

δελτίον
ελληνικής
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ



Acta Microbiologica Hellenica

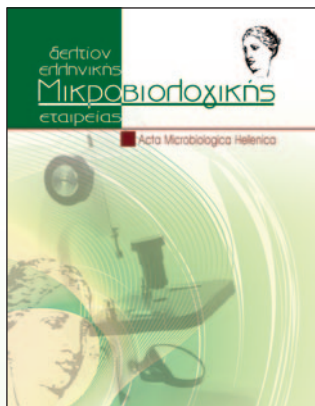
ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ
QUARTERLY JOURNAL OF THE HELLENIC SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

Ιούλιος-Σεπτέμβριος 2023 • Τόμος 68 • Τεύχος 3
July-September 2023 • Volume 68 • Issue 3

Επίσημη Έκδοση της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας
Official Publication of the Hellenic Society for Microbiology

ISSN: 0438-9573
e-ISSN: 2459-4113

Ἑλληνικὴ Μικροβιολογικὴ Εταιρεία



ISSN: 0438-9573 – e-ISSN: 2459-4113

Board of the Hellenic Society for Microbiology

2022-2025

President

A. Tsakris

Vice President

A. Papa-Konidari

Secretary General

G. Vrioni

Secretary

E. Kouskouni

Treasurer

S. Karachalios

Members

K. Gartzonika

I. Daniil

Society Secretariat:

"ASCENT",

29 Michalakopoulou, GR-115 28 Athens, Greece,

tel.: +30 210 7213225, fax: +30 210 7246180,

website: www.ascentltd.gr

Mailing Address of Journal: info@hms.org.gr

Annual Subscriptions: (50,00 €)

Cited in sites HMS, IATROTEK & SCOPUS

<https://acta.hms.org.gr/>

www.mednet.gr

www.iatrotek.org

www.scopus.com

Acta Microbiologica Hellenica

JOURNAL OF THE HELLENIC SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

Editor in Chief

A. Tsakris (Greece)

Scientific Assistant

C. Tsiamis (Greece)

Editorial Board

C. Anastasopoulou (Greece)

Ş. Aydemir (Turkey)

M. Exindari (Greece)

A. Friedrich (Netherlands)

A.S. Galabov (Bulgaria)

G. Gioula (Greece)

S. Göttig (Germany)

E. Hadziyannis (Greece)

P.G. Higgins (Germany)

Th. Kantardjieff (Bulgaria)

M. Kantzanou (Greece)

V. Kempf (Germany)

B. Kocić (Serbia)

M. Murdjeva (Bulgaria)

A.-M. Năşcuţiu (Romania)

A. Papa-Konidari (Greece)

J. Papaparaskevas (Greece)

G. Pappas (Greece)

S. Pournaras (Greece)

A. Rafila (Romania)

G.M. Rossolini (Italy)

L. Skoura (Greece)

N. Spanakis (Greece)

S. Stefani (Italy)

A. Tsantes (Greece)

G. Vrioni (Greece)

O. Zarkotou (Greece)

Scientific Advisory Board

G. Antonakos

A. Argyropoulou

S. Baka

D. Chatzidimitriou

M. Chatzidimitriou

S. Chryssou

M. Dalamaga

J. Daniil

E. Dimitroulia

M. Drogari-Apiranthitou

C. Gartzonika

M. Kachrimanidou

E. Kalogeropoulou

S. Karachalios

P. Karle

M. Kimouli

V. Koumaki

E. Kouskouni

V. Lampropoulou

I. Lamprou

E. Lebessi

V. Mamali

S. Maraki

M. Mavrouli

F. Markou

G. Meletis

A. Melidou

A. Mentis

M. Orfanidou

F. Paliogianni

M. Panopoulou

A. Pantazatou

P. Paraskevopoulou

E. Petinaki

E. Piperaki

V. Pityriga

A. Poulou

E. Priavali

E. Protonotariou

J. Routsias

V. Skandami

A. Stilianakis

K. Theodoridou

E. Vagdatli

H. Vagiakou

C. Vassalos

E. Vassalou

A. Vatopoulos

T.A. Vyzantiadis

E. Zervou

Δελτίον ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας



ISSN: 0438-9573 – e-ISSN: 2459-4113

Διοικητικό Συμβούλιο της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας Για την Τριετία 2022-2025

Πρόεδρος

A. Τσακρής

Αντιπρόεδρος

A. Παπά-Κονιδάρη

Γενικός Γραμματέας

Γ. Βρυώνη

Ειδικός Γραμματέας

E. Κουσκούνη

Ταμίας

Σ. Καραχάλιος

Σύμβουλοι

K. Γκαρτζονίκα

I. Δανιήλ

Γραμματεία Εταιρείας:

«ASCENT»,

Μιχαλακοπούλου 29, 115 28 Αθήνα,

τηλ: +30 210 7213225, fax: +30 210 7246180,

website: www.ascentltd.gr

Αλληλογραφία Περιοδικού: info@hms.org.gr

Ετήσια Συνδρομή

Εσωτερικού: (30,00 €), Εταιρειών: (90,00 €)

Εξωτερικού (50,00 €)

Περιλαμβάνεται στους ιστότοπους

της ΕΜΕ, ΙΑΤΡΟΤΕΚ & SCOPUS

<https://acta.hms.org.gr/el/>

www.mednet.gr

www.iatrotek.org

www.scopus.com

Acta Microbiologica Hellenica

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

Διευθυντής Σύνταξης

A. Τσακρής

Επιστημονικός Σύμβουλος

K. Τσιάμης

Συντακτική Επιτροπή

K. Αναστασοπούλου (Ελλάδα)

Σ. Aydemir (Τουρκία)

Γ. Βρυώνη (Ελλάδα)

Γ. Γκιούλα (Ελλάδα)

M. Εξηντάρη (Ελλάδα)

A. Friedrich (Ολλανδία)

O. Ζαρκωτού (Ελλάδα)

A.S. Galabov (Βουλγαρία)

S. Göttig (Γερμανία)

P.G. Higgins (Γερμανία)

Th. Kantardjieff (Βουλγαρία)

M. Καντζανού (Ελλάδα)

V. Kempf (Γερμανία)

B. Kocić (Σερβία)

M. Murdjeva (Βουλγαρία)

A.-M. Născuțiu (Ρουμανία)

A. Παπά-Κονιδάρη (Ελλάδα)

I. Παπαπαρασκευάς (Ελλάδα)

Γ. Παππάς (Ελλάδα)

Σ. Πουρνάρας (Ελλάδα)

A. Rafila (Ρουμανία)

G.M. Rossolini (Ιταλία)

Λ. Σκούρα (Ελλάδα)

N. Σπανάκης (Ελλάδα)

S. Stefani (Ιταλία)

A. Τσαντές (Ελλάδα)

E. Χατζηγιάννη (Ελλάδα)

Επιστημονική Συμβουλευτική Επιτροπή

Γ. Αντωνάκος

A. Αργυροπούλου

E. Βαγδατλή

E. Βαγιάκου

K. Βασσάλος

E. Βασσάλου

A. Βατόπουλος

T.A. Βυζαντιάδης

K. Γκαρτζονίκα

I. Δανιήλ

E. Δημητρούλια

M. Δρογκάρη-Απειρανθίτου

E. Ζερβού

K. Θεοδωρίδου

E. Καλογεροπούλου

Σ. Καραχάλιος

Π. Κάρλε

M. Καχριμανίδου

M. Κιμούλη

B. Κουμάκη

E. Κουσκούνη

B. Λαμπροπούλου

E. Λάμπρου

E. Λεμπέση

B. Μάμαλη

Σ. Μαράκη

Φ. Μάρκου

M. Μαυρούλη

Γ. Μελέτης

A. Μελίδου

A. Μεντής

Σ. Μπάκα

M. Νταλαμάγκα

M. Ορφανίδου

Φ. Παληογιάννη

M. Πανοπούλου

A. Πανταζάτου

Π. Παρασκευοπούλου

E. Πετεινάκη

E. Πιπεράκη

B. Πιτυρίγκα

A. Πούλου

E. Πριάβαλη

E. Πρωτονοταρίου

I. Ρούτσιας

B. Σκανδάμη

A. Στυλιανάκης

Δ. Χατζηδημητρίου

M. Χατζηδημητρίου

Σ. Χρυσού

REVIEW

159

**Water-transmitted parasites
causing water-borne outbreaks***Konstantinos Karamalis, Christos Markou, Panagiota Gotzamani,
Irina Kosta, Eleftheria Palla, Constantine M. Vassalos, Evdokia Vassalou*

ORIGINAL ARTICLE

173

**Isolation and study of bioactive properties
of secondary metabolites of *Aspergillus fischeri* VO1R,
inhibiting pancreatic lipase***Tashkhan Gulyamova, Dilaram Ruzieva, Maftuna Yoldosheva,
Gulchekhra Rasulova, Liliya Abdulmyanova, Iqbol Mukhammedov*

ORIGINAL ARTICLE

185

**Bacterial Aetiologic Profile and Antibiotic Response Patterns
of Lower Respiratory Tract Infection (LRTI) among HIV/AIDS Patients
on Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)
in Uyo, South-south Nigeria***Rachel Sylvester Okon, Ifeanyi Onwuezobe, Ekom Ndifreke Edem,
Unwana Ezekiel Akereuke, Samuel Bonne, Ene Omenyi Bawonda*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

