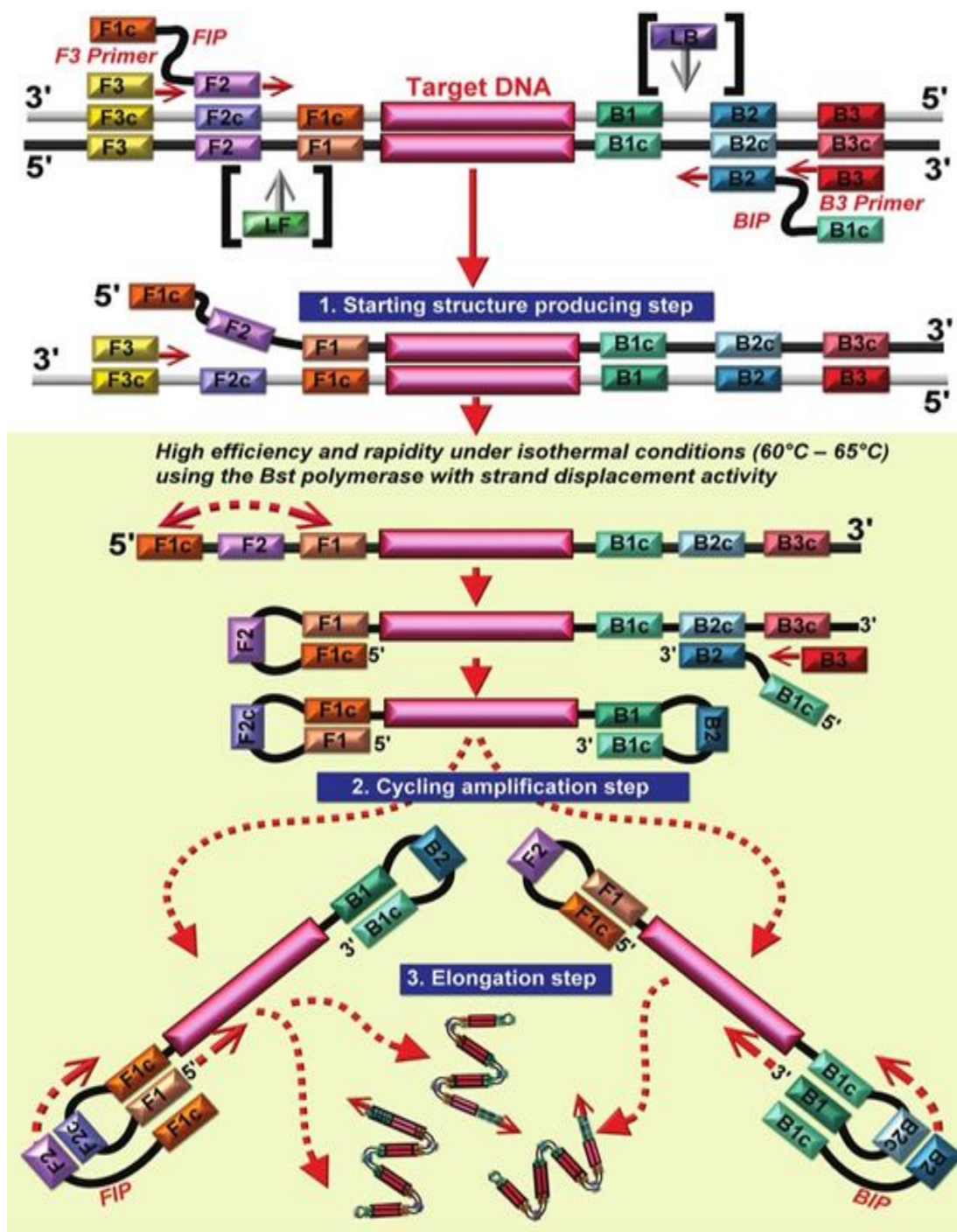
εκκινητής BIP), ενώ ένα τρίτο ζεύγος εκκινητών, που είναι οι εκκινητές βρόχου (μπροστινός εκκινητής βρόχου και οπίσθιος εκκινητής βρόχου), μπορεί να προστεθεί προαιρετικά στην αντίδραση προκειμένου να ενισχυθεί εκθετικά η ποσότητα του DNA που παράγεται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας LAMP. Ο μπροστινός εσωτερικός εκκινητής FIP αποτελείται από μια περιοχή F2 στο 3'-άκρο και μια περιοχή F1c στο 5'-άκρο, ο μπροστινός εξωτερικός εκκινητής (εκκινητής F3) αποτελείται από μια περιοχή F3 που είναι συμπληρωματική προς την περιοχή F3c της πρότυπης αλληλουχίας, ο οπίσθιος εσωτερικός εκκινητής BIP αποτελείται από μια περιοχή B2 στο 3'-άκρο και μια περιοχή B1c στο 5'-άκρο, καθώς και ο οπίσθιος εξωτερικός εκκινητής (εκκινητής B3) αποτελείται από μια περιοχή B3 που είναι συμπληρωματική προς την περιοχή B3c της πρότυπης αλληλουχίας. Η αντίδραση της LAMP περιλαμβάνει μείγμα αντίδρασης που αποτελείται από dNTPs (βάσεις γουανίνης, αδερίνης, θυμίνης και κυτοσίνης), πολυμεράση Bst, εκκινητές και πρότυπο DNA. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί το μεγάλο τμήμα της Bst DNA πολυμεράσης που περιέχει τη δραστικότητα 5'→3' πολυμεράσης, αλλά στερείται δραστικότητας 5'→3' εξωνουκλεάσης. Το μεγάλο θραύσμα της Bst DNA πολυμεράσης μετατοπίζει την τρίτη αλυσίδα DNA, κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού νέου DNA από τον εκκινητή, αφήνοντας ένα νέο μονόκλωνο DNA μήτρας για περαιτέρω υβριδισμό των εκκινητών και πολυμερισμό του DNA. Ειδικότερα, η ενίσχυση αρχίζει όταν η περιοχή F2 του FIP υβριδοποιείται με την περιοχή F2c του DNA-στόχου και ξεκινά η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Ακολουθεί η υβριδοποίηση του εκκινητή F3 με την περιοχή F3c του DNA-στόχου και η επέκταση, μετατοπίζοντας τη συνδεδεμένη με FIP συμπληρωματική αλυσίδα. Αυτή η εκτοπισμένη αλυσίδα σχηματίζει βρόχο στο 5'-τέλος. Αυτό το μονόκλωνο DNA με βρόχο στο 5'-άκρο χρησιμεύει στη συνέχεια ως μήτρα για το BIP. Το B2 υβριδοποιείται στην περιοχή B2c του πρότυπου DNA. Επομένως, ξεκινά η σύνθεση του DNA που οδηγεί στο σχηματισμό μιας συμπληρωματικής αλυσίδας και στο άνοιγμα του βρόχου στο 5'-άκρο. Στη συνέχεια, το B3 υβριδοποιείται στην B3c περιοχή του DNA-στόχου και επεκτείνεται, μετατοπίζοντας τη συνδεδεμένη με το BIP συμπληρωματική αλυσίδα. Αυτό οδηγεί, στον σχηματισμό DNA σε σχήμα αλτήρα. Νουκλεοτίδια προστίθενται στο 3'-άκρο του F1 από την Bst DNA πολυμεράση, που εκτείνεται και ανοίγει τον βρόχο στο 5'-άκρο. Έτσι, το DNA σε σχήμα αλτήρα μετατρέπεται σε δομή σχήματος φουρκέτας (stem-loop structure). Αυτή η δομή χρησιμεύει ως εκκινητής για τους κύκλους ενίσχυσης της LAMP (LAMP cycling), όπου αποτελεί το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης. Τα τελικά προϊόντα που λαμβάνονται είναι ένα μείγμα από DNA σχήματος φουρκέτας, με διάφορα μήκη στελέχους και διάφορες δομές, που έχουν σχήμα σαν κουνουπίδι με πολλαπλούς βρόχους. Η ανίχνευση ενισχυμένου προϊόντος αρχικά πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, όμως λόγω του κινδύνου για διασταυρούμενη μόλυνση, αναπτύχθηκαν μέθοδοι ανίχνευσης της ενίσχυσης DNA εντός σωλήνα (in-tube detection of DNA amplification). Η ανίχνευση εντός σωλήνα του ενισχυμένου προϊόντος, επιτεύχθηκε με άμεση χρώση του δίκλωνου DNA με χρήση φθοριογόνων χρωστικών παρεμβολής. Δεδομένου ότι πολλές από αυτές τις χρωστικές μειώνουν σημαντικά την παραγωγικότητα της Bst DNA πολυμεράσης κατά την διάρκεια της αντίδρασης LAMP, πρέπει να προστίθενται μετά την εκτέλεση της αντίδρασης. Η χρήση ενός ειδικού φθορίζοντος ανιχνευτή