203



**Παράσιτα που μεταδίδονται με το νερό
και προκαλούν υδατογενείς επιδημίες**

*Κωνσταντίνος Καραμαλής, Χρήστος Μάρκου, Παναγιώτα Γκοτζαμάνη,
Ειρήνη Κώστα, Ελευθερία Πάλλα, Κωνσταντίνος Μ. Βασάλος, Ευδοκία Βασσάλου*

**Isolation and study of bioactive properties
of secondary metabolites of *Aspergillus fischeri* VO1R,
inhibiting pancreatic lipase**

*Tashkhan Gulyamova, Dilaram Ruzieva, Maftuna Yoldosheva,
Gulchekhra Rasulova, Liliya Abdulmyanova, Iqbol Mukhammedov*

**Bacterial Aetiologic Profile and Antibiotic Response Patterns
of Lower Respiratory Tract Infection (LRTI) among HIV/AIDS Patients
on Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)
in Uyo, South-south Nigeria**

*Rachel Sylvester Okon, Ifeanyi Onwuezobe, Ekom Ndifreke Edem,
Unwana Ezekiel Akereuke, Samuel Bonne, Ene Omenyi Bawonda*



ΗΜΕΡΕΣ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ
2024

ΤΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΤΗ
ΜΕΤΑ-COVID ΕΠΟΧΗ:
ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

(Υβριδικό)

22-24 Φεβρουαρίου 2024

Crowne Plaza Hotel, Αθήνα



ΧΟΡΗΓΟΥΝΤΑΙ ΜΟΡΙΑ
ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ
(C.M.E. CREDITS)

Congresses | Publications
Digital Constructions



Παράσιτα που μεταδίδονται με το νερό και προκαλούν υδατογενείς επιδημίες

Κωνσταντίνος Καραμαλής,¹ Χρήστος Μάρκου,¹ Παναγιώτα Γκοτζαμάνη,^{2,3} Ειρήνη Κώστα,¹ Ελευθερία Πάλλα,³ Κωνσταντίνος Μ. Βασάλος,³ Ευδοκία Βασσάλου¹

¹Τμήμα Δημόσιας και Κοινωνικής Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα, Ελλάδα

²ΠΜΣ «Μοριακή Ιατρική Βιοπαθολογία», Τμήμα Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικών και Καποδιστριακών Πανεπιστημίων Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

³Μικροβιολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Νέας Ιωνίας «Κωνσταντοπούλειο-Πατησίων», Αθήνα, Ελλάδα.

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10203096>



Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, τα παράσιτα που μεταδίδονται με το νερό αποτελούν σημαντικό αίτιο υδατογενών επιδημιών. Τα παρασιτικά πρωτόζωα *Giardia lamblia* και *Cryptosporidium* spp. είναι τα συχνότερα αίτια υδατογενών επιδημιών από παράσιτα. Παρασιτικά πρωτόζωα, όπως είναι η *Entamoeba histolytica* και το *Toxoplasma gondii*, ή οι ελεύθερες βιώσες αμοιβάδες *Naegleria fowleri* και *Acanthamoeba* spp. που ζουν σε περιβαλλοντικά ύδατα, μεταδίδονται επίσης με το νερό και προκαλούν λοιμώξεις. Έχουν ενοχοποιηθεί και παρασιτικά μετάζωα που

μεταδίδονται με το νερό, όπως είναι η *Ascaris lumbricoides*, ο *Trichuris trichiura*, η *Taenia solium*, καθώς και εκείνα που χρησιμοποιούν ενδιάμεσους ξενιστές του υδάτινου περιβάλλοντος για να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο, όπως είναι το *Schistosoma* spp. και η *Fasciola hepatica*. Η μόλυνση από παράσιτα μπορεί να γίνει από άμεση κατανάλωση πόσιμου νερού από μολυσμένο σύστημα ύδρευσης και από κατανάλωση μολυσματικών μορφών από ύδατα αναψυχής, ακόμη και από τρόφιμα ή λαχανικά που στη παρασκευή ή το πλύσιμό τους χρησιμοποιήθηκε μολυσμένο νερό. Επιπλέον, το χαμηλό επίπεδο ατομικής υγιεινής σχετίζεται άμεσα με τη μετάδοση των παρασίτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ορισμένες θρησκευτικές τελετές που περιλαμβάνουν ρινική έκπλυση με νερό ή βύθιση σε νερό, με κίνδυνο μετάδοσης ελευθέρως βιωσών αμοιβάδων λόγω χρήσης μολυσμένων υδάτων. Το πρόβλημα των υδατογενών επιδημιών από παράσιτα είναι παγκόσμιο. Εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου τα παράσιτα είναι ενδημικά, οι περισσότερες αναφορές προέρχονται, όμως, από τις αναπτυγμένες χώρες όπου υπάρχουν καλύτερες δυνατότητες διάγνωσης και καταγραφής. Έχουν ξεκινήσει προσπάθειες για θεσμοθέτηση προτυποποιημένων μεθόδων ανίχνευσης των παρασίτων στα υδάτινα περιβάλλοντα και εφαρμογή προτύπων στον έλεγχο της ποιότητας των υδάτων.



Λέξεις κλειδιά

παράσιτα, μετάδοση με νερό, υδατογενείς επιδημίες

Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Κωνσταντίνος Μ. Βασάλος
Μικροβιολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο
Νέας Ιωνίας «Κωνσταντοπούλειο-Πατησίων»,
Θεόδωρου Κωνσταντόπουλου 3-5,
GR-14233, Αθήνα, Ελλάδα
Τηλέφωνο: 2132057314
email: vassalos.constantine@gmail.com

Εισαγωγή

Το νερό είναι σημαντικός αγωγός για τα παράσιτα και το μολυσμένο νερό είναι σημαντική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου είτε με άμεση κατανάλωση είτε με τη χρήση μολυσμένου νερού στην επεξεργασία ή την προετοιμασία τροφίμων.

Τα υδατογενή νοσήματα παραμένουν ακόμη και σήμερα μια από τις κυριότερες πηγές νοσηρότητας και θνησιμότητας στον κόσμο και ευθύνονται για υδατογενείς επιδημίες Προκαλούν πάνω από δύο εκατομμύρια θανάτους ετησίως και ενοχοποιούνται σε πολύ περισσότερες περιπτώσεις ασθένειας προεξαρχόντων των διαρροϊκών συνδρόμων και των γαστρεντερίτι-

δων.¹ Ανάμεσα στις υδατογενείς επιδημίες ξεχωρίζουν εκείνες που αποδίδονται σε παράσιτα που μεταδίδονται με το νερό, αφού υπολογίστηκε ότι την περίοδο 1991–2008 ανήλθαν στο 11% του συνόλου των υδατογενών επιδημιών.²

Λοιμογόνες μορφές των παρασίτων ανευρίσκονται σε παροχές πόσιμου ύδατος, σε ύδατα αναψυχής, συμπεριλαμβανομένων των γλυκών και θαλάσσιων υδάτων, και σε ύδατα άρδευσης, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να μολύνουν τα τρόφιμα μέσω πρακτικών που ακολουθούνται στη γεωργία και τη βιομηχανία τροφίμων, μεταδίδοντάς τις, όπως επιγραμματικά αναφέρεται «από το αγρόκτημα στο πιρούνι».³ Η μόλυνση μπορεί, επίσης, να συμβεί στο σπίτι όταν τα

τρόφιμα, ιδίως όταν φρέσκα λαχανικά και φρούτα, ξεπλένονται με νερό μολυσμένο με παράσιτα.

Η μετάδοση των παρασίτων με νερό γίνεται κυρίως με την κατάποση από τον ξενιστή μεγαλοοργανισμό της λοιμογόνου τους μορφής.³ Τα παρασιτικά πρωτόζωα *Giardia lamblia*, και *Cryptosporidium* spp. είναι οι κυριότερες αιτίες υδατογενών νοσημάτων από παράσιτα. Και άλλα είδη παρασιτικών πρωτόζωων (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*) μεταδίδονται με το νερό και προκαλούν λοιμώξεις. Για λοιμώξεις έχουν ενοχοποιηθεί, επίσης, οι αμοιβάδες που περιβάλλονται *Naegleria fowleri* και *Acanthamoeba* spp., παρασιτικά (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Taenia solium*), καθώς και έλμινθες (*Schistosoma* spp., *Fasciola hepatica*) που χρησιμοποιούν ενδιάμεσους ξενιστές του υδάτινου περιβάλλοντος για να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο.

Πρωτόζωα που μεταδίδονται υδατογενώς

Πρωτόζωα που παρασιτούν το έντερο

***Giardia lamblia*:** Πρόκειται για μαστιγοφόρο πρωτόζωο και αποτελεί το συχνότερο αίτιο υδατογενών επιδημιών από παράσιτα. Εμφανίζει δυο μορφές (τροφοζωίτης, κύστη).⁴⁻⁶ Η ανθεκτική μορφή της *G. lamblia*, η κύστη, είναι η μολυσματική μορφή και διασπείρεται μέσω των κοπράνων. Ο άνθρωπος δεν είναι ο μοναδικός ξενιστής, αφού κατοικίδια ή άγρια ζώα αποτελούν ξενιστές του παρασίτου.

Οι κύστες εντοπίζονται σε ύδατα, τρόφιμα και επιφάνειες.⁹ Η ανθεκτικότητα της κύστης διαρκεί έως και αρκετούς μήνες στο περιβάλλον, ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας του νερού.^{5,6} Σε ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας και σε κρύο νερό, οι κύστες επιβιώνουν για μήνες.^{7,8}

Η μετάδοση γίνεται με κατανάλωση μη πόσιμου νερού από λίμνες ή ποτάμια ή κατά την κολύμβηση σε μολυσμένα ύδατα ποταμών, λιμνών ή ύδατα αναψυχής.⁷ Η μετάδοση γίνεται και από τρόφιμα που έχουν, κατά την επεξεργασία τους, έλθει σε επαφή με μολυσμένο νερό.^{7,10}

Η λαμβλίαση (γιαρδίαση) εκδηλώνεται, κυρίως, με διάρροια, δυσαπορρόφηση, ναυτία, κοιλιακό άλγος και αφυδάτωση. Παρουσιάζεται απώλεια βάρους. Υπάρχουν, όμως, και ασυμπτωματικοί φορείς του παρασίτου.¹¹ Τα συμπτώματα διαρκούν 1–3 εβδομάδες. Ο χρόνος επώασης είναι 3–25 ημέρες. Υπάρχουν περιπτώσεις που τα συμπτώματα μπορεί να φαίνεται ότι έχουν υποχωρήσει, αλλά, μετά από κάποιες μέρες, ο ασθενής υποτροπιάζει. Έχουν παρατηρηθεί επιπλοκές, όπως είναι η αντιδραστική αρθρίτιδα, το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου και οι επαναλαμβανόμενες διάρροιες που μπο-

ρεί να διαρκέσουν χρόνια. Στα παιδιά, μπορεί να υπάρξει σωματική και πνευματική καθυστέρηση.¹²

***Cryptosporidium* spp.:** Πρόκειται για σπορόζωο που ανήκει στα κοκκίδια. Έχει δυο μορφές (σποροζωίτης, ωκύστη). Αναπτύσσεται στο λεπτό έντερο. Ο άνθρωπος δεν είναι ο μοναδικός ξενιστής. Στα ζώα το *Cryptosporidium* παρουσιάζει ένα είδος εξειδίκευσης. Άλλο είδος προσβάλλει τα τρωκτικά, άλλο τα πτηνά, άλλο τα οικόσιτα κ.ο.κ.¹³

Η αποβολή της ωκύστης του *Cryptosporidium* spp. στο περιβάλλον γίνεται μέσω κοπράνων ανθρώπων και ζώων.¹⁴ Οι ωκύστες εντοπίζονται σε όλα τα είδη υδάτων, ακόμη και σε αλμυρά νερά. Το *C. parvum* και το *C. hominis* ευθύνονται για το 90% της κρυπτοσποριδίωσης στον άνθρωπο.¹⁵

Οι ωκύστες είναι ανθεκτικές στη χλωρίωση. Διατηρούν τη μολυσματική τους ικανότητα ακόμη και για μήνες. Με τις διαδικασίες επεξεργασίας του νερού (π.χ. διήθηση), μειώνεται σημαντικά ο αριθμός τους στο νερό. Όμως, λόγω μικρού μεγέθους, 2–4 μm, ορισμένες περνούν στο δίκτυο κατανάλωσης από το φίλτρο και προκαλούν βλάβη στον άνθρωπο, αφού δεν απαιτείται μεγάλος αριθμός για την πρόκληση λοίμωξης. Η μολυσματική δόση σε υγιή άνθρωπο είναι η κατανάλωση 10–30 ωκύστεων.¹⁶

Ο χρόνος επώασης είναι μία εβδομάδα. Προσβάλλονται όλες οι ηλικίες. Παιδιά, υπερήλικες και ανοσοκατασταλμένοι εμφανίζουν βαρύτερα συμπτώματα. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν κοιλιακό άλγος, διάρροια, αφυδάτωση, απώλεια βάρους, έμετο και ναυτία. Σε ανοσοκατασταλμένα άτομα παρουσιάζεται και χολαγγειίτιδα.⁸ Ορισμένα άτομα, χωρίς κανένα σύμπτωμα, μπορούν να μεταδώσουν το παράσιτο (αποβολή ωκύστεων μέσω κοπράνων) κανονικά. Εκτός από συμπτώματα από το λεπτό έντερο, τα ανοσοκατασταλμένα άτομα που νοσούν εμφανίζουν και λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος.^{17,18} Σε μη ανοσοκατασταλμένα άτομα, η συμπτωματολογία διαρκεί 7–14 ημέρες χωρίς θεραπεία.¹⁷

***Entamoeba histolytica*:** Ευθύνεται για την αμοιβάδωση στον άνθρωπο που είναι σημαντικότερο παγκόσμιο πρόβλημα Δημόσιας Υγείας. Τα βακτήρια του εντέρου χρησιμεύουν ως τροφή, ενώ διαμορφώνουν ένα περιβάλλον με αναερόβιες συνθήκες και κατάλληλο pH που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των τροφοζωίων της.¹⁹

Η *E. histolytica* έχει κοσμοπολίτικη κατανομή. Συχνά εντοπίζεται σε γλυκά νερά που έχουν μολυνθεί με ανθρώπινα κόπρανα. Οι κύστες επιβιώνουν έως και 30 ημέρες στο νερό. Τα περισσότερα κρούσματα εμφανίζονται στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω χαμηλών επιπέδων υγιεινής.^{20,21}



Τα ποσοστά μόλυνσης μεταξύ ανδρών και γυναικών είναι ίδια. Τα περισσότερα κρούσματα είναι ηλικίας 18–50 ετών.²¹

Αν η *E. histolytica* παραμένει εντός του εντερικού σωλήνα, προκαλεί αμοιβαδική δυσεντερία. Σε υποκείμενο νόσημα, δυνατόν να υπάρξουν επιπλοκές (περιτονίτιδα, αμοιβαδικά κοκκιώματα).^{20,21}

Η συνηθέστερη εξωεντερική εκδήλωση είναι το αμοιβαδικό ηπατικό απόστημα που κλινικά εκφράζεται με πυρετό και πόνο στο άνω δεξιό τεταρτημόριο της κοιλιακής χώρας, καθώς και ίκτερο σε ποσοστό <10%. Το ηπατικό απόστημα είναι 10 φορές συχνότερο στους άντρες από ό,τι στις γυναίκες.^{20–22}

***Toxoplasma gondii*:** Είναι σπορόζωο με κοσμοπολίτικη κατανομή. Έχει δυο ξενιστές, έναν διάμεσο ξενιστή όπου αναπαράγεται άφυλα και έναν τελικό ξενιστή όπου αναπαράγεται έμφυλα. Η έμφυλη αναπαραγωγή του παρασίτου εντοπίζεται μόνο στην οικίστη γάτα, γι' αυτό, και θεωρείται τελικός ξενιστής.

Το *Toxoplasma* απαντάται σε τρεις μορφές (ταχυζωΐδια, σποροζωΐδια, βραδυζωΐδια). Τα ταχυζωΐδια είναι ελεύθερα στον οργανισμό και προκαλούν οξεία τοξοπλάσμωση. Τα βραδυζωΐδια εντοπίζονται σε ψευδοκύστες στους ιστούς του ξενιστή και προκαλούν χρόνια τοξοπλάσμωση.

Οι γάτες (τελικοί ξενιστές) μολύνονται από την κατανάλωση μολυσμένων θηλαστικών (ποντικών) και πτηνών και συνεχίζουν τη μετάδοση με την αποβολή του παρασίτου μέσω κοπράνων.²³ Ο άνθρωπος μολύνεται από την κατανάλωση μολυσμένου νερού ή μολυσμένης τροφής με ωοκύστες που από τη γάτα μέσω κοπράνων.²³

Προκαλεί τοξοπλάσμωση που σε υγιή άτομα είναι ήπια με συμπτώματα περίπου ίδια με της κοινής γρίπης με ευαίσθητους λεμφαδένες και μυαλγίες. Διαρκούν από μερικές εβδομάδες έως και μήνες. Το *T. gondii* μένει στον οργανισμό του ξενιστή σε ανενεργή κατάσταση και όταν βρεθεί σε ανοσοκαταστολή ενεργοποιείται.²⁴ Σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, παρουσιάζει αυξημένη θνησιμότητα.^{25,26}

Αν μια γυναίκα έχει μολυνθεί προτού κυοφορήσει, το έμβρυο αναπτύσσει άμυνα λόγω της ανοσίας που έχει η μητέρα. Αν η μητέρα μολυνθεί λίγο πριν ή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης γίνεται συγγενής μετάδοση (ή κάθετη μετάδοση) στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Όσο πιο νωρίς κατά την κυοφορία γίνει η μόλυνση της μητέρας, τόσο σοβαρότερη θα είναι η βλάβη στο έμβρυο. Τα αποτελέσματα της συγγενούς μετάδοσης μπορούν να είναι να αποβληθεί το έμβρυο ή να μην επιβιώσει προτού γεννηθεί ή να γεννηθεί με κλινικές ενδείξεις τοξοπλάσμωσης, όπως είναι ο υδροκέφαλος, οι σπασμοί και ενδοεγκεφαλικές αποπιτανώσεις και οι βλάβες στον αμφιβληστροειδή.^{24,26}