αποτελεί εναλλακτική λύση για την άμεση ανίχνευση εντός του σωλήνα, ενώ η έμμεση ανίχνευση του προϊόντος LAMP εντός του σωλήνα, μπορεί να συμβεί με τη χρήση πυροφωσφορικού άλατος που παράγεται ως ειδικό παραπροϊόν της ενζυμικής σύνθεσης του DNA. Έχουν χρησιμοποιηθεί συμπλοκομετρικές χρωστικές, οι οποίες είναι παρούσες κατά τη διάρκεια της αντίδρασης LAMP και αλλάζουν το χρώμα τους κατά τη μεταφορά ενός δεσμευμένου με τη χρωστική δισθενούς κατιόντος προς σχηματισμό συμπλόκου πυροφωσφορικού άλατος. Δεδομένου ότι, η αλλαγή του χρώματος μιας συμπλοκομετρικής χρωστικής, αποτελεί δείκτη για το σχηματισμό πυροφωσφορικού κατά τη βιοσύνθεση του DNA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έμμεσος δείκτης για θετική αντίδραση LAMP. Η πιο διαδεδομένη χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η καλσεΐνη, που παρουσιάζει έντονο πράσινο φθορισμό και αυτός μπορεί να σβήσει με κατιόντα μαγγανίου. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί συμπλοκομετρικές χρωστικές, που αλλάζουν χρώμα στο ορατό τμήμα του φάσματος. Η ισοθερμική ενίσχυση με την βοήθεια βρόχου, έχει πολλά πλεονεκτήματα και από τα πιο σημαντικά είναι ότι μπορεί να εκτελεστεί υπό σταθερή θερμοκρασία (65°C) σε ένα απλό υδατόλουτρο ή θερμαντικό μπλοκ. Επομένως, εξαλείφεται η ανάγκη για θερμικό έλεγχο και αποφεύγεται η αγορά μεγάλου μέρους ειδικού και ακριβού εργαστηριακού εξοπλισμού, όπως απαιτείται σε άλλες τεχνικές ενίσχυσης. Άλλο ένα πλεονέκτημα της δοκιμασίας LAMP είναι η ταχύτητα της, όπου σε αντίθεση με οποιαδήποτε άλλη τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων πχ. PCR, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε 30 min και έτσι επιτρέπει την άμεση ανίχνευση. Επίσης, η δοκιμασία LAMP δεν επηρεάζεται από την παρουσία μη στοχευμένου DNA (non-target DNA) στα ληφθέντα δείγματα, που αποδεικνύει την υψηλή ειδικότητα της, είναι σταθερή έναντι ορισμένων αναστολέων της PCR, όπως το αίμα και η ανίχνευση του DNA-στόχου μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς το στάδιο της εκχύλισης του προτύπου και με μη επεξεργασμένο δείγμα. Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι, η LAMP είναι μία ταχεία, ειδική και φθηνή μέθοδος. Ωστόσο, η δοκιμασία LAMP δεν είναι τόσο ανθεκτική σε σχέση με την PCR και η χρήση πολλαπλών εκκινητών αυξήσει τις πιθανότητες υβριδοποίησης εκκινητή-εκκινητή, που θα οδηγήσει σε ενίσχυση χωρίς πρότυπο (template-free amplification), δίνοντας έτσι ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ένα άλλο σημαντικό μειονέκτημα είναι, ο υψηλός κίνδυνος μεταφοράς μόλυνσης (carryover contamination) που συχνά οδηγεί σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε αρνητικούς μάρτυρες. Αυτό οφείλεται στην εξαιρετικά υψηλή απόδοση της αντίδρασης LAMP. Το προϊόν της LAMP είναι τόσο σταθερό, που δεν αποικοδομείται εύκολα και έτσι η ακούσια μεταφορά μόλυνση μπορεί να συμβεί (Niessen *et al.*, 2013, Thornval & Hoorfar, 2021, Wong *et al.*, 2018). Τέλος, η ενίσχυση μέσω ρεκομπινάσης-πολυμεράσης (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) είναι μία από τις νεότερες προσεγγίσεις για την ισοθερμική ενίσχυση του DNA. Αυτή εξαρτάται από τρία ένζυμα, μία ρεκομπινάση (T4 UvsX recombinase), μία πρωτεΐνη δέσμευσης μονόκλωνου DNA (single stranded DNA binding protein, SSB) και μία DNA πολυμεράση. Αρχικά, οι ρεκομπινάσες συνδέουν το ζεύγος εκκινητών με συμπληρωματική αλληλουχία στο πρότυπο DNA. Στην συνέχεια, το πρότυπο δίκλωνο ξετυλίγεται με την βοήθεια της SSB και η DNA πολυμεράση, επεκτείνει τους εκκινητές δημιουργώντας μία νέα συμπληρωματική αλυσίδα DNA για κάθε μία από τις δύο αρχικές αλυσίδες

του πρότυπου, οι οποίες διαχωρίστηκαν πλήρως με την δράση της πολυμεράσης. Έτσι, επιτυγχάνεται εκθετική ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου με RPA σε σταθερή θερμοκρασία σε 10 έως 20 min χωρίς μετουσίωση. Ωστόσο, για την απλή και γρήγορη ανίχνευση του τροφιμογενούς βακτηρίου *C. jejuni* έχει αναπτυχθεί και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ένας εναλλακτικός τύπος της RPA, που είναι η πραγματικού χρόνου RPA (real time RPA) με στόχο το γονίδιο *hipO*. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης RPA από φθορίζων έξω-ανιχνευτές (exo-probes). Τα σήματα φθορισμού αυτών των ανιχνευτών μπορούν να παρακολουθούνται σε πραγματικό χρόνο, χρησιμοποιώντας μία συσκευή ανίχνευσης. Έχει αρκετά πλεονεκτήματα όπου μεταξύ άλλων, είναι η μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία της μεθόδου, οι οποίες είναι είτε παρόμοιες, είτε ανώτερες άλλων μεθόδων όπως η PCR. Ειδικότερα, κατά την εκτέλεσή της ενισχύθηκαν μόνο στελέχη *C. jejuni*, ενώ δεν παρατηρήθηκαν θετικά σήματα από παθογόνα μη-στόχους και το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας είναι 10^2 αντίγραφα/αντίδραση. Άλλο σημαντικό πλεονέκτημα είναι η ταχύτητα της αντίδρασης, αφού μπορεί να ολοκληρωθεί εντός 13 min σε αντίθεση με τα 51 min της PCR πραγματικού χρόνου. Ακόμη, επειδή τα αποτελέσματά της λαμβάνονται σε πλατφόρμα ανίχνευσης φθορισμού σε πραγματικό χρόνο, μπορούν να μειωθούν οι πιθανές επιπτώσεις των αναστολέων που σχετίζονται με τη μήτρα. Παρ' όλα αυτά, η χρήση της πραγματικού χρόνου RPA σε εργαστήρια μικροβιολογίας και βιομηχανίες για την ανίχνευση του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου, πρέπει να μελετηθεί και να αξιολογηθεί περαιτέρω, ώστε να υπάρχει σαφής εικόνα των δυνατοτήτων της (Geng *et al.*, 2019).



Εικόνα 9.3.1. Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης μέσω ρεκομπινάσης-πολυμεράσης (Recombinase polymerase amplification, RPA). Πηγή: Φτιάχτηκε από TwistDx Ltd, http://www.twistdx.co.uk/our_technology/.



Inner primers: FIP (consisting of F1c and F2), BIP (consisting of B1c and B2), typically length ~40 bp
 Outer primers: F3, B3, typically length ~20 bp; Loop primers: LF and LB, typically length ~20 bp

Εικόνα 9.3.2. Σχηματική απεικόνιση των βασικών βημάτων της μεθόδου ισοθερμικής ενίσχυσης με την βοήθεια βρόχου (LAMP).

10. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ *C. jejuni* ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Το βακτήριο *C. jejuni* αποικίζει τον εντερικό σωλήνα των πουλερικών και συχνά μολύνει την επιφάνεια ωμού κρέατος πουλερικών κατά την σφαγή και τα στάδια επεξεργασίας. Το υψηλό φορτίο του καμπυλοβακτηρίου στα κρέατα που προκύπτει από τη μόλυνση, αποτελεί πρόκληση για τη βιομηχανία πουλερικών, αφού η ακατάλληλη προετοιμασία ή κατανάλωσή του θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τη καμπυλοβακτηρίωση στον άνθρωπο. Διάφορες ποσοτικές μικροβιολογικές εκτιμήσεις κινδύνου έχουν δείξει ότι, η μερική μείωση του αριθμού του βακτηρίου στα σφάγια κοτόπουλου ($>1 \log_{10}$ /σφάγιο) μπορεί να μειώσει σημαντικά το ποσοστό μόλυνσης στον άνθρωπο και τα μέτρα παρέμβασης για τη μείωση της συγκέντρωσής του αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την μείωση του επιπολασμού των μολυσμένων σφάγιων. Γι' αυτούς τους λόγους, η βιομηχανία τροφίμων διερευνά μεθόδους για μείωση των επιπέδων του *C. jejuni* στα προϊόντα πουλερικών που θα ενισχύουν την ασφάλειά τους και θα διατηρούν τις φυσικές ιδιότητές τους. Αυτές οι μέθοδοι πρέπει να είναι οικονομικά βιώσιμες, αειφόρες, νόμιμες, καθώς και να είναι αποδεκτές από τον καταναλωτή.

10.1. Φυσικές μέθοδοι για τον έλεγχο του βακτηρίου

Έχει διερευνηθεί η χρήση φυσικών τεχνικών απολύμανσης για τον έλεγχο του επιπέδου του καμπυλοβακτηρίου στα προϊόντα πουλερικών και μία τέτοια τεχνική είναι η επεξεργασία των σφάγιων με ζεστό νερό (ζεμάτισμα) ή με ατμό. Η επεξεργασία ζεματίσματος (60°C για 5 min) στο δέρμα των σφάγιων κοτόπουλου, που χρησιμοποιήθηκε από κάποιες μελέτες, σημείωσε μείωση των συγκεντρώσεων *C. jejuni* κατά $2 \log_{10}$ cfu/g χωρίς να σημειωθεί κάποια αλλαγή στο δέρμα των σφάγιων. Από τη άλλη πλευρά, η επεξεργασία με ατμό που εφαρμόστηκε σε κρέας κοτόπουλο, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση των επιπέδων του βακτηρίου. Για παράδειγμα με την εφαρμογή ατμού (90°C για 24 s), προκλήθηκε μείωση κατά $1,3 \log$ cfu/g στα σφάγια κοτόπουλου, ενώ όταν εφαρμόστηκε ατμός (100°C για 8 s), επιτεύχθηκε μείωση του βακτηρίου κατά $5 \log_{10}$ cfu/g σε μπούτια κοτόπουλου. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν αλλαγές στο χρώμα και την υφή του δέρματος μετά την επεξεργασία με ατμό, έτσι αν και αυτή η στρατηγική φαίνεται αποτελεσματική κατά του παθογόνου αυτού, η φυσική βλάβη που προκαλεί πρέπει να ληφθεί υπόψη. Επίσης, η ακτινοβόληση που ανήκει στις φυσικές μεθόδους έχει αποδειχθεί ότι εξαλείφει αποτελεσματικά το *C. jejuni* στο κρέας κοτόπουλου και έχει οριστεί μια τιμή D_{10} (δεκαδική δόση μείωσης) 0,3 kGy για τον οργανισμό, γεγονός που υποδηλώνει ότι μια δόση 2 kGy θα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του βακτηρίου κατά $6 \log_{10}$ στο κρέας κοτόπουλου. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι ακόμη αποδεκτή από τους