Ελευθέρως βιώσες αμοιβάδες

***Naegleria fowleri*:** Είναι μια αμφιζωική αμοιβάδα του περιβάλλοντος. Έχει την ικανότητα να ζει σε δυο κόσμους, ως ελεύθερος οργανισμός και ως ενδοπαράσιτο. Εντοπίζεται συνήθως σε λίμνες, ποτάμια, θερμές πηγές. Ενοχοποιείται για την πρόκληση πρωτοπαθούς αμοιβαδικής μηνιγγοεγκεφαλίτιδας στον άνθρωπο.²⁷

Έχει κοσμοπολίτικη κατανομή.²⁸ Η μόλυνση δεν γίνεται από την κατανάλωση μολυσμένου νερού. Οι άνθρωποι μολύνονται όταν εισέλθει στον οργανισμό τους από το νερό μέσω του αναπνευστικού συστήματος. Οι λουόμενοι μολύνονται σε μέρη με γλυκό, ζεστό νερό.²⁷ Έχει σχετιστεί, επίσης, με το τελετουργικό νίψιμο των Μουσουλμάνων πριν από κάθε προσευχή που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, την έκπλυση της μύτης και με την τελετουργική βύθιση των Ινδουιστών στα νερά του Γάγγη ποταμού.²⁹

Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες <10°C, οι τροφοζώιτες χάνουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους. Οι κύστει επιβιώνουν για μισό χρόνο σε θερμοκρασία 4°C.³⁰ Παρότι είναι αμοιβάδα των γλυκών νερών, έχει την ικανότητα προσαρμογής σε μεγαλύτερα ποσοστά αλατότητας με την πάροδο του χρόνου. Προκειμένου να επιβιώσει στον ανθρώπινο εγκέφαλο, είναι σε θέση να αντέξει στις αυξημένες συγκεντρώσεις ιόντων (0.9% NaCl) που συναντά στον ανθρώπινο οργανισμό.³⁰

Η *N. fowleri* εισέρχεται στον ρινικό βλεννογόνο και κατευθύνεται διαμέσου της νευροεπιθηλιακής οδού στη βάση του εγκεφάλου, τον υποθάλαμο και τον μεσεγκέφαλο.²⁸ Η πρωτοπαθής αμοιβαδική μηνιγγοεγκεφαλίτιδα είναι αιμορραγική, νεκρωτική με ποικίλα συμπτώματα από κεφαλαλγίες μέχρι και επιληπτικές κρίσεις με αποτέλεσμα την κατάληξη των ασθενών. Η έγκαιρη διάγνωση, ώστε να αποκλειστούν άλλα αίτια, είναι απαραίτητη λόγω της ταχύτατης ανάπτυξης της λοίμωξης.^{28,30} Πρόκειται για αναδυόμενο νόσημα με αύξηση της συχνότητας τα τελευταία 20 χρόνια που αναμένεται να αυξηθεί περισσότερο λόγω κλιματικής αλλαγής.³⁰

***Acanthamoeba spp.*:** Είναι ευκαιριακοί μονοκύτταροι οργανισμοί που ζουν ελεύθεροι στο περιβάλλον. Εντοπίζονται στον αέρα, το έδαφος, το νερό και τα λύματα. Οι λοιμώξεις από *Acanthamoeba spp.* (κοκκιωματώδης αμοιβαδική εγκεφαλίτιδα, κερατίτιδα από *Acanthamoeba*, δερματικές βλάβες) είναι σπάνιες αλλά πολύ σοβαρές.³¹

Η *Acanthamoeba spp.* διαθέτει μια κινητή μορφή, τον μολυσματικό τροφοζώιτη, και μια ανθεκτική μορφή, την κύστη. Μετατρέπεται σε κύστη όταν εκτεθεί σε δυσμενή περιβάλλοντα με μεταβολές της θερμοκρασίας και του pH.³²

Με βάση αναλύσεις της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού rRNA, οι ακανθαμοιβάδες ταξινομούνται σε 20 τύπους (T1–T20). Μόνο 11 γονότυποι (T1–T7, T10–T12, T15) είναι παθολογικοί για τον άνθρωπο και τα ζώα.³²

Η είσοδος στον οργανισμό του ανθρώπου γίνεται μέσω οφθαλμών, ρινικών οδών ή δέρματος που φέρει λύσεις στη συνέχειά του. Ανάλογα με τον τρόπο εισόδου στον ανθρώπινο οργανισμό, προκαλούνται αντίστοιχες βλάβες. Σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, οι ακανθαμοιβάδες προκαλούν διάχυτη νόσο και δερματικές βλάβες.³¹ Η κοκκιωματώδης αμοιβαδική εγκεφαλίτιδα είναι λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Παρατηρείται σε άτομα με ανοσολογικό έλλειμμα (εγκυμοσύνη, διαβήτη, HIV κ.ά.). Πρόκειται για προοδευτική νόσο με πολύ υψηλή θνησιμότητα λόγω αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης μέσα σε ένα με δύο μήνες από την έναρξη των συμπτωμάτων.³³

Η κερατίτιδα προκαλείται όταν η *Acanthamoeba* μολύνει τον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού, προκαλώντας δυνατό οφθαλμικό πόνο στον ασθενή. Ο συνηθέστερος τρόπος μόλυνσης είναι μέσω των φακών επαφής, χωρίς να αποκλείονται όσοι δεν φορούν.^{34,35} Η *Acanthamoeba*, λόγω της ικανότητας επιβίωσης σε αντίξοες συνθήκες, παίρνοντας τη μορφή της κύστης, είναι ανθεκτική τόσο στο χλώριο του νερού όσο και στο απολυμαντικό διάλυμα των φακών επαφής, με αποτέλεσμα τη μόλυνση. Η κερατίτιδα από *Acanthamoeba* είναι δύσκολο να διαγνωστεί και μπορεί να αντιμετωπιστεί ως μια ερπητική ή μικροβιακή κερατίτιδα λόγω των κοινών τους συμπτωμάτων.^{35,36}

Παρασιτικές έλμινθες που μεταδίδονται υδατογενώς

Έλμινθες που μεταδίδονται κοπρανοστοματικά

***Ascaris lumbricoides*:** Ανήκει στις έλμινθες που μεταδίδονται από το έδαφος. Η μόλυνση γίνεται κοπρανοστοματικά με ώαρια της νηματέλμινθας που ωριμάζουν στο περιβάλλον όπου αποβάλλονται από τον άνθρωπο μέσω κοπράνων. Τα ώαρια, αν και εντοπίζονται σε ύδατα, σπανίως μεταφέρονται σε δίκτυα ύδρευσης. Λόγω μεγέθους συγκρατούνται κατά την επεξεργασία του νερού (φιλτράρισμα).

Ο μοναδικός ξενιστής της είναι ο άνθρωπος. Η μόλυνση γίνεται είτε με ώαρια που βρίσκονται σε μολυσμένα τρόφιμα είτε με ώαρια που καταπίνονται με το νερό από μολυσμένες πηγές.^{37,38} Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας χρησιμοποιεί την αναζήτηση ωαρίων *A. lumbricoides* ως δείκτη για την ασφαλή επαναχρησιμοποίηση υγρών αποβλήτων στη γεωργία κατά την

ποσοτική αξιολόγηση κινδύνου για εμφάνιση υδατογενών μολύνσεων.³⁹

Ο βιολογικός κύκλος περιλαμβάνει την ενήλικη μορφή και τα μολυσματικά στάδια, ώαριο και προνύμφη (L3). Η ενήλικη μορφή παρασιτεί τον άνθρωπο.

Τα μολυσμένα άτομα δεν εμφανίζουν πάντοτε κλινική εικόνα. Η λοίμωξη από τη νηματέλμινθα (ασκαριδίωση) είναι η συνηθέστερη ελμινθίαση του ανθρώπου. Είναι, συνήθως, ήπια λοίμωξη με κοιλιακή δυσφορία. Σε εικόνα σοβαρής λοίμωξης τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο μετανάστευσης της έλμινθας. Κατά τη μετανάστευση διαμέσου των πνευμόνων προκαλούνται αναπνευστικά προβλήματα (π.χ. σύνδρομο πνευμονίτιδας του Loeffler). Όταν εγκαθίσταται στο λεπτό έντερο, παρουσιάζονται γαστρεντερικές διαταραχές, δυσεντερία και συμπτώματα ελαφριάς γαστρεντερίτιδας. Οι λοιμώξεις από μεγάλο αριθμό ωαρίων καταλήγουν σε απόφραξη εντέρου, σκωληκοειδούς απόφυσης, χοληφόρων και σε άλλες εξωεντερικές αποφράξεις (παγκρεατίτιδα) και περιτονίτιδα.^{39,40}

***Trichuris trichiura*:** Ο τριχοκέφαλος είναι μια νηματέλμινθα που μεταδίδεται από το έδαφος. Είναι η τρίτη σε συχνότητα έλμινθα του ανθρώπου. Η μετάδοση γίνεται από άτομο σε άτομο, κοπρανοστοματικά, από μολυσμένα με ώαρια τρόφιμα και νερό. Η ενήλικη έλμινθα παρασιτεί τον βλεννογόνο του παχέος εντέρου με το λεπτότερο τμήμα της ενσφηνωμένο σε αυτόν.³⁷

Η ήπια μορφή της τριχιουρίασης είναι ασυμπτωματική. Η βαριά μορφή εκδηλώνεται με ερεθισμός και φλεγμονή στο τυφλό, τη σκωληκοειδή απόφυση και το ανιόν κόλον. Σε μικρά παιδιά έχει παρατηρηθεί και πρόπτωση του ορθού.^{37,41}

***Taenia solium*:** Η ταινία η ένοπλος είναι μια κεστώδης έλμινθα με ενδιάμεσο ξενιστή (χοίρος) που φιλοξενεί το προνυμφικό στάδιο (κυστίκερκος) στους ιστούς του και τελικό ξενιστή (άνθρωπος) που φιλοξενεί την ενήλικη ταινία στο έντερό του.⁴² Ο άνθρωπος μπορεί, επίσης, να φιλοξενήσει και το προνυμφικό στάδιο (κυστίκερκος), οπότε μετατρέπεται σε ενδιάμεσο ξενιστή.⁴³

Η *T. solium* έχει παγκόσμια εξάπλωση. Ενδημεί στον αναπτυσσόμενο κόσμο.⁴² Οι κακές συνθήκες υγιεινής, η παραδοσιακή χοιροτροφία, η έλλειψη επίγνωσης της νόσου και η φτώχεια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαιώνιση της *T. solium*.⁴⁴ Οι άνθρωποι μολύνονται από κατανάλωση νερού ή ωμών λαχανικών μολυσμένων με ώαρια, με αυτομόλυνση με μεταφορά ωαρίων από την περιπρωκτική χώρα στο στόμα με ακάθαρτα χέρια, καθώς και από άνθρωπο σε άνθρωπο με μολυσμένα χέρια με τα ώαρια.



Η *T. solium* προκαλεί εντερική ταινίαση (λοίμωξη από την ενήλικη ταινία) και κυστικέρκωση (λοίμωξη από τον κυστίκερκο).⁴⁵ Η εντερική ταινίαση είναι ασυμπτωματική ή ήπια (κοιλιακό άλγος, διάταση, διάρροια και ναυτία).⁴² Οι κλινικές εκδηλώσεις της κυστικέρκωσης εξαρτώνται από το προσβεβλημένο όργανο. Οι κυστίκερκοι στον υποδόριο ιστό, τους μύες ή τα σπλάχνα δεν προκαλούν κλινικές εκδηλώσεις.⁴³ Οι κυστίκερκοι σε ζωτικούς ιστούς (οφθαλμοί, εγκέφαλος), προκαλούν οφθαλμική κυστικέρκωση και νευροκυστικέρκωση που σχετίζονται με σημαντική νοσηρότητα.⁴² Η νευροκυστικέρκωση είναι σοβαρή νόσος. Ευθύνεται για επιληπτικές κρίσεις και άλλα νευρολογικά συμπτώματα.⁴⁶ Οι παρασιτικές βλάβες εμποδίζουν την κυκλοφορία του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και οδηγούν σε αποφρακτικό υδροκέφαλο. Η εξωπαρεγχυματική νευροκυστικέρκωση προκαλεί ενδοκρανιακή υπέρταση και είναι χρόνια, σοβαρή νόσος με πολύ υψηλή θνησιμότητα.⁴⁵

Έλμινθες που μέρος του κύκλου τους απαιτεί υδάτινο περιβάλλον

Schistosoma spp.: Είναι τρηματώδεις έλμινθες που έχουν ως τελικούς ξενιστές τα σπονδυλωτά ζώα. Έχουν τέσσερα προνυμφικά στάδια (μειρακίδιο, σποροκύστη, κερκάρια, μετακερκάρια). Η εκκόλαψη των ωαρίων γίνεται στο γλυκό νερό και απαιτείται ένας ασπόνδυλος ενδιάμεσος ξενιστής προκειμένου να ολοκληρωθεί ο βιολογικός κύκλος.^{37,47}

Η εντερική σχιστοσωμίαση εκδηλώνεται με διάρροια, αιματηρές κενώσεις, μπορεί να προσβάλλει το ήπαρ και να προκαλέσει σε σοβαρές περιπτώσεις καρκίνο του παχέος εντέρου ή ηπάτωμα. Σε προσβολή του ουρογεννητικού συστήματος χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι το αίμα κατά την ούρηση. Σε χρόνια λοίμωξη του ουροποιητικού, η κλινική εικόνα εξελίσσεται σε ίνωση της ουροδόχου κύστεως με υδρονέφρωση και κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ουροδόχου κύστης.⁴⁸ Η σχιστοσωμίαση του γεννητικού συστήματος προκαλεί στις γυναίκες κολπική αιμορραγία, αίσθημα πόνου στη σεξουαλική επαφή και οζίδια στην περιοχή του αιδοίου, ενώ στους άνδρες προσβάλλει σπερματοδόχες κύστες και προστάτη.⁴⁸

Fasciola hepatica: Το δίστομο το ηπατικό είναι μια τρηματώδης έλμινθα του ήπατος που χρησιμοποιεί το νερό για την ανάπτυξη των ενδιάμεσων μορφών και έχει ως ενδιάμεσο ξενιστή τον κοχλία *Limnea truncatula*.^{37,49}

Στον άνθρωπο, η *F. hepatica* εγκαθίσταται σε ήπαρ και χοληφόρα. Ο άνθρωπος μολύνεται από κατανάλωση υδρόβιων φυτών (νεροκάρδαμο κ.ά) ή πόση νερού που είναι μολυσμένα με προνυμφικές μορφές της

έλμινθας.⁵⁰ Στην οξεία φάση, της λοίμωξης, η κλινική εικόνα περιλαμβάνει πυρετό, κοιλιακά άλγη, διάρροια, κνίδωση, ηπατομεγαλία και ηωσινοφιλία. Αποτέλεσμα της χρόνιας λοίμωξης είναι η διαλείπουσα απόφραξη των χοληφόρων οδών και η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, συνοδευόμενη από νευρολογικές αλλά και οφθαλμολογικές βλάβες.^{50,51}

Υδατογενείς επιδημίες που προκαλούνται από παράσιτα

Το 1920, για πρώτη φορά, στις ΗΠΑ συλλέχθηκαν εθνικά στατιστικά στοιχεία σχετικά με επιδημίες που σχετίζονταν με μολυσμένα ύδατα. Το 1971, εγκαταστάθηκαν τα πρώτα συστήματα παρακολούθησης για τη συλλογή δεδομένων σχετικά με την εμφάνιση, καθώς και την πρόκληση επιδημιών από υδατογενή νοσήματα. Από το 1986 που ξεκίνησε αντίστοιχη επιτήρηση στην Ευρώπη μέχρι το 1996 καταγράφηκαν 277 επιδημίες σε 16 Ευρωπαϊκές χώρες.

Μετά το 2000, αυξήθηκε το ενδιαφέρον για επιδημίες που προκαλούνται από παράσιτα, και κυρίως από πρωτόζωα, γιατί διαπιστώθηκε ότι η μέχρι τότε διαδικασία επεξεργασίας του πόσιμου νερού μπορεί να μην ήταν επαρκής, με δεδομένο ότι αφενός το μέγεθος των παρασίτων τους επέτρεπε να περάσουν από τους τότε χρησιμοποιούμενους ηθμούς κατά τη διήθηση αφετέρου οι κύστες και ωοκύστες τους ήταν ανθεκτικές στη συνήθη χλωρίωση.⁵²

Από τον Ιανουάριο του 2004 έως και τον Δεκέμβριο του 2010, καταγράφηκαν 199 εστιακές υδατογενείς επιδημίες που αποδόθηκαν σε μόλυνση από παράσιτα.² Οι περισσότερες επιδημίες αναφέρθηκαν από την Αυστραλία (46,7%), τη Βόρεια Αμερική (30,6%) και την Ευρώπη (16,5%). Ο αιτιολογικός παράγοντας των περισσότερων επιδημιών ήταν το *Cryptosporidium* spp. που προκάλεσε 120 επιδημίες, ενώ η *G. lamblia* ήταν υπεύθυνη για 70 επιδημίες. Η αιτία των υπόλοιπων εννέα επιδημιών ήταν άλλα παράσιτα, όπως είναι το *T. gondii*. Μόνο σε δύο επιδημίες σε παγκόσμιο επίπεδο ο αιτιολογικός παράγοντας ήταν η ελευθέρως βιώσα αμοιβάδα *Acanthamoeba* spp.²

Νέα μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2017 έδειξε ότι από τον Ιανουάριο του 2011 μέχρι και το Δεκέμβριο του 2016 καταγράφηκαν 182 περισσότερες επιδημίες συγκριτικά με την προηγούμενη περίοδο 2004–2010.⁵³ Η διασπορά των κρουσμάτων ανά τον κόσμο, ακολούθησε εκείνη της πρώτης περιόδου με την Αυστραλία να μετρά τις περισσότερες εστίες επιδημιών, με δεύτερη τη Βόρεια Αμερική και τέλος την Ευρώπη. Συγκεκριμένα, στην Αυστραλία εντοπίστηκε το 49% των επιδημιών, στη Βόρεια Αμερική το 41% και στην Ευρώπη το 9%. Οι συνηθέστεροι αιτιολογικοί παράγοντες στις συγκεκριμένες υδατογενείς επιδημίες