περισσότερους καταναλωτές, οπότε δεν χρησιμοποιείται συχνά από την βιομηχανία πουλερικών. Άλλη μία μέθοδος, είναι η ακτινοβολία με υπεριώδη ακτινοβολία, η οποία έχει δείξει μεγάλες δυνατότητες σε επίπεδο βιομηχανίας τροφίμων για την απολύμανση της επιφάνειας τροφίμων. Η τεχνολογία βασίζεται στην εφαρμογή μιας πηγής φωτός με μήκος κύματος (λ) από 200 έως 400 nm περιλαμβάνοντας τρία διαφορετικά μήκη κύματος UV, τα οποία είναι το UV-A (320-400 nm), το UV-B (280-320 nm) και το UV-C (200 έως 280 nm). Από αυτά τα μήκη κύματος, η UV-C έχει θεωρηθεί ως η πιο επιτυχημένη φωτεινή ακτινοβολία για την αδρανοποίηση μικροβίων. Η χρήση του υπεριώδους φωτός για την μείωση του *Campylobacter*, έχει αξιολογηθεί από πολλές μελέτες. Ειδικότερα, ορισμένες μελέτες ανέφεραν μείωση του *C. jejuni* κατά $1,26 \log_{10}$ cfu/g σε φιλέτα κοτόπουλου όταν εφαρμόστηκε σε αυτά δόση ακτινοβολίας UV-C ($\lambda = 254$ nm) 5 kJ/m^2 σε απόσταση 18 cm από την πηγή φωτός, ενώ κάποιοι άλλοι συγγραφείς εφάρμοσαν σε δείγματα στήθους κοτόπουλου με και χωρίς δέρμα, δόση UV-C ($\lambda = 254$ nm) $1,92 \text{ kJ/m}^2$ για 32 s σε απόσταση από την πηγή φωτός 6,5 cm, η οποία οδήγησε σε μείωση των συγκεντρώσεων του βακτηρίου κατά 0,58 και 0,76 \log_{10} cfu/g, αντίστοιχα. Για την μείωση του βακτηρίου έχει χρησιμοποιηθεί και η UV-A ακτινοβολία ($\lambda = 395 \pm 5$ nm). Η ύπαρξη ή όχι του δέρματος επηρεάζει την μείωση των επιπέδων του βακτηρίου, καθώς έχει παρατηρηθεί μικρότερη μείωση του βακτηρίου σε δείγματα κοτόπουλου με δέρμα σε σχέση με αυτά που δεν κατέχουν, ενώ το ακανόνιστο σχήμα κάποιων κομματιών κοτόπουλου μπορεί να εμποδίσει την επαρκή επεξεργασία αυτών, με αποτέλεσμα χαμηλότερα επίπεδα αδρανοποίησης του βακτηρίου. Εκτός από την μείωση επιπέδων του βακτηρίου, αξιολογήθηκε και η επίδραση της UV ακτινοβολίας (UV-C και UV-A) στην ποιότητα του κρέατος κοτόπουλου. Η επεξεργασία UV-C δεν τροποποίησε τις παραμέτρους ποιότητας του κρέατος, όπως το χρώμα και την λιπιδική οξειδωση, ενώ σε δείγματα κοτόπουλου που εφαρμόστηκε έντονη επεξεργασία με UV-A (10 min σε απόσταση 3 cm από την πηγή, παρατηρήθηκε σαφή σκουρότητα. Οπότε, η UV-C ακτινοβολία θα μπορούσε να θεωρηθεί ως επιθυμητή στρατηγική, λόγω των καλών αποτελεσμάτων, της απλότητας και του χαμηλού κόστους, δυνατότητα κλιμάκωσης σε βιομηχανικό επίπεδο και ελάχιστη βλάβη της ποιότητας του τροφίμου. Στην συνέχεια, η φωτοθεραπεία χαμηλού επιπέδου, είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για την εξάλειψη παθογόνων μικροοργανισμών *in vitro*. Ωστόσο, έχει διεξαχθεί μόνο μία έρευνα σχετικά με το εάν το ορατό φως λειτουργεί ως αναστολέας της ανάπτυξης του *C. jejuni in vitro* και σε αυτήν χρησιμοποιήθηκε το μπλε φως χορηγούμενο σε μήκη κύματος 405 και 465 nm. Τα αποτελέσματα της έρευνας κατέδειξαν ότι, τόσο το φως 405 nm, όσο και το φως 465 nm που χορηγήθηκαν σε δόση 24 Jcm^2 αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί αναστολείς του *C. jejuni* και έτσι το μπλε φως αναδείχθηκε ως βακτηριοκτόνος παράγοντας έναντι του οργανισμού. Το πείραμα όμως περιορίστηκε σε ένα *in vitro* μοντέλο, οπότε πρέπει να καθοριστεί εάν η χρήση της τεχνικής αυτής θα είναι αποτελεσματική και σε *in vivo* μοντέλο. Εάν αποδειχθεί σε *in vivo* μοντέλο, τότε το μπλε φως ως απολυμαντικός παράγοντας θα είναι πιθανόν οικονομικά αποδοτικός και δεν θα συμβάλλει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Άλλη μία φυσική μέθοδος, είναι η κατεργασία με υπερήχους (ultrasonication, US) η οποία μπορεί να αυξήσει την διάρκεια ζωής του κρέατος με τη μείωση των μικροβιακών πληθυσμών, χωρίς

να επηρεάζει την ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα στην επεξεργασία με υπερήχους, σε σχέση με τα θετικά και έτσι οι υπέρηχοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μείωση των επιπέδων καμπυλοβακτηρίου στα σφάγια πουλερικών. Διάφορες μελέτες όμως, έχουν δείξει ότι μόνο η εφαρμογή US μειώνει λίγο ή/και καθόλου τα επίπεδα καμπυλοβακτηρίων στα σφάγια, αλλά η αποτελεσματικότητα των υπερήχων μπορεί να ενισχυθεί, όταν συνδυάζεται με άλλες τεχνικές. Συγκεκριμένα, πειραματικά εφαρμόστηκε US με ατμό (90-100°C) στα σφάγια κοτόπουλου και επιτεύχθηκαν μειώσεις 1,0-2,5 log₁₀ cfu/g των επιπέδων καμπυλοβακτηρίου, ενώ οι συνδυασμοί υπερήχων υψηλής έντασης με διάφορες χημικές θεραπείες υπό ήπια θερμότητα είναι πολλά υποσχόμενες τεχνολογίες απολύμανσης, με σημαντικές μειώσεις του *C. jejuni* και των βακτηρίων αλλοίωσης στο δέρμα κοτόπουλου. Χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της επιρροής αυτών των συνδυασμών, στα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των σφάγιων πουλερικών. Το ηλεκτρολυμένο νερό (electrolyzed EO water), μία άλλη φυσική τεχνική απολύμανσης, παράγεται με ηλεκτρόλυση αραιού διαλύματος NaCl σε θάλαμο ηλεκτρόλυσης, όπου τα ηλεκτρόδια ανόδου και καθόδου διαχωρίζονται με μεμβράνη. Στην πλευρά της ανόδου παράγεται όξινο νερό EO, που έχει ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση στα περισσότερα γνωστά παθογόνα βακτήρια, λόγω του χαμηλού pH, του υψηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής (περίπου 1100 mV) και της παρουσίας υποχλωριώδους οξέος. Ως εκ τούτου, αναμένεται το νερό EO να είναι μία αποτελεσματική τεχνική για την μείωση του *C. jejuni* στα σφάγια κοτόπουλου αλλά και για την πρόληψη της διασταυρούμενης μόλυνσης κατά το πλύσιμο των πουλερικών. Πράγματι, με την επεξεργασία του EO νερού, οι πληθυσμοί του βακτηρίου μειώθηκαν κατά 3 log₁₀ cfu/g στο δέρμα κοτόπουλου, αν και σε καθαρές καλλιέργειές του η μείωση του πληθυσμού ήταν μεγαλύτερη. Αυτή η διαφορά οφείλεται στην φύση του δέρματος, καθώς το δέρμα κοτόπουλου έχει αποδειχθεί ότι παρέχει ένα μικροπεριβάλλον για την επιβίωση του *C. jejuni* σε πτυχές και θύλακες. Το νερό EO απέτρεψε όπως φάνηκε, τη διασταυρούμενη μόλυνση των περιβαλλόντων επεξεργασίας, καθώς το βακτήριο δεν επέζησε στο ηλεκτρολυμένο νερό μετά την επεξεργασία πλύσης. Συμπερασματικά, το EO νερό είναι μία ιδανική λύση για την μείωση του βακτηρίου αλλά χρειάζεται να διερευνηθεί το πως επηρεάζει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σφάγιου. Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στα σφαγεία για την μείωση θερμοκρασίας των σφάγιων πουλερικών, άρα και μείωση των επιπέδων καμπυλοβακτηρίου είναι η ψύξη με αέρα ή η εμβάπτιση σε κρύο νερό. Η ψύξη με αέρα πέτυχε μειώσεις του *Campylobacter* 0,44 και 1 log₁₀ cfu/g στα σφάγια κοτόπουλου, όταν εφαρμόστηκε αέρας για 180 και 150 min στους -3 και -1,1°C αντίστοιχα. Η σύγκριση της ψύξης με αέρα και ψύξη με εμβάπτιση έδειξε, ότι και οι δύο μέθοδοι έχουν παρόμοια αποτελεσματικότητα, όσον αφορά την μείωση των επιπέδων *Campylobacter*. Ωστόσο, παρά τις μειώσεις που προκάλεσε η επεξεργασία στα επίπεδα *Campylobacter*, το βακτήριο φαίνεται να επιβιώνει σε σφάγια πουλερικών που διατηρούνται υπό ψύξη. Η κατάψυξη έχει αναγνωρισθεί, ως άλλη μία στρατηγική για την φυσική καταπολέμηση του *C. jejuni* στα σφάγια πουλερικών. Μερικοί ερευνητές με ψυχρή αποθήκευση στους -20 °C για 24 έως 48 h (αργή κατάψυξη) πέτυχαν μείωση του καμπυλοβακτηρίου κατά 1 log₁₀ cfu/g σε σφάγια και κομμάτια δέρματος, αλλά

ανέφεραν ότι η αργή κατάψυξη μπορεί να επηρεάσει τις παραμέτρους ποιότητας του κρέατος πουλερικών, όπως είναι η απώλεια σταγόνων (drip loss), λόγω του σχηματισμού μεγάλων κρυστάλλων. Ακόμη, διερευνήθηκε η εφαρμογή επιφανειακής κατάψυξης (Crust freezing, CF) για τη μείωση των επιπέδων *C. jejuni* σε σφάγια πουλερικών. Οι επεξεργασίες CF είχαν ως αποτέλεσμα μειώσεις του βακτηρίου κατά 0,5-1,5 log₁₀/g, με μείωση του αριθμού του *C. jejuni* σε ωμά κοπανάκια κοτόπουλου (chicken drumsticks) έως και 0,72 log CFU/g την ημέρα της επεξεργασίας. Το χρώμα και η απώλεια σταγόνων του κρέατος κοτόπουλου, δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τις θεραπείες επιφανειακής κατάψυξης. Η τεχνολογία CF μπορεί χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά και με άλλες μεθόδους απολύμανσης, ώστε να ενισχυθεί η δυνατότητα μείωσης του μικροβίου. Ειδικότερα, όταν εφαρμόστηκε επεξεργασία με θερμό νερό (80°C για 20s) ακολουθούμενη από επεξεργασία CF με αέρα σε κοπανάκια κοτόπουλου, επιτεύχθηκε μείωση του καμπυλοβακτηρίου κατά 2,91 log₁₀ cfu/cm², χωρίς να επηρεάσει το χρώμα τους. Συνοψίζοντας, η τεχνολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της ή συνεργιστικά με άλλες μεθόδους, για τη βελτίωση της μικροβιολογικής ασφάλειας του ωμού κοτόπουλου χωρίς επιπτώσεις στα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Ganan *et al.*, 2012, Garcia-Sanchez *et al.*, 2018, Haughton *et al.*, 2012, Kassem *et al.*, 2018, Meurer *et al.*, 2020, Park *et al.*, 2002, Soro *et al.*, 2020).