ήταν το *Cryptosporidium* spp. και η *Giardia* spp., τα οποία εντοπίστηκαν σε 239 (63%) και 142 (37%) κρούσματα αντιστοίχως.⁵³

Το διάστημα 2017–2020 καταγράφηκαν συνολικά 251 υδατογενείς επιδημίες από πρωτόζωα σε παγκόσμια κλίμακα.⁵⁴ Από τις 251 εστίες, περίπου το 58% ήταν στην Αμερική, το 29% στην Ευρώπη, το 11% στην Ωκεανία και σχεδόν το 2% στις Ασιατικές χώρες.⁵⁴ Τα πρωτόζωα εντοπίστηκαν σε διαφορετικούς τύπους νερού, όπως είναι το πόσιμο νερό ή τα ύδατα αναψυχής (πισίνες) τόσο τα επεξεργασμένα όσο και τα μη επεξεργασμένα.⁵⁴ Επίσης, πρωτόζωα εντοπίστηκαν και σε περιβαλλοντικά ύδατα.⁵⁵

Το διάστημα 2017–2020, οι περισσότερες υδατογενείς επιδημίες από παράσιτα παγκοσμίως καταγράφηκαν στις ΗΠΑ, 141 σε σύνολο 251 υδατογενών επιδημιών από παράσιτα. Συγκεκριμένα, από τις 141 εστιακές επιδημίες, οι 117 οφείλονταν στο *Cryptosporidium* spp., οι 23 στην *Giardia* spp. και μία στη *N. fowleri*. Από τις 117 επιδημικές εκρήξεις που οφείλονταν στο *Cryptosporidium* spp., οι 96 αποδόθηκαν σε επεξεργασμένα ύδατα αναψυχής, 10 σε μη επεξεργασμένα ύδατα αναψυχής, έξι σε κατανάλωση από πόσιμο νερό και πέντε σε περιβαλλοντικά ύδατα. Επιπλέον, από τις 23 επιδημίες που οφείλονταν στην *Giardia* spp., οι επτά σχετίστηκαν με περιβαλλοντικά ύδατα, οι δύο με μη επεξεργασμένα ύδατα αναψυχής, οι πέντε σε επεξεργασμένα ύδατα αναψυχής, οι τρεις με κατανάλωση πόσιμου νερού και οι υπόλοιπες έξι με κατανάλωση άλλων τύπων υδάτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε μια επιδημική έκρηξη στη Βραζιλία που αποδόθηκε σε μόλυνση του δημοσίου συστήματος παροχής πόσιμου νερού από *T. gondii*.⁵⁴ Την περίοδο 2017–2020, οι Ευρωπαϊκές χώρες παρουσίασαν το αμέσως επόμενο υψηλότερο ποσοστό επιπολασμού. Συγκεκριμένα, στο Ηνωμένο Βασίλειο καταγράφηκαν 51 επιδημίες, από τις οποίες οι 49 οφείλονταν σε *Cryptosporidium* spp., και οι δύο στην *Giardia* spp. Από τα κρούσματα με *Cryptosporidium* spp., τα 49 σχετίστηκαν με ύδατα αναψυχής και δύο με κατανάλωση πόσιμου νερού, ενώ όλα τα κρούσματα με *Giardia* spp. αποδόθηκαν σε μη επεξεργασμένα ύδατα αναψυχής. Η Ιρλανδία κατείχε το δεύτερο, μετά το Ηνωμένο Βασίλειο, υψηλότερο αριθμό κρουσμάτων με 10 από αυτά να συνδέονται με μόλυνση από *Cryptosporidium* spp. και έξι με μόλυνση από *Giardia* spp.⁵⁴

Συγκριτικά με τον προηγούμενο αιώνα έως και το 2004, οι υδατογενείς επιδημίες που προκαλούνται από παράσιτα παρουσίασαν αύξηση. Ειδικότερα, μεταξύ 1904 και 2004 καταγράφηκαν 325 επιδημίες, ενώ σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα, από το 2004 έως το 2010 σημειώθηκαν 199 επιδημίες. Επιπλέον, σε ακόμη μικρότερη χρονική περίοδο, από το 2011 έως

το 2016, υπήρξαν 182 περισσότερες επιδημίες από το διάστημα 2004–2010.^{2,52,53}

Ο χαμηλός αριθμός κρουσμάτων στις Ασιατικές χώρες αποτελεί παράδοξο και πιθανόν να οφείλεται στην έλλειψη συστημάτων επιδημιολογικής επιτήρησης. Συνολικά, το διάστημα 2017–2020, στην Ασία καταγράφηκαν τέσσερις επιδημίες, όμως αυτό δεν αντικατοπτρίζει την πραγματικότητα όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα και την εγκυρότητα του συστήματος επιτήρησης και ελέγχου παθογόνων. Στην πραγματικότητα, αυτό υποδεικνύει αδυναμία των εθνικών συστημάτων καταγραφής.⁵⁴ Στην Ιαπωνία, το 1999–2008, αναφέρθηκε επίπτωση αμοιβάδωσης με ετήσιο μέσο όρο 3,18 ανά 1.000.000 άτομα, χωρίς να καταγραφεί καμμία επιδημία.⁵⁶

Στις αναπτυσσόμενες χώρες η *G. lamblia* και τα *Cryptosporidium* spp. είναι τα κύρια αίτια υδατογενών επιδημιών από παράσιτα. Και τα δύο είναι παράσιτα, όχι μόνον του ανθρώπου, αλλά και των ζώων, και στις ΗΠΑ έχουν ενοχοποιηθεί δραστηριότητες που σχετίζονται με την εκτροφή βοοειδών, ιδίως με τη διασπορά κοπριάς και κτηνοτροφικής ιλύος και τις απορροές λυμάτων από μολυσμένους βοσκότοπους. Κατά τους Slifko et al. (2000) οι αιτίες εμφάνισης μιας συρροής κρουσμάτων σε ανθρώπους είναι η συχνή μόλυνση οικόσπιτων ζώων με *G. lamblia* ή *Cryptosporidium* spp, η μόλυνση του υδάτινου οικοσυστήματος με μεγάλους αριθμούς κύστεων ή/και ωοκύστεων που αποβάλλονται με τα κόπρανα των εκτρεφόμενων ζώων, καθώς και η ανθεκτικότητα των κύστεων της *Giardia* και των ωοκύστεων του *Cryptosporidium* στα συνήθως χρησιμοποιούμενα απολυμαντικά του νερού.⁵⁷

Στη Αφρική, την Ασία και τη Νότια Αμερική, περίπου 600 εκατομμύρια άνθρωποι ζουν σε ανθυγιεινές κατοικίες,⁵⁸ ενώ 1,1 δισεκατομμύρια άνθρωποι δεν έχουν πρόσβαση σε καθαρό νερό και 2,6 δισεκατομμύρια άνθρωποι στερούνται επαρκών συνθηκών υγιεινής. Ως εκ τούτου, σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου η παροχή νερού και η διάθεση των απορριμμάτων είναι ανεπαρκής αναμένονται υψηλά ποσοστά εκδήλωσης λοιμωδών νοσημάτων που μεταδίδονται με νερό. Ωστόσο, οι λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος υποδιαγιγνώσκονται στις αναπτυσσόμενες χώρες και ο επιπολασμός υποεκτιμάται.⁵⁹ Η *G. lamblia* έχει παγκόσμια κατανομή, με το 2% των ενηλίκων και το 8% των παιδιών να είναι μολυσμένα με το συγκεκριμένο παράσιτο. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, με 500.000 νέα κρούσματα κάθε χρόνο, το 33% του πληθυσμού θεωρείται ότι πάσχει από λαμβλίαση με το 50–80% από αυτά να αφορούν σε ασυμπτωματικούς φορείς.⁵⁹ Σε δείγματα κοπράνων ασθενών με συμπτώματα γαστρεντερίτιδας παρατηρήθηκαν ποσοστά *Cryptosporidium* 1–4% στην Ευρώπη και τη Βόρεια





Εικόνα 1 Γεωγραφική κατανομή υδατογενών επιδημιών από παράσιτα την περίοδο 1983–2010.⁵²



Εικόνα 2 Γεωγραφική κατανομή υδατογενών επιδημιών από παράσιτα την περίοδο 2004–2017.⁵³

Αμερική, ενώ σε Αφρική, Ασία και Νότια Αμερική ανερχόταν μεταξύ 3% και 20%. Επίσης, τα ποσοστά ασυμπτωματικής φορέας ήταν υψηλά (10–30%) σε αναπτυσσόμενες χώρες σε αντίθεση με <1% στις ανεπτυγμένες χώρες.⁶⁰ Εκτιμάται ότι το ίδιο συμβαίνει με και τα υπόλοιπα παράσιτα που μεταδίδονται με το νερό.² Η υψηλή νοσηρότητα από *Giardia* και *Cryptosporidium* στις αναπτυσσόμενες χώρες αποδόθηκε σε

αρκετούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των πολλαπλών οδών έκθεσης που αντανακλούν τις συνθήκες διαβίωσης και υγιεινής. Επιπλέον, τα έντονα καιρικά φαινόμενα, συμπεριλαμβανομένων των έντονων βροχοπτώσεων και των πλημμυρών ποταμών, αυξάνονται παγκοσμίως και είναι πιθανό να προκαλέσουν επιδημίες από παράσιτα που μεταδίδονται με το νερό.⁶¹

Ωστόσο, οι αναφορές υδατογενών επιδημιών από παράσιτα προέρχονται από περιοχές υψηλής οικονομικής και υγειονομικής κατάστασης, και πιθανώς να δίνεται μια στρεβλή εικόνα του τι συμβαίνει σε παγκόσμιο επίπεδο.⁵³ Στις αναπτυγμένες χώρες αναφέρεται υψηλότερο ποσοστό υδατογενών επιδημιών από παράσιτα σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες χώρες όπου ο επιπολασμός της μόλυνσης με παράσιτα είναι υψηλότερος με μεγαλύτερη την πιθανότητα να εμφανιστούν συχνότερα υδατογενείς επιδημίες από παράσιτα σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες χώρες.² Θα πρέπει να γίνει σαφές ότι αυτές οι χώρες που πιθανώς να είναι οι περισσότερο ευάλωτες και πληττόμενες, δεν είναι σε θέση να αναγνωρίσουν ή να παρέχουν οποιοσδήποτε καταγραφές για επιδημικές εξάρσεις ή κρούσματα υδατογενών επιδημιών από παράσιτα λόγω έλλειψης συστημάτων επιτήρησης και δυσκολιών στη διάγνωση.⁵³

Η μεγαλύτερη ευαισθησία και η πρόοδος της τεχνολογίας συνέβαλλαν στη βελτίωση των καταγραφών και της ανίχνευσης των παρασίτων στη διάρκεια υδατογενών επιδημιών.

Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τον επιπολασμό λοιμώξεων από παράσιτα έχουν γίνει σε ανεπτυγμένες χώρες όπου οι υποδομές υγείας και οι εξετάσεις στα εργαστήρια είναι πιο προσιτές από ό,τι συμβαίνει στις αναπτυσσόμενες χώρες⁶² με αποτέλεσμα τη βελτίωση των διαγνωστικής δυνατότητας και τη χρήση ευαίσθητων μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων που έχουν αναπτυχθεί στις αναπτυγμένες χώρες.⁶³ Αν και είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές, οι μοριακές τεχνικές απαιτούν ακριβό εξοπλισμό που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα σε χώρες με περιορισμένους πόρους, γεγονός που μπορεί εν μέρει να εξηγήσει γιατί οι επιδημίες φαίνεται να είναι πιο συχνές στις αναπτυγμένες χώρες παρά στις αναπτυσσόμενες χώρες.⁶⁴

Την τελευταία εικοσαετία έχουν γίνει προσπάθειες να προτυποποιηθούν οι μέθοδοι αναζήτησης των πρωτοζώων στο πλαίσιο διερεύνησης των αιτιολογικών παραγόντων των υδατογενών επιδημιών. Οι προσπάθειες εστιάζονται, κυρίως, στην αναζήτηση των πρωτοζώων *Cryptosporidium* spp. και *G. lamblia* στο νερό που γίνεται πλέον με τυποποιημένες μεθόδους, όπως είναι η μέθοδος USEPA 1623 για *Cryptosporidium* spp. και *G. lamblia*⁶⁵ και η μέθοδος UK Statutory Instruments 1999 no. 1524⁶⁶ για τον έλεγχο των ακαθάρτων και επεξεργασμένων υδάτων και τον έλεγχο βιωσιμότητας του *Cryptosporidium* spp.

Μέτρα πρόληψης υδατογενών επιδημιών

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τόσο τα επεξεργα-

σμένα όσο και τα μη επεξεργασμένα ύδατα μπορεί είναι μολυσμένα με παράσιτα λόγω πλημμυλούς απολύμανσης ή λόγω μόλυνσης κατά τη διαδικασία της διανομής τους. Οι μέθοδοι επεξεργασίας των υδάτων αποσκοπούν στη βελτίωση των χαρακτηριστικών του νερού, ώστε να το καταστήσουν κατάλληλο προς κατανάλωση. Οι κυριότερες πηγές πόσιμου νερού είναι τα υπόγεια και τα επιφανειακά ύδατα. Όταν το καθαρό νερό χρησιμοποιηθεί, παύει να ναι καθαρό και μετατρέπεται σε νερό με ρύπους ή και μολυντές, συμπεριλαμβανομένων βιομολυντών, όπως είναι μεταξύ άλλων τα παράσιτα.⁶⁷

Στη Δημόσια Υγεία, οι δράσεις πρόληψης μιας μεταδοτικής ασθένειας είναι ένα έργο συλλογικό, στο οποίο εμπλέκονται όλοι, πολίτες, κοινότητα, μέσα μαζικής ενημέρωσης, ακαδημαϊκή κοινότητα και αρμόδιοι σε θέματα Δημόσιας Υγείας.

Πρόληψη σε ατομικό επίπεδο

Οι αρχές πρόληψης υδατογενών επιδημιών που προκαλούνται από παράσιτα σε ατομικό επίπεδο δεν αποκλίνουν πολύ από τους κανόνες ατομικής υγιεινής, για παράδειγμα, καλό πλύσιμο των χεριών με νερό και σαπούνι. Με δεδομένο ότι αυξάνονται οι αναφορές για επιδημίες από ύδατα αναψυχής,⁵⁴ θα ήταν καλό να μην γίνεται κατάποση του νερού και να μην εισέρχονται στα ύδατα αναψυχής άτομα που παρουσιάζουν συμπτώματα διάρροιας.⁶⁸

Πολύ σημαντικό είναι να μην καταναλώνεται νερό που ενδεχομένως να είναι μολυσμένο. Συγκεκριμένα, θα πρέπει να μη γίνεται κατανάλωση μη επεξεργασμένου νερού και στην επαρχία ή τις κατασκηνώσεις να μη γίνεται χρήση νερού από λίμνες, πηγές, ρυάκια και πηγάδια, καθώς θεωρούνται ύποπτες πηγές μόλυνσης. Σε αυτή την περίπτωση, προτείνεται η χρήση εμφιαλωμένου νερού ή η χρήση φίλτρων νερού, τα οποία θα φέρουν ειδική σήμανση πιστοποίησης για μείωση των κύστεων ή/και των ωοκύστεων των πρωτοζώων. Παρομοίως, θα πρέπει να αποφεύγεται η κατανάλωση ωμών φρούτων και λαχανικών που δεν θα έχουν πλυθεί με ασφαλές νερό.⁶⁸

Πρόληψη σε επίπεδο πολιτείας

Στις αρχές του 1900 τα υδατογενή νοσήματα ήταν υπεύθυνα για το 25% των θανάτων που οφείλονται σε μολυσματικές ασθένειες. Όταν χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά η χλωρίωση για απολύμανση σε δημόσια παροχή νερού, οδήγησε σε κάθετη μείωση των υδατογενών ασθενειών στις ΗΠΑ.⁶⁹ Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εξέδωσε κατευθυντήριες γραμμές για την ποιότητα του πόσιμου νερού που περιλαμβάνει την επεξεργασία του νερού που προορίζεται προς πόση με διαύγαση με απλή καθίζηση, κροκιδοκαθίζηση, διήθηση μέσω κλινών άμμου, αερισμό και απο-



λύμανση μέσω βρασμού, υπεριώδους ακτινοβολίας, χλωρίου και όζοντος. Για τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας νερού, συνιστώνται συστήματα πολλαπλών φραγμών. Όσον αφορά στο *Cryptosporidium* spp., η εισαγωγή στη Βορειοδυτική Αγγλία μεμβρανών υπερδιήθησης κατά τη διαδικασία επεξεργασίας πόσιμου νερού μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης κρυπτοσποριδίωσης κατά 79%.⁷⁰

Η χλωρίωση είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη διαδικασία απολύμανσης, όμως λόγω της πιθανής ανθεκτικότητας των ωκύστεων του *Cryptosporidium* spp. στο χλώριο και τον κίνδυνο εισαγωγής υψηλών ποσοτήτων χλωρίου στο περιβάλλον, η απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία και όζον φαίνεται να κερδίζουν έδαφος ως πιο φιλικές προς το περιβάλλον επιλογές.⁷¹ Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι εξαιρετικά αποτελεσματική για τις κύστες της *Giardia* και τις ωκύστες του *Cryptosporidium* spp.,⁷² απαιτεί, όμως, σταθερή παροχή ηλεκτρικού ρεύματος, γεγονός αποτρεπτικό για την πλειοψηφία των αναπτυσσομένων χωρών.⁷³

Εξ ίσου απαραίτητο είναι και ένα ασφαλές σύστημα διανομής του πόσιμου νερού, που θα πρέπει να πρέπει να ελέγχεται τακτικά για ύπαρξη διαβρώσεων ή ρήξεων των σωληνώσεων που μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες ή διακοπές παροχής νερού που με τη σειρά τους οδηγούν σε μόλυνση του νερού με διάφορα παθογόνα, μεταξύ των οποίων είναι και τα παράσιτα που μεταδίδονται με το νερό.⁷⁴