10.2. Αντιμικροβιακές ουσίες, επικαλύψεις τροφίμων και συσκευασίες για τον έλεγχο του βακτηρίου

Η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών έχει διερευνηθεί και μπορεί να αποτελέσει μία αποτελεσματική στρατηγική για τον έλεγχο *C. jejuni* στα σφάγια πουλερικών. Η χημική απολύμανση περιλαμβάνει τη χρήση διαφόρων χημικών ουσιών, για το ξέπλυμα των σφάγιων πουλερικών προκειμένου να μειωθεί το μικροβιακό φορτίο. Το υπεροξικό οξύ χρησιμοποιείται συχνά, για την απολύμανση των σφαγίων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και οδηγεί σε μειώσεις του βακτηρίου στα σφάγια περίπου κατά 1,5 log₁₀ cfu/g, αλλά συνδυαστικά με άλλες μεθόδους, μπορεί να μειώσει περισσότερο τα επίπεδα του βακτηρίου. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις (>0,1%), μπορεί να προκαλέσει ενοχλήσεις στους εργαζόμενους που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε επαγγελματικούς κινδύνους. Το χλώριο έχει περιορισμένη αποτελεσματικότητα στην μείωση των επιπέδων του βακτηρίου, η οποία μειώνεται περαιτέρω παρουσία οργανικής ύλης και pH άνω του 7,0. Η δημιουργία ενδεχομένων μεταλλαξιογόνων ουσιών από την αντίδραση του χλωρίου με τα οργανικά υλικά, δημιουργεί περαιτέρω ανησυχίες λόγω των σχετικών κινδύνων για την υγεία. Το φωσφορικό τρινάτριο (trisodium phosphate, TSP) είναι μία ουσία εξαιρετικά αλκαλική, που έχει χαρακτηριστεί "γενικά αναγνωρισμένη ως ασφαλής" (GRAS) από τον USDA για χρήση με ψεκασμό ή εμβάπτιση των σφάγιων πουλερικών σε συγκεντρώσεις 8-12%. Το TSP είναι πιο δραστικό σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια σε σχέση με

τα θετικά και για αυτό χρησιμοποιείται για την μείωση των επιπέδων *C. jejuni*, αλλά η βακτηριοκτόνος δράση του περιορίζεται στα 1-2,2 log₁₀ και ειδικότερα όταν σφάγιο κοτόπουλου εμβαιπίστηκε σε 10% TSP για 15 s, παρουσιάστηκε μία μέση μείωση 1,63 log₁₀. Η επεξεργασία με TSP μπορεί να προκαλέσει μικρό αποχρωματισμό στα σφάγια και να αφήσει κατάλοιπα στο κρέας σφάγιου. Η επεξεργασία με τις χημικές ουσίες, μονολαυρική γλυκερίνη (0,01%), χλωρικό νάτριο (100 mM) και το βενζοϊκό νάτριο (0,1%) είχε ελάχιστη βακτηριοκτόνο δράση (< 0,5 log₁₀ cfu/ml), όταν οι ουσίες εφαρμόστηκαν σε εναιώρημα που περιείχε πλήθος *C. jejuni* για 20 λεπτά στους 4°C, οπότε θα είχαν μηδαμινή δράση εναντίων του *C. jejuni* που βρίσκεται σε σφάγια πουλερικών. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε 0,1% ή 0,2% είχε σημαντική αλλά ελάχιστη επίδραση στην αδρανοποίηση του *C. jejuni* σε εναιώρημα (1 και 3 log₁₀ cfu/g, αντίστοιχα) και εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση, οπότε αυτή θα είχε πολύ μικρή βακτηριοκτόνο δράση εάν εφαρμοζόταν σε σφάγια πουλερικών. Μία μελέτη έδειξε ότι, το ανθρακικό νάτριο (100 mM) και το υδροξειδίο του νατρίου (0,1 N), ήταν ιδιαίτερα βακτηριοκτόνες ουσίες για το *C. jejuni* (με μείωση >6 log₁₀ cfu/ml εντός 1 λεπτού) σε εναιώρημα στους 4°C. Η επεξεργασία με το ανθρακικό νάτριο, όταν εφαρμόστηκε για 15, 30 και 45 s μείωσε το φορτίο του καμπυλοβακτηρίου κατά 1.5, 1.6, και 1.6 log₁₀ cfu/g στις εμβολιασμένες με το βακτήριο φτερούγες κοτόπουλου, αντίστοιχα και η επεξεργασία με το υδροξειδίο του νατρίου, όταν εφαρμόστηκε για 15 και 30 s, μείωσε το φορτίο κατά 3.6 και 3.7 log₁₀ cfu/g στις φτερούγες αυτές, αντίστοιχα. Τα μίγματα με διαφορετικές αντιμικροβιακές ουσίες, όπως είναι το μίγμα με 0,1% (w/v) όξινο χλωριούχο νάτριο (ASC) και 10% (w/v) φωσφορικό τρινάτριο, καθώς και το Safe₂O-Poultry Wash περιλαμβάνοντας όξινο θειικό ασβέστιο, γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, θειικό δωδεκυλικό νάτριο και πολυπροπυλενογλυκόλη (polypropylene glycol), παρουσίασαν σημαντική βακτηριοκτόνο δράση έναντι του *C. jejuni* στα πουλερικά, λόγω των μειώσεων έως και 5 log₁₀ cfu/g των επιπέδων του βακτηρίου αυτού. Ακόμη, το χλωριώδες όξινο νερό (CAW, Chlorous Acid Water) είναι μία νέα απολυμαντική ουσία, που έχει εγκριθεί ως πρόσθετο τροφίμων για την επεξεργασία προϊόντων πουλερικών σε διάφορες χώρες. Αυτό είναι ένα διάλυμα με βάση το χλώριο που περιέχει υψηλή συγκέντρωση υποχλωριώδους οξέος (HOCl). Μεταξύ των μορφών χλωρίου, το HOCl αναγνωρίζεται ως η πιο αποτελεσματική απολυμαντική μορφή, επειδή έχει χαμηλό μοριακό βάρος που μπορεί εύκολα να διαπεράσει τα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα. Το CAW έχει ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση κατά του *C. jejuni*, αφού με συγκέντρωση 200-400 ppm, επιτεύχθηκε μείωση κατά 2-3 log₁₀ cfu/g σε σφάγια κοτόπουλων με κατεργασία εμβάπτισης. Το CAW δεν επηρεάζεται από την οργανική ύλη και παρουσιάζει αξιοσημείωτη χαμηλή τοξικότητα, όταν εφαρμόζεται στις συνιστώμενες δόσεις (<400 ppm), αφού τα υπολείμματα του χλωριώδους οξέος αποσυντίθενται ή αφαιρούνται πριν την ολοκλήρωση των τελικών προϊόντων τροφίμων. Η επεξεργασία με οργανικά οξέα, που είναι γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς ουσίες, θα μπορούσε να είναι μία χρήσιμη προσέγγιση για την μείωση των επιπέδων *C. jejuni* από το κρέας κοτόπουλου και γενικά από τα σφάγια πουλερικών. Η επεξεργασία με οξικό οξύ 1% και 3% για 10 λεπτά μείωσε τα επίπεδα του βακτηρίου κατά 0,78 και 1,27 log₁₀ στο κοτόπουλο αντίστοιχα, ενώ η πλύση (washing) στα μπούτια κοτόπουλου (chicken legs)

με 1% και 2% οξικό οξύ για 5 λεπτά, παρουσίασε μείωση του βακτηρίου κατά 0,80 και 1,34 \log_{10} , αντίστοιχα, μετά την επεξεργασία. Η ικανότητα του γαλακτικού οξέος να αναστέλλει το βακτήριο, έχει μελετηθεί σε εργαστηριακά μέσα και σε σφάγια πουλερικών. Το γαλακτικό οξύ σε συγκέντρωση 1% και 3% προκάλεσε μείωση του καμπυλοβακτηρίου κατά 0,36 και 1,06 \log_{10} , αντίστοιχα σε κρέας κοτόπουλου. Η πλύση με γαλακτικό οξύ συγκέντρωσης 1% και 2% στα μπούτια κοτόπουλου, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση του φορτίου *Campylobacter* (μείωση κατά 1,1 και 1,42 \log_{10} , αντίστοιχα, αμέσως μετά την επεξεργασία), ενώ η επεξεργασία 10% γαλακτικού οξέος ρυθμισμένο με γαλακτικό νάτριο, σημείωσε μείωση 1,8 \log_{10} στα μπούτια κοτόπουλου. Η αναστολή που προκαλεί το γαλακτικό οξύ στο βακτήριο, φαίνεται να είναι υψηλότερη στα εργαστηριακά μέσα από ό,τι στο κρέας κοτόπουλου και αυτό οφείλεται στην ρυθμιστική ικανότητα του κρέατος. Έχει αξιολογηθεί η αποτελεσματική δράση και του κιτρικού οξέος τόσο *in vitro*, όσο και σε σφάγια πουλερικών. Η εμφάνιση των σφάγιων κοτόπουλου σε 5% κιτρικό οξύ για 15 s, μείωσε τα επίπεδα καμπυλοβακτηρίου κατά 1,44 \log_{10} cfu/cm² μετά την επεξεργασία, αλλά μετά από 5 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C δεν βρέθηκαν αλλαγές στα επίπεδα καμπυλοβακτηρίου σε δείγματα χωρίς επεξεργασία και σε εκείνα με επεξεργασία 5% κιτρικό οξύ. Όταν μπούτια κοτόπουλου εμβάπτιστηκαν σε 2% κιτρικό οξύ, ο πληθυσμός μειώθηκε κατά 2.66 \log_{10} cfu/g σε σχέση με τα μη επεξεργασμένα δείγματα μετά την επεξεργασία. Το κιτρικό οξύ είναι αποτελεσματικό απέναντι στο *C. jejuni* μετά από την επεξεργασία αλλά η αποτελεσματικότητά του μειώνεται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Η αποτελεσματικότητα αυτού του οξέος *in vitro*, είναι μεγαλύτερη από το οξικό ή γαλακτικό οξύ. Το φουμαρικό οξύ σε συγκεντρώσεις 1% και 2% είχε μικρή αποτελεσματικότητα, καθώς στα μπούτια κοτόπουλου μείωσε τον αριθμό του βακτηρίου κατά 0,22-0,89 και 0,63-1,08 \log_{10} σε πλήρη αποθήκευση, αντίστοιχα. Η αποτελεσματικότητα του προπιονικού οξέος έναντι του *C. jejuni*, έχει μελετηθεί κυρίως *in vitro*, αλλά έχουν διεξαχθεί λίγες μελέτες σχετικά με το πώς επιδρά το προπιονικό οξύ κατά του συγκεκριμένου βακτηρίου στο κοτόπουλο. Ο εμβάπτισμός των μπουτιών κοτόπουλου σε διάλυμα 2% προπιονικού οξέος, πέτυχε μείωση του καμπυλοβακτηρίου κατά 1,62 μονάδες \log_{10} μετά την επεξεργασία και μετά από 8 μέρες αποθήκευσης στους 4°C, ο πληθυσμός του βακτηρίου στα μπούτια, που είχαν υποστεί επεξεργασία 2% προπιονικό οξύ, ήταν μικρότερος κατά 1,71 μονάδες \log_{10} από τα μη επεξεργασμένα δείγματα. Το προπιονικό οξύ 2% είναι πιο αποτελεσματικό στην απολύμανση των σφάγιων πουλερικών από το καμπυλοβακτήριο, σε σχέση με το οξικό και γαλακτικό οξύ ίδιας συγκέντρωσης. Η οργανοληπτική ποιότητα του κοτόπουλου, δεν επηρεάστηκε αρνητικά από προπιονικό οξύ. Ωστόσο, ορισμένα οξέα όπως το οξικό και γαλακτικό οξύ ίσως να μην είναι κατάλληλα για τον έλεγχο του *C. jejuni*, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας από αυτό το βακτήριο. Οι παραπάνω ουσίες που χρησιμοποιούνται ως χημικά απολυμαντικά στα σφάγια πουλερικών, αν και είναι αρκετά αποτελεσματικές στη μείωση των επιπέδων αυτού του παθογόνου, δεν έχει επιτραπεί μέχρι στιγμής η χρήση τους στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Αυτό συμβαίνει καθώς υπάρχουν ανησυχίες για υπολείμματα και αποχρωματισμό του κρέατος πουλερικών και περιορισμένη αποδοχή από τους καταναλωτές (Gonzales-Fandos *et al.*, 2020, Gonzales-Fandos, Maya *et al.*, 2020,

Gonzales-Fandos *et al.*, 2015, Soro *et al.*, 2020, Vetchapitak *et al.*, 2021, Wagle *et al.*, 2019, Zhao & Doyle, 2006). Η αξιοποίηση των αιθέριων ελαίων (Essential Oils, EOs), αποτελεί μία εναλλακτική στρατηγική ώστε να παρεμποδιστεί ή να ελεγχθεί η ανάπτυξη των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένου του *C. jejuni*. Τα αιθέρια έλαια έχουν κατηγοριοποιηθεί ως (GRAS) από την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων στον Κώδικα Ομοσπονδιακών Κανονισμών (CFR) ως φυσικά πρόσθετα και είναι πηγή φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών όπως φαινολικές, τερπενοειδείς και αλειφατικές ενώσεις. Αποτελέσματα *in vitro* μελέτης έδειξαν ότι, τα αιθέρια έλαια κύμινου, κάρδαμου και άνηθου ήταν αποτελεσματικοί αναστολείς του *C. jejuni*, καθώς κατέστρεψαν την ακεραιότητα της μεμβράνης του, προκαλώντας έτσι τον θάνατο των κυττάρων. Τα ΕΟ από κάρδαμο και άνηθο είχαν υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση έναντι στο συγκεκριμένο βακτήριο σε σχέση με το ΕΟ κύμινου. Ωστόσο, είναι απαραίτητες οι *in vivo* μελέτες για αν επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της *in vitro* μελέτης και απαιτούνται μελέτες για την εξισορρόπηση μεταξύ της αισθητηριακής αποδοχής και της αντιμικροβιακής δράσης. Η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων θυμαριού και κόλιανδρου σε συγκεντρώσεις 1% και 2% αξιολογήθηκε για τον έλεγχο του καμπυλοβακτηρίου σε ενοφθαλμισμένο με το βακτήριο κιμά από στήθος κοτόπουλου. Τα δύο αυτά αιθέρια έλαια έδωσαν αρκετά καλά αποτελέσματα στην μείωση του βακτηρίου, αφού το ΕΟ του θυμαριού σε συγκεντρώσεις 1% και 2%, μείωσε το φορτίο του καμπυλοβακτηρίου κατά 2 και 4 \log_{10} cfu/g στον κιμά την 6^η ημέρα αποθήκευσης, αντίστοιχα (από αρχικό φορτίο $3,8 \times 10^7$ σε $7,3 \times 10^5$ και $2,5 \times 10^3$), ενώ το ΕΟ κόλιανδρου 1% και 2%, μείωσε το βακτήριο κατά 1 και 2 \log_{10} cfu/g την 6^η ημέρα αποθήκευσης, αντίστοιχα (από αρχικό φορτίο $3,8 \times 10^7$ σε $3,8 \times 10^6$ και $9,5 \times 10^5$). Όμως, το αιθέριο έλαιο θυμαριού, αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικό σε σχέση με το ΕΟ κόλιανδρου στην καταστολή της ανάπτυξης του *C. jejuni* σε κιμά κοτόπουλου και ο κιμάς που επεξεργάστηκε με ΕΟ θυμαριού είχε καλύτερη ποιοτική αποδοχή. Είναι απαραίτητο να αξιολογηθούν και σε κρέας κοτόπουλου φυσικά μολυσμένο με το βακτήριο, ώστε να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα. Το βασικό συστατικό του αιθέριου ελαίου ρίγανης, είναι η καρβακρόλη της οποίας η αποτελεσματικότητα έχει διερευνηθεί για την μείωση του *C. jejuni* σε δέρμα κοτόπουλου. Η επεξεργασία πλύσης με 2% καρβακρόλη του δέρματος κοτόπουλου, πέτυχε μείωση του βακτηρίου περίπου 2,4 \log_{10} cfu/δείγμα σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις τιμές χρώματος, ούτε στις 0, ούτε στις 24 ώρες μετά το πλύσιμο με εναιώρημα CR (Καρβακρόλη, Carvacrol) 2%. Οπότε, η πλύση με εναιώρημα 2% καρβακρόλης έχει σημαντική ανασταλτική δράση έναντι στο καμπυλοβακτήριο, χωρίς αλλαγή του χρώματος του δέρματος του κοτόπουλου, αλλά θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω έρευνες για τη δοκιμή των αποτελεσμάτων της καρβακρόλης σε βιομηχανικό περιβάλλον πριν από την εφαρμογή της κατεργασίας σε μονάδα επεξεργασίας πουλερικών (Mutlu-Ingok & Karbancioglu-Guler, 2017, Salem *et al.*, 2019, Shrestha *et al.*, 2019). Το β-ρεσορκυλικό οξύ (BR, 2,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ) είναι μία φυτοφαινολική ένωση με σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες σε σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια. Οι Wagle *et al.* (2017), διερεύνησαν της επίδραση της επεξεργασίας πλύσης BR στην επιβίωση του *C. jejuni* στο δέρμα και το κρέας

κοτόπουλου. Ειδικότερα, η εμφάνιση του δέρματος και στήθους κοτόπουλου σε 2% β-ρεσορκυλικό οξύ για 30 s, μείωσε τον πληθυσμό του καμπυλοβακτηρίου κατά περίπου 2 και 3 \log_{10} cfu/g, αντίστοιχα και η οπτική ελκυστικότητα των δειγμάτων δεν επηρεάστηκε από την επεξεργασία με BR. Οπότε, το BR θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του καμπυλοβακτηρίου στα προϊόντα πουλερικών (Wagle *et al.*, 2017). Μία άλλη στρατηγική για την μείωση των επιπέδων του καμπυλοβακτηρίου, είναι η χρήση νανοσωματιδίων οξειδίου του ψευδαργύρου (NPs ZnO). Αυτά έχουν αναγνωριστεί ως αποτελεσματικά αντιμικροβιακά υλικά, των οποίων το μέγεθος και το σχήμα επηρεάζει σημαντικά την αντιμικροβιακή δράση και έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS πρόσθετα τροφίμων από το USFDA. Η μεμονωμένη επεξεργασία με χαμηλές συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων ZnO σε καθαρές καλλιέργειες του *C. jejuni*, προκάλεσε μόνο βακτηριοστατική δράση. Η συνδυαστική επεξεργασία των NPs ZnO με καρβακρόλη σε αυτές τις καλλιέργειες, οδήγησε σε βακτηριοκτόνο δράση που ενίσχυσε σημαντικά την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα. Η συνεργιστική θεραπεία 18 $\mu\text{g/ml}$ καρβακρόλης με 12,5 $\mu\text{g/ml}$ νανοσωματιδίων ZnO, μείωσε τον πληθυσμό του βακτηρίου κατά περίπου 1,44 \log_{10} cfu/ml στην καθαρή καλλιέργεια μετά από 8 ώρες. Η αύξηση της συγκέντρωσης της καρβακρόλης σε 20,25 $\mu\text{g/ml}$ στην συνδυαστική θεραπεία, τα κύτταρα στην καθαρή καλλιέργεια, μειώθηκαν κατά περίπου 2,25 \log_{10} cfu/ml μετά από 8 ώρες και μετά από 24 ώρες προκλήθηκε μείωση των κυττάρων κατά πάνω από 6 \log_{10} cfu/ml. Οπότε, η επεξεργασία με 20,25 $\mu\text{g/ml}$ καρβακρόλη και 12,5 $\mu\text{g/ml}$ νανοσωματιδίων ZnO είναι μία δυνητική στρατηγική μείωσης του καμπυλοβακτηρίου *in vitro* (Windiasti *et al.*, 2019). Ωστόσο, η εφαρμογή των νανοσωματιδίων οξειδίων μετάλλων άρα και των ZnO NPs βρίσκεται ακόμη στα αρχικά της στάδια λόγω των γενικών ανησυχιών για το πως επηρεάζουν την υγεία, όταν βρίσκονται στα αγροδιατροφικά προϊόντα εκ μέρους διαφόρων ενδιαφερομένων, όπως οι καταναλωτές, οι ρυθμιστικές αρχές και η βιομηχανία τροφίμων. Τα NPs ZnO μπορούν να ενσωματωθούν σε υλικά συσκευασίας, ώστε να αναπτυχθεί μία νέα τεχνική ενεργούς συσκευασίας που θα μπορεί να αδρανοποιήσει τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια. Οι Hakeem *et al.* (2020), διερεύνησαν την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα ενός καινοτόμου λειτουργικού απορροφητικού δισδιάστατου επιθέματος με ακινητοποιημένα NPs ZnO (καινοτόμος αντιμικροβιακή συσκευασία), για τον έλεγχο του *C. jejuni* σε ωμό κρέας κοτόπουλου. Τα ακινητοποιημένα νανοσωματίδια ZnO συγκέντρωσης 0,856 mg/cm^2 στα απορροφητικά επιθέματα προκάλεσαν ελάττωση των επιπέδων του συγκεκριμένου βακτηρίου κατά 4 \log_{10} στο ωμό κρέας κοτόπουλου μετά από 3 ημέρες επεξεργασίας στους 4°C. Η μετανάστευση των νανοσωματιδίων αυτών από το επίθεμα στο κρέας ωμού κοτόπουλου δεν ανιχνεύθηκε. Αυτή η νέα προσέγγιση ελάττωσης του βακτηρίου, έχει μεγάλες δυνατότητες και μπορεί να εφαρμοστεί στη βιομηχανία πουλερικών για τη βελτίωση της ασφάλειας των προϊόντων ωμού κρέατος κοτόπουλου. Η συσκευασία με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP, Modified Atmosphere Packaging), έχει εξεταστεί όσον αφορά την αποτελεσματικότητά της, στην μείωση των επιπέδων καμπυλοβακτηρίου στο κρέας κοτόπουλου με τη χρήση βέλτιστων μειγμάτων αερίων. Από μια μελέτη που διεξήχθη, η εφαρμογή MAP 70%:30% O₂:CO₂, μείωσε την συγκέντρωση του καμπυλοβακτηρίου κατά 2-2,6 \log_{10} cfu/g κατά

τη αποθήκευση του κρέατος κοτόπουλου στους 4-5°C για 8 ημέρες. Ο συνδυασμός MAP με αντιμικροβιακές ουσίες μπορεί να ενισχύσει τη μείωση, καθώς η επεξεργασία με 2% γαλακτικό οξύ πριν την συσκευασία με MAP είναι αποτελεσματική στη μείωση του αρχικού *C. jejuni* (Gonzalez-Fandos *et al.*, 2020, Soro *et al.*, 2020). Η αντιμικροβιακή επικάλυψη στα προϊόντα πουλερικών, είναι μία νέα και βιώσιμη παρέμβαση για τη μείωση ή την εξάλειψη των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα των επικαλύψεων αυτών σε τεμάχια πουλερικών για τη μείωση του *Campylobacter*. Η ενσωμάτωση αντιμικροβιακών ουσιών στις επικαλύψεις ενισχύει την αντιμικροβιακή δράση. Σε μία από τις μελέτες, διερευνήθηκε η αποτελεσματική δράση της επικάλυψης πηκτίνης και χιτοζάνης, εμπλουτισμένη με ευγενόλη (δραστικό συστατικό ΕΟ γαρύφαλλου) στη μείωση του *C. jejuni* σε φτερούγες κοτόπουλου, όπου και οι τρεις αυτές ουσίες είναι αναγνωρισμένες ως GRAS από το USFDA. Η ενσωμάτωση 2% ευγενόλης σε επικάλυψη με 2% χιτοζάνη, βελτίωσε την αποτελεσματικότητα της επικάλυψης, η οποία μείωσε το *C. jejuni* κατά περίπου 3 log₁₀ cfu/δείγμα φτερούγων κοτόπουλου στο τέλος των 7 ημερών αποθήκευσης, ενώ όταν ενσωματώθηκε 2% ευγενόλης σε επικάλυψη με 3% πηκτίνη, η επικάλυψη με βελτιωμένη αποτελεσματικότητα, μείωσε το βακτήριο κατά περίπου 2 log cfu/δείγμα φτερούγων κοτόπουλου σε 7 ημέρες αποθήκευσης. Η επεξεργασία των φτερούγων με επικάλυψη χιτοζάνης ή πηκτίνης εμπλουτισμένη με ευγενόλη, δεν επηρέασε το χρώμα τους. Αποτελέσματα άλλης μελέτης έδειξαν ότι, η προσθήκη 1% καρβακρόλης σε επικάλυψη με 10% αραβικό κόμμι (αναγνωρισμένο ως GRAS), αύξησε την αποτελεσματικότητά της και η επικάλυψη αυτή μείωσε τα επίπεδα καμπυλοβακτηρίου κατά 1-2 log₁₀ cfu/ δείγμα φτερούγων κοτόπουλου την 7 ημέρα αποθήκευσης, χωρίς να επηρεαστούν οι τιμές χρώματος των δειγμάτων. Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι, οι επικαλύψεις διάφορων υλικών εμπλουτισμένες με αντιμικροβιακές ουσίες, μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικές στρατηγικές για τον έλεγχο του καμπυλοβακτηρίου, χωρίς να επηρεάζεται η εμφάνιση (χρώμα) του σφάγιου πουλερικών (Shrestha, Upadhyaya *et al.*, 2019, Wagle *et al.*, 2019).

10.3. Καινοτόμες τεχνολογίες για τον έλεγχο του βακτηρίου

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μία σειρά από καινοτόμες τεχνολογίες για την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών που μεταδίδονται από τρόφιμα συμπεριλαμβανομένου και του *C. jejuni*, χωρίς να επηρεάζονται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Σε αυτές τις τεχνολογίες, ανήκει η επεξεργασία υψηλής πίεσης (high pressure processing, HPP), μία μη θερμική τεχνολογία παστερίωσης η οποία χρησιμοποιεί υπερύψηλη πίεση νερού για την καταστροφή των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Η τεχνολογία αυτή δεν επηρεάζεται από το μέγεθος και τη γεωμετρία του δείγματος και μπορεί να εφαρμοστεί με καλή διατήρηση των ποιοτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος ή μέτριες θερμοκρασίες. Η

αποτελεσματικότητα της HPP για την αδρανοποίηση του καμπυλοβακτηρίου σε κρέας πουλερικών, έχει αξιολογηθεί από μερικές μελέτες. Η εφαρμογή υψηλής υδροστατικής πίεσης 300 MPa για 5 min προκάλεσε ελάττωση των επιπέδων *C. jejuni* κατά $4.17 \log_{10}$ cfu/g σε κρέας πουλερικών, ενώ όταν εφαρμόστηκε πίεση 300 MPa για 8,7 min ή 400 MPa για 4,38 min, προκλήθηκε μείωση του βακτηρίου κατά $6 \log_{10}$ cfu/g σε κρέας πουλερικών. Γίνεται κατανοητό ότι, το καμπυλοβακτήριο είναι ευαίσθητο σε υψηλές υδροστατικές πιέσεις και έτσι και η επεξεργασία υψηλής πίεσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματική τεχνική διασφάλισης της ασφάλειας του κρέατος πουλερικών (Jackowska-Tracz & Tracz, 2015). Επίσης, η τεχνολογία των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF), παράγει πεδία μικρής διάρκειας υψηλής τάσης, που μπορούν να εφαρμοστούν σε επιφάνειες τροφίμων τοποθετώντας δύο ηλεκτρόδια μεταξύ των τροφίμων. Η επεξεργασία με PEF για μικρή διάρκεια (<1 s), έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τους πληθυσμούς των βακτηρίων, διατηρώντας παράλληλα την ποιότητα των τροφίμων. Η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας PEF έναντι του *C. jejuni* στο ωμό κρέας πουλερικών, έχει αξιολογηθεί και αποδείχθηκε ότι, η εφαρμογή μόνο της επεξεργασίας PEF (στα 0,25-1 kV/cm), δεν ήταν ικανή να αδρανοποιήσει το καμπυλοβακτήριο σε κρέας πουλερικών. Ωστόσο, η εφαρμογή επεξεργασίας PEF (1 kV/cm, 50 παλμούς των 20 μ s και 1 Hz) σε εμβολιασμένα με το βακτήριο μπούτια κοτόπουλου και επακόλουθη επεξεργασία εμβάπτισης αυτών για 20 min σε 15,63 ppm EO ρίγανης, πέτυχε μείωση του καμπυλοβακτηρίου κατά 1,7 έως 1,9 \log_{10} cfu/g. Οπότε, η χρήση της αυτής της τεχνολογίας με διαδοχική επεξεργασία εμβάπτισης σε EO ρίγανης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε επιχειρήσεις επεξεργασίας πουλερικών ως μέτρο μετριασμού του κινδύνου για τον έλεγχο των επιπέδων του βακτηρίου στα σφάγια (Clemente *et al.*, 2020). Η επεξεργασία HILP (high-intensity light pulses), βασίζεται στην εφαρμογή παλμών φωτός μικρής διάρκειας, υψηλής έντασης στις επιφάνειες των τροφίμων. Ο τρόπος δράσης αυτής της τεχνολογίας συνδέεται με φωτοθερμικές, φωτοχημικές και φυσικές ενέργειες. Η ικανότητα της επεξεργασίας HILP να αδρανοποιήσει το *Campylobacter*, έχει μελετηθεί ελάχιστα μέχρι και σήμερα. Με την χρήση της τεχνολογίας αυτής σε μία μελέτη, μειώθηκαν τα επίπεδα καμπυλοβακτηρίου κατά 0,89 και 0,91 \log_{10} cfu/g σε συσκευασμένα φιλέτα στήθους κοτόπουλου με και χωρίς δέρμα, αντίστοιχα. Ωστόσο, η τεχνολογία αυτή επηρέασε το χρώμα του κρέατος κοτόπουλου, αφού παρατηρήθηκε σκούρο χρώμα στο κρέας, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών επεξεργασίας, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι αλλαγές που επηρεάζουν την ποιότητα (Soro *et al.*, 2020). Στην συνέχεια, το μη θερμικό πλάσμα είναι ένα ιονισμένο αέριο, μια ενεργειακή κατάσταση της ύλης γνωστή και ως "τέταρτη κατάσταση της ύλης" και αποτελείται από ένα μείγμα ηλεκτρονίων και ιόντων σε κατάσταση μη θερμοδυναμικής ισορροπίας. Τα μη θερμικά πλάσματα, έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να αδρανοποιούν τα παθογόνα βακτήρια στην επιφάνεια των τροφίμων και κάποιοι τύποι του μη θερμικού πλάσματος έχουν ερευνηθεί για την ικανότητά τους να μειώνουν τον πληθυσμό του *C. jejuni* στην επιφάνεια του κρέατος πουλερικών. Η εφαρμογή της επεξεργασίας μη θερμικού πλάσματος εκκένωσης διηλεκτρικού φραγμού (Nonthermal Dielectric Barrier Discharge Plasma, DBD plasma) 30 kV, 0,5 kHz για 3 min σε απόσταση 1 έως 2 mm, προκάλεσε ελάττωση των επιπέδων καμπυλοβακτηρίου κατά

2,45 και 3,11 log₁₀ cfu/g σε στήθος χωρίς δέρμα και σε δέρμα μηρού κοτόπουλου, αντίστοιχα. Αυτές οι μειώσεις παρατηρήθηκαν, όταν τα ωμά δείγματα κοτόπουλου εμβολιάστηκαν με 10⁴ cfu του συγκεκριμένου βακτηρίου. Δεν παρατηρήθηκαν ορατές αλλαγές στο χρώμα του στήθους κοτόπουλου ή στην επιφάνεια του δέρματος μηρού κοτόπουλου μετά την εφαρμογή του DBD πλάσματος ακόμη και στη μέγιστη χρονική περίοδο των 3 min. Ωστόσο, χρειάζονται μελέτες για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα του DBD πλάσματος στη μείωση του *C. jejuni* σε φυσικά μολυσμένο κρέας πουλερικών, αλλά και περαιτέρω μελέτες για την επίδραση της τεχνολογίας αυτής στα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος. Η χρήση μη θερμικού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης ραδιοσυχνότητων (radio-frequency atmospheric pressure nonthermal plasma), έχει μελετηθεί όσον αφορά την εφαρμοσιμότητά του στην αδρανοποίηση του *C. jejuni*. Το μη θερμικό πλάσμα ραδιοσυχνότητων, όταν εφαρμόστηκε για 6 min σε εμβολιασμένο με το βακτήριο ζαμπόν στήθος κοτόπουλου, επιτεύχθηκε μείωση του καμπυλοβακτηρίου κατά 3 cfu/g. Έτσι, είναι κατανοητό ότι η συγκεκριμένη τεχνολογία, έχει μια πιθανή εφαρμογή στην αδρανοποίηση του καμπυλοβακτηρίου σε δείγματα τροφίμων, αλλά πρόσθετες μελέτες πρέπει να γίνουν για την αξιολόγηση των επιδράσεων του μη θερμικού RF πλάσματος στα χαρακτηριστικά του κρέατος πουλερικών και των προϊόντων του (Dirks *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2013, Soro *et al.*, 2020).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το *Campylobacter jejuni*, που απομονώθηκε για πρώτη φορά αρχές τις δεκαετίας του '70 από δείγματα ανθρώπων με πυρετό και διάρροια, είναι αρνητικό κατά Gram, χημειοετεροτροφικό και μικροαερόφιλο βακτήριο με καμπυλωτό σχήμα και μαστίγια. Για να μπορέσει να επιβιώσει, σχηματίζει βιο-υμένα, εισέρχεται σε μία βιώσιμη, αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση, όταν υπόκεινται σε δυσμενείς συνθήκες, αντιδρά σε διάφορους παράγοντες στρες με την έκφραση γονιδίων και εμφανίζει ανθεκτικότητα σε αρκετές κατηγορίες αντιβιοτικών, όπου αποτελεί ανησυχία για την δημόσια υγεία. Το καμπυλοβακτήριο είναι η πιο συχνά διαγνωσμένη βακτηριακή αιτία ανθρώπινης γαστρεντερίτιδας. Απαντάται κυρίως στα πουλερικά, αλλά και σε άλλα ζώα ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας και η κατανάλωση του ατελώς μαγειρεμένου κρέατος πουλερικών, προκαλεί καμπυλοβακτηρίωση και ίσως διάφορα επακόλουθα, τις το σύνδρομο Guillain-Barré. Η παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης της ανθρώπινης καμπυλοβακτηρίωσης, έχει δείξει ανοδική τάση από το έτος 2005 και έπειτα, με πολυάριθμες κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις. Ωστόσο, αυτό το παθογόνο βακτήριο για να μπορέσει να προκαλέσει καμπυλοβακτηρίωση τις ανθρώπους, χρησιμοποιεί παράγοντες μολυσματικότητας, τις είναι η κινητικότητα των μαστίγιων και η χημειοταξία, η προσκόλλησή του στον εντερικό βλεννογόνο, η εισβολή του στο κύτταρο-ξενιστή, η παραγωγή τοξινών, το σύστημα πρόσληψης σιδήρου, οι δομές των υδατανθράκων και υποθετικές πρωτεάσες του. Η θεραπεία της απλής λοίμωξης, στηρίζεται στην ενυδάτωση και την ισορροπία ηλεκτρολυτών, ενώ η θεραπεία με αντιβιοτικά συστήνεται κυρίως σε περιπτώσεις σοβαρής λοίμωξης και η χρήση της είναι απαραίτητο να γίνεται με σύνεση. Το *C. jejuni* επειδή αποτελεί παγκόσμιο επίκεντρο έρευνας, λόγω των τροφιμογενών επιπτώσεών του, είναι σημαντική η ανίχνευσή του στα τρόφιμα σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας με διάφορες μεθόδους. Ακόμη, η ανάπτυξη διάφορων στρατηγικών για την ελάττωση του καμπυλοβακτηρίου, είναι υψίστης σημασίας στην βιομηχανία επεξεργασίας πουλερικών, καθώς και η μερική μείωση του παθογόνου βακτηρίου με αυτές τις τεχνικές μπορεί να μειώσει σημαντικά το ποσοστό μόλυνσης στον άνθρωπο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Allos B.M., 2001. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32(8), 1201–1206. DOI: 10.1086/319760.

Altekruse S.F., Stern N.J., Fields P.I., & Swerdlow D.L., 1999. *Campylobacter jejuni*—An Emerging Foodborne Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 5(1), 28–35. DOI: 10.3201/eid0501.990104.

Baaboua A., Maadoudi M., Bouyahya A., & Abrini J., 2017. Intestinal Infections of *Campylobacter*: A Review. *Microbiology Research Journal International*, 18(6), 1–8. DOI: 10.9734/mrji/2017/31496.

Baker M., 2012. Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, 9(6), 541–544. DOI: 10.1038/nmeth.2027.

Barakat A.M.A., Abd El-Razik K.A., Elfadaly H.A., Rabie N.S., Sadek S.A.S., & Almuzaini A.M., 2020. Prevalence, molecular detection, and virulence gene profiles of *Campylobacter* species in humans and foods of animal origin. *Veterinary world*, 13(7), 1430–1438. DOI: 10.14202/vetworld.2020.1430-1438.

Bhunja A.K., 2018. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: *Foodborne Microbial Pathogens (Second Edition)*, Food Science Text Series, Ed. D.R. Heldman, Springer, New York, 217–226. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4_12

Bolton D.J., 2015. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, 48, 99–108. DOI: 10.1016/j.fm.2014.11.017.

Chlebicz A., & Śliżewska K., 2018. *Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 1–28. DOI: 10.3390/ijerph15050863.

Clemente I., Condón-Abanto S., Pedrós-Garrido S., Whyte P., & Lyng J.G., 2020. Efficacy of pulsed electric fields and antimicrobial compounds used alone and in combination for the inactivation of *Campylobacter jejuni* in liquids and raw chicken. *Food Control*, 107(2), 1–8. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.01.017.

Dai L., Sahin O., Grover M., & Zhang Q., 2020. New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter*. *Translational Research*, 223, 76–88. DOI: 10.1016/j.trsl.2020.04.009.

Dasti J.I., Tareen A.M., Lugert R., Zautner A.E., & Groß U., 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(4), 205–211. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.07.002.

Dirks B.P., Dobrynin D., Fridman G., Mukhin Y., Fridman A., & Quinlan J.J., 2012. Treatment of Raw Poultry with Nonthermal Dielectric Barrier Discharge Plasma to Reduce *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 75(1), 22–28. DOI: 10.4315/0362-028x.jfp-11-153.

Elmi A., Nasher F., Dorrell N., Wren B., & Gundogdu O., 2021. Revisiting *Campylobacter jejuni* Virulence and Fitness Factors: Role in Sensing, Adapting, and Competing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1–15. DOI: 10.3389/fcimb.2020.607704.

El-Zamkan M.A., & Abdel Hameed K.G., 2016. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and some dairy products. *Veterinary World*, 9(10), 1147–1151. DOI: 10.14202/vetworld.2016.1147-1151.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), 1–262. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5500.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17(12), 1–276. DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5926.

European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 1–231. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4634.

European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12), 1–228. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5077.

European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control, 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2), 1–286. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6406.

Facciola A., Riso R., Avventuroso E., Visalli G., Delia S.A., & Lagana P., 2017. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 58(2), 79–92.

Frasao B. da S., Marin V.A., & Conte-Junior C.A., 2017. Molecular Detection, Typing, and Quantification of *Campylobacter* spp. in Foods of Animal Origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 721–734. DOI: 10.1111/1541-4337.12274.

Gallas-Lindemann C., Sureshkumar P., Noack M.J., & Sotiriadou I., 2017. Loop-Mediated Isothermal Amplification: An Advanced Method for the Detection of *Giardia*. In: *Current Topics in Giardiasis*, Ed. A.J. Rodriguez-Morales, IntechOpen, UK, 109–130. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70804>

Ganan M., Silván J.M., Carrascosa A.V., & Martínez-Rodríguez A.J., 2012. Alternative strategies to use antibiotics or chemical products for controlling *Campylobacter* in the food chain. *Food Control*, 24(1–2), 6–14. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.09.027.

García-Sánchez L., Melero B., & Rovira J., 2018. *Campylobacter* in the Food Chain. In: *Advances in Food and Nutrition Research*, Ed. Rodríguez-Lázaro D., Elsevier, The Netherlands, 215–252. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.04.005>.

Geng Y., Liu G., Liu L., Deng Q., Zhao L., Sun X. X., Wang J., Zhao B., & Wang J., 2019. Real-time recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of *Campylobacter jejuni* in food samples. *Journal of Microbiological Methods*, 157, 31–36. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.12.017.

Gonçalves-Tenório A., Silva B., Rodrigues V., Cadavez V., & Gonzales-Barron U., 2018. Prevalence of Pathogens in Poultry Meat: A Meta-Analysis of European Published Surveys. *Foods*, 7(5), 1–16. DOI: 10.3390/foods7050069.

Gonzalez-Fandos E., Martinez-Laorden A., & Perez-Arnedo I., 2020. Effect of Decontamination Treatments on *Campylobacter jejuni* in Chicken. *Foods*, 9(10), 1–10. DOI: 10.3390/foods9101453.

Gonzalez-Fandos E., Maya N., Martínez-Laorden A., & Perez-Arnedo I., 2020. Efficacy of Lactic Acid and Modified Atmosphere Packaging against *Campylobacter jejuni* on Chicken during Refrigerated Storage. *Foods*, 9(1), 1–15. DOI: 10.3390/foods9010109.

González-Fandos E., Maya N., & Pérez-Arnedo I., 2015. Effect of propionic acid on *Campylobacter jejuni* attached to chicken skin during refrigerated storage. *International Microbiology*, 18(3), 171–175. DOI: 10.2436/20.1501.01.247.

Gundogdu O., & Wren B.W., 2020. Microbe Profile: *Campylobacter jejuni* – survival instincts. *Microbiology*, 166(3), 230–232. DOI: 10.1099/mic.0.000906.

Hadush A., & Pal M., 2013. Detection of *Campylobacter jejuni* from food and its epidemiology. *Journal of Public Health and Epidemiology*, 5(9), 357-361. DOI: 10.5897/JPHE2013.0537.

Hakeem M.J., Feng J., Nilghaz A., Ma L., Seah H.C., Konkel M.E., & Lu X., 2020. Active Packaging of Immobilized Zinc Oxide Nanoparticles Controls *Campylobacter jejuni* in Raw Chicken Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(22), 1-17. DOI: 10.1128/aem.01195-20.

Hansson I., Sandberg M., Habib I., Lowman R., & Engvall E.O., 2018. Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(S1), 30–48. DOI: 10.1111/tbed.12870.

Haughton P.N., Lyng J., Cronin D., Fanning S., & Whyte P., 2012. Effect of crust freezing applied alone and in combination with ultraviolet light on the survival of *Campylobacter* on raw chicken. *Food Microbiology*, 32(1), 147–151. DOI: 10.1016/j.fm.2012.05.004.

Heimesaat M.M., Backert S., Alter T., & Bereswill S., 2021. Human *Campylobacteriosis* -A Serious Infectious Threat in a One Health Perspective. In: *Fighting Campylobacter Infections, Current Topics in Microbiology and Immunology*, Ed. Backert S., Springer International Publishing, Switzerland, 1–23. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-65481-8_1.

Hessulf F., Ljungberg J., Johansson P.-A., Lindgren M., & Engdahl J., 2016. *Campylobacter jejuni*-associated perimyocarditis: two case reports and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, 16, 1-7. DOI: 10.1186/s12879-016-1635-7.

Hoepers P.G., Medina G., Rossi D.A., & Fernandez H., 2016. About *Campylobacter* spp. In: *Campylobacter spp. and Related Organisms in Poultry*, Eds. Fonseca B.B., Fernandez, H., & Rossi, D.A., Springer International Publishing, Switzerland, 1–18. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-29907-5_1.

Hofreuter D., 2014. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 1-14. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00137.

Hsieh Y.H., Simpson S., Kerdahi K., & Sulaiman I.M., 2018. A Comparative Evaluation Study of Growth Conditions for Culturing the Isolates of *Campylobacter* spp. *Current Microbiology*, 75(1), 71–78. DOI: 10.1007/s00284-017-1351-6.

Humphrey T., O'Brien S., & Madsen M., 2007. *Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 237–257. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006.

Igwaran A., & Okoh A.I., 2019. *Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. Heliyon*, 5(11), 1–14. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02814.

Jackowska-Tracz A., & Tracz M., 2015. *Effects of high hydrostatic pressure on Campylobacter jejuni in poultry meat. Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(2), 261–266. DOI: 10.1515/pjvs-2015-0034.

Jackson D.N., Davis B., Tirado S.M., Duggal M., van Frankenhuyzen J.K., Deaville D., Wijesinghe M.A.K., Tessaro M., & Trevors J.T., 2009. *Survival mechanisms and culturability of Campylobacter jejuni under stress conditions. Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4), 377–394. DOI: 10.1007/s10482-009-9378-8.

Jacobs-Reitsma W., Lyhs U., & Wagenaar J., 2008. *Campylobacter in the Food Supply. In: Campylobacter, Third Edition, Eds. Nachamkin I., Szymanski C.M. & Blaser M.J., ASM Press, Washington DC, USA, 625–644. DOI: http://dx.doi.org/10.1128/9781555815554.ch35.*

Johnson T.J., Shank J.M., & Johnson J.G., 2017. *Current and Potential Treatments for Reducing Campylobacter Colonization in Animal Hosts and Disease in Humans. Frontiers in Microbiology*, 8, 1–14. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00487.

Joshua G.W.P., Guthrie-Irons C., Karlyshev A.V., & Wren B.W., 2006. *Biofilm formation in Campylobacter jejuni. Microbiology*, 152(2), 387–396. DOI: 10.1099/mic.0.28358-0.

Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M., & Man, S.M., 2015. *Global Epidemiology of Campylobacter Infection. Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720. DOI: 10.1128/cmr.00006-15.

Kassem A., Meade J., McGill K., Walsh C., Gibbons J., Lyng J., & Whyte P., 2018. *An investigation of high intensity ultrasonication and chemical immersion treatments on Campylobacter jejuni and spoilage bacteria in chicken. Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 298–305. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.10.015.

Khan J.A, Rathore R.S, Abulreesh H., Qais F.A., & Ahmad I., 2018. *Cultural and Immunological methods for the detection of Campylobacter jejuni: A review. Indian Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, 6(3), 4-10.

Kim J-C., Oh E., Kim J., & Jeon B., 2015. Regulation of oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*, a microaerophilic foodborne pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–12. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00751.

Kim J-S., Lee E-J., Cho E-A., & Kim Y-J., 2013. Inactivation of *Campylobacter jejuni* using Radio-frequency Atmospheric Pressure Plasma on Agar Plates and Chicken Hams. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 33(3), 317–324. DOI: 10.5851/kosfa.2013.33.3.317.

Kreling V., Falcone F.H., Kehrenberg C., & Hensel A., 2020. *Campylobacter* sp.: Pathogenicity factors and prevention methods—new molecular targets for innovative antivirulence drugs? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(24), 10409–10436. DOI: 10.1007/s00253-020-10974-5.

Masdor N., Altintas Z., & Tothill I., 2017. Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Detection of *Campylobacter jejuni*. *Chemosensors*, 5(2), 1–15. DOI: 10.3390/chemosensors5020016.

Meurer L., Payne W., & Guffey J.S., 2020. Visible light as an inhibitor of *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(1), 1–4. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2019.09.022.

Mousavi S., Bereswill S., & Heimesaat M., 2020. Novel Clinical *Campylobacter jejuni* Infection Models Based on Sensitization of Mice to Lipooligosaccharide, a Major Bacterial Factor Triggering Innate Immune Responses in Human *Campylobacteriosis*. *Microorganisms*, 8(4), 1–26. DOI: 10.3390/microorganisms8040482.

Murphy C., Carroll C., & Jordan K.N., 2006. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 623–632. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02903.x.

Mutlu-Ingok A., & Karbancioglu-Guler F., 2017. Cardamom, Cumin, and Dill Weed Essential Oils: Chemical Compositions, Antimicrobial Activities, and Mechanisms of Action against *Campylobacter* spp. *Molecules*, 22(7), 1–13. DOI: 10.3390/molecules22071191.

Natsos G., Mouttotou N.K., Ahmad S., Kamran Z., Ioannidis A., & Koutoulis K.C., 2019. The genus *Campylobacter*: detection and isolation methods, species identification & typing techniques. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 70(1), 1327–1338. DOI: 10.12681/jhvms.20337.

Niessen L., Luo J., Denschlag C., & Vogel R.F., 2013. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiology*, 36(2), 191–206. DOI: 10.1016/j.fm.2013.04.017.

Oh E., Andrews K.J., McMullen, L.M., & Jeon B., 2019. Tolerance to stress conditions associated with food safety in *Campylobacter jejuni* strains isolated from retail raw chicken. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. DOI: 10.1038/s41598-019-48373-0.

Oyarzabal O.A., & Fernández H., 2016. Isolation and Identification of *Campylobacter* spp. in Poultry. In: *Campylobacter* spp. and Related Organisms in Poultry, Eds. Fonseca B.B, Fernandez H., & Rossi D.A., Springer International Publishing, Switzerland, 19–35. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-29907-5_2.

Oyarzabal O., & Battie C., 2012. Immunological Methods for the Detection of *Campylobacter* spp. - Current Applications and Potential Use in Biosensors. In: *Trends in Immunolabelled and Related Techniques*, Ed. Abuelzein E., IntechOpen, UK, 203–226. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/35692>.

Park H., Hung Y.C., & Brackett R.E., 2002. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1–2), 77–83. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00622-5.

Peruzy M.F., Proroga Y.T.R., Capuano F., Corrado F., Santonicola S., De Medici D., Delibato E., & Murru N., 2020. Detection and quantification of *Campylobacter* in foods: New analytic approaches to detect and quantify *Campylobacter* spp. in food samples. *Italian Journal of Food Safety*, 9(2), 88–92. DOI: 10.4081/ijfs.2020.8591.

Rautelin H., & Hanninen M.L., 2000. *Campylobacters: the most common bacterial enteropathogens in the Nordic countries*. *Annals of Medicine*, 32(7), 440–445. DOI: 10.3109/07853890009002018.

Ricke S.C., Feye K.M., Chaney W.E., Shi Z., Pavlidis H., & Yang Y., 2019. Developments in Rapid Detection Methods for the Detection of Foodborne *Campylobacter* in the United States. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–19. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03280.

Salem A., Abou El Roos N., & Nassar Y., 2019. Antimicrobial Effects of some Essential Oils on the Foodborne Pathogen *Campylobacter jejuni*. *Benha Veterinary Medical Journal*, 36(1), 65–70. DOI: 10.21608/bvmj.2019.83232.

Shrestha S., Wagle B.R., Upadhyay A., Arsi K., Donoghue D.J., & Donoghue A.M., 2019. Carvacrol antimicrobial wash treatments reduce *Campylobacter jejuni* and aerobic bacteria on broiler chicken skin. *Poultry Science*, 98(9), 4073–4083. DOI: 10.3382/ps/pez198.

Shrestha S., Wagle B.R., Upadhyay A., Arsi K., Upadhyaya I., Donoghue D.J., & Donoghue A.M., 2019. Edible Coatings Fortified with Carvacrol Reduce *Campylobacter jejuni* on Chicken Wingettes

and Modulate Expression of Select Virulence Genes. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–12. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00583.

Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P., & Teixeira P., 2011. *Campylobacter spp. as a Foodborne Pathogen: A Review*. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1-12. DOI: 0.3389/fmicb.2011.00200.

Silva W.C., Targino B.N., Mendonça R.S., Sant’Ana A.S., & Hungaro, H.M., 2018. *Campylobacter: An overview of cases, occurrence in food, contamination sources, and antimicrobial resistance in Brazil*. *Food Reviews International*, 34(4), 364–389. DOI: 10.1080/87559129.2017.1298125.

Skirrow M.B., 2003. *CAMPYLOBACTER | Campylobacteriosis*. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Second Edition*, Ed. Caballero B., Academic Press, USA, 790–795. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00153-x>.

Soro A.B., Whyte P., Bolton D.J., & Tiwari B.K., 2020. *Strategies and novel technologies to control Campylobacter in the poultry chain: A review*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1353–1377. DOI: 10.1111/1541-4337.12544.

Suzuki H., & Yamamoto S., 2009. *Campylobacter Contamination in Retail Poultry Meats and By-Products in the World: A Literature Survey*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(3), 255–261. DOI: 10.1292/jvms.71.255.

Tang Y., Fang L., Xu C., & Zhang Q., 2017. *Antibiotic resistance trends and mechanisms in the foodborne pathogen, Campylobacter*. *Animal Health Research Reviews*, 18(2), 87–98. DOI: 10.1017/s1466252317000135.

Teramura H., Iwasaki M., & Ogihara H., 2015. *Development of a Novel Chromogenic Medium for Improved Campylobacter Detection from Poultry Samples*. *Journal of Food Protection*, 78(9), 1750–1755. DOI: 10.4315/0362-028x.jfp-15-115.

Thornval N.R., & Hoorfar J., 2021. *Progress in detection of Campylobacter in the food production chain*. *Current Opinion in Food Science*, 39, 16–21. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.12.001.

Tresse O., Alvarez-Ordóñez A., & Connerton I.F., 2017. *Editorial: About the Foodborne Pathogen Campylobacter*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–4. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01908.

Vetchapitak, T., Rana M.S., Sasaki S., Taniguchi T., Sugiyama S., Soejima J., Luangtongkum T., Yamaguchi Y., & Misawa N., 2021. *A new disinfectant technique for Campylobacter jejuni and spoilage bacteria on chicken skin using a high-pressure pulsed jet spray apparatus*. *Food Control*, 125, 1-7. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.107989.

Wagle B.R., Arsi K., Upadhyay A., Shrestha S., Venkitanarayanan K., Donoghue A.M., & Donoghue D.J., 2017. β -Resorcylic Acid, a Phytophenolic Compound, Reduces *Campylobacter jejuni* in Postharvest Poultry. *Journal of Food Protection*, 80(8), 1243–1251. DOI: 10.4315/0362-028x.jfp-16-475.

Wagle B.R., Shrestha S., Arsi K., Upadhyaya I., Donoghue A.M., & Donoghue D.J., 2019. Pectin or chitosan coating fortified with eugenol reduces *Campylobacter jejuni* on chicken wingettes and modulates expression of critical survival genes. *Poultry Science*, 98(3), 1461–1471. DOI: 10.3382/ps/pey505.

Wei D., Oyarzabal O.A., Huang T.S., Balasubramanian S., Sista S., & Simonian A.L., 2007. Development of a surface plasmon resonance biosensor for the identification of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 78–85. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.12.002.

Windiasti G., Feng J., Ma L., Hu Y., Hakeem M.J., Amoako K., Delaquis P., & Lu X., 2019. Investigating the synergistic antimicrobial effect of carvacrol and zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 96, 39–46. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.08.028.

Wong Y.-P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., & Chee H.Y., 2018. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626–643. DOI: 10.1111/jam.13647.

Yang Y., Feye K.M., Shi Z., Pavlidis H.O., Kogut M., Ashworth A.J., & Ricke S.C., 2019. A Historical Review on Antibiotic Resistance of Foodborne *Campylobacter*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-8. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01509.

Young K.T., Davis L.M., & DiRita V.J., 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 5(9), 665–679. DOI: 10.1038/nrmicro1718.

Zhao T., & Doyle M.P., 2006. Reduction of *Campylobacter jejuni* on Chicken Wings by Chemical Treatments. *Journal of Food Protection*, 69(4), 762–767. DOI: 10.4315/0362-028x-69.4.762.