Για τον έλεγχο των επιφανειακών νερών και δικτύων, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το *Clostridium perfringens* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης εντεροϊών και παρασιτικών κύστεων και ωκύστεων. Επιπλέον, τα ετερότροφα βακτήρια, τόσο

στους 22°C όσο και στους 37°C, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά παρουσιάζουν ιδιαίτερη χρησιμότητα στην παρακολούθηση των δεικτών επιτυχούς απολύμανσης στα συστήματα ύδρευσης.⁷⁵

Συμπεράσματα

Η παρουσία παρασίτων σε υδάτινα οικοσυστήματα καθιστά επιτακτική την ανάπτυξη στρατηγικών πρόληψης για την ασφάλεια υδάτων και τροφίμων. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η μόλυνση προλαμβάνεται με μέτρα υγιεινής. Όμως, ακόμη και στις χώρες αυτές οι άνθρωποι μπορούν να νοσήσουν από υδατογενή νοσήματα. Αυτό μπορεί να συμβεί επειδή το νερό δεν είναι καθαρό ή δεν τηρούνται κανόνες υγιεινής κατά την ετοιμασία του φαγητού, καθώς και από έλλειψη ατομικής υγιεινής. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, εμφανίζονται υδατογενείς επιδημίες και μάλιστα σε μεγάλη συχνότητα λόγω των πλημμυρών μετά το πέρας της εποχής των βροχών, όμως δεν υπάρχει σύστημα καταγραφής.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν όλο και περισσότερο ευαίσθητες εξετάσεις, δεν είναι ακόμη σε τέτοιο βαθμό ευαίσθητες, ώστε να επιτρέπουν την εύρεση ασυμπτωματικών φορέων των παρασίτων που μεταδίδονται με το νερό. Απαιτούνται προτυποποιημένες μεθοδολογίες στη εργαστηριακή διάγνωση και τις περιβαλλοντικές έρευνες για τη μεγιστοποίηση της επιδημιολογικής επιτήρησης. Ένα καλύτερο σύστημα καταγραφής θα επέτρεπε μια καλύτερη εικόνα των επιπτώσεων των μεταδιδόμενων με νερό νοσημάτων, όπως είναι τα υδατογενή νοσήματα από παράσιτα.



Summary

Water-transmitted parasites causing water-borne outbreaks

Konstantinos Karamalis,¹ Christos Markou,¹ Panagiota Gotzamani,^{2,3} Irini Kosta,¹ Eleftheria Palla,³ Constantine M. Vassalos,^{3*} Evdokia Vassalou¹

¹Department of Public and Community Health, School of Public Health, University of West Attica, Athens, Greece

²MSc in Molecular Biopathology, Department of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

³Micobiology Department, General Hospital of Nea Ionia "Konstantopouleio-Patision", Athens, Greece

*Corresponding author

Recently, water-transmitted parasites have been considered important causes of waterborne-diseases. Parasitic protozoa *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. are the most common aetiological agents of parasite-associated waterborne-diseases. Parasitic protozoa, such as *Entamoeba histolytica* and *Toxoplasma gondii*, and free-living amoebas *Naegleria fowleri* and *Acanthamoeba* spp. living in environmental waters are also water-transmitted causing infections. Water-transmitted parasitic metazoa, such as *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, and *Taenia solium*, have also been associated with waterborne-diseases. Likewise, parasitic metazoan, such as *Schistosoma* spp., *Fasciola hepatica*, using intermediate hosts living in environmental water, in addition to definitive hosts, to complete their life cycle can cause waterborne-diseases. Humans can be infected with water-transmitted parasites through consumption of infectious parasitic forms contained in drinking and recreational water. They can also be infected through consumption of food or vegetables treated with water containing parasitic infectious forms. Low standards in personal hygiene have been associated with the water-transmission of parasites. Interestingly, ritual nasal rinsing or Ganges river ritual bathing have been incriminated in water-borne outbreaks due to the use of water containing free-living amoebas. Parasite-associated water-borne outbreaks are considered a global public health issue. They are more frequently encountered in developing countries that are endemic for parasitic infections. However, they are mostly recorded in developed countries affording advanced diagnostic technologies. Efforts have been made to establish standardised methods for the detection of parasites in environmental water and to implement quality management system to ensure water safety.



Key words

parasites, water-transmission, water-borne outbreaks



Βιβλιογραφία

- Ramirez–Castillo FZ, Loera–Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar–Gonzalez GJ, Harel J, *et al.* Waterborne pathogens: detection and methods. *Pathogens* 2015; 492:307–334 .
- Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks–an update 2004–2010. *Water Res* 2011; 45:6603–6614.
- Li J, Wang Z, Karim MR, Zhang L. Detection of human intestinal protozoan parasites in vegetables and fruits: a review. *Parasit Vectors* 2020; 13:380
- Hajare ST, Betcha A, Sharma RJ, Bhosale SB, Upadhye VJ, Kuddus M, *et al.* *Giardia lamblia* infection and associated risk factors among patients attending Kochore Health Center, Ethiopia. *Infect Dis Now* 2022; 52:311–314.
- Hooshyar H, Rostamkhani P, Arbabi M, Delavari M. *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2019; 12:3–12.
- Cernikova L, Faso C, Hehl AB. Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* 2018; 14:e1007250.
- Adam RD. *Giardia duodenalis*: Biology and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2021; 34:e0002419.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Giardia* and Pets. *Giardia lamblia*. <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/prevention-control-pets.html> .
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pathogen and environment. *Giardia lamblia*. <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html>
- Escobedo AA, Almirall P, Alfonso M, Cimerman S, Chacín–Bonilla L. Sexual transmission of giardiasis: a neglected route of spread? *Acta Trop* 2014; 132:106–111.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Giardiasis NNDSS Summary Report for 2019*. Centers for Disease Control and Prevention, 2019. <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/giardiasis/giardiasis-2019.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Illness and symptoms. *Giardia*. <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/illness.html>.
- Chique C, Hynds PD, Andrade L, Burke L, Morris D, Ryan MP, *et al.* *Cryptosporidium* spp. in groundwater supplies intended for human consumption – A descriptive review of global prevalence, risk factors and knowledge gaps. *Water Res* 2020; 176:115726.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pathogen and environment. *Cryptosporidium* spp. <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/pathogen.html>
- Daraei H, Oliveri Conti G, Sahlabadi F, Thai VN, Gholipour S, Turki H, *et al.* Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in water: a global systematic review and meta–analysis. *Environ Sci Pollut Res Int* 2021; 28: 9498–9507.
- Andrade de Freitas DA, Ribeiro de Paiva AL, Andrade de Carvalho Filho JA, da Silva Pereira Cabral JJ, Soares Rocha FJ. Occurrence of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and other pathogenic intestinal parasites in the Beberibe River in the State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015; 48:220–223.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Illness & Symptoms. *Cryptosporidium*. <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/illness.html#:~:text=Symptoms%20of%20cryptosporidiosis%20generally%20begin,Watery%20diarrhea>
- Diptyanusa A, Sari IP. Treatment of human intestinal cryptosporidiosis: A review of published clinical trials. *In J Parasitol Drugs Drug Resist* 2021; 17:128–138.
- Babuta M, Bhattacharya S, Bhattacharya A. *Entamoeba histolytica* and pathogenesis: A calcium connection. *PLoS Pathog* 2020; 16:e1008214.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Amebiasis. *Entamoeba histolytica*. <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>.
- Kantor M, Abrantes A, Estevez A, Schiller A, Torrent J, Gascon J, *et al.* *Entamoeba histolytica*: Updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018; 2018: 4601420.
- Chou A, Austin RL. *Entamoeba histolytica* infection. *In: StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023
- Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi P–H, De Souza W. The life– cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors* 2020; 13:588.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Toxoplasmosis disease. *Toxoplasmosis*. <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/disease.html>
- Matta SK, Rinkenberger N, Dunay IR, L. Sibley LD. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. *Nat Rev Microbiol* 2021; 19:467–480.
- Abdelbaset AE, Abushahba MFN, Igarashi M. *Toxoplasma gondii* in humans and animals in Japan: An epidemiological overview. *Parasitol Int* 2022; 87: 102533.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Parasites–*Naegleria fowleri*– Primary amebic meningoencephalitis (PAM)–Amebic encephalitis. <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html>.

28. Siddiqui R, Ali IKM, Cope JR, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Trop* 2016; 164:375–394.
29. BBC. Wudhu. *Religion and Ethics*. <https://www.bbc.co.uk/religion/galleries/wudhu/>.
30. Maciver SK, Piñero JE, Lorenzo–Morales J. Is *Naegleria fowleri* an emerging parasite? *Trends Parasitol* 2020; 36:19–28.
31. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Acanthamoeba Infection. https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/gen_info/acanthamoeba.html.
32. Salehi M, Spotin A, Hajizadeh F, Soleimani F, Shokri A. Molecular characterization of *Acanthamoeba* spp. from different sources in Gonabad, Razavi Khorasan, Iran. *Gene Reports* 2022; 27:101573
33. Kalra SK, Sharma P, Shyam K, Tejan N, Ghoshal U. *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. *Exp Parasitol* 2020; 208: 107788
34. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Acanthamoeba Keratitis. *Acanthamoeba*. https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/gen_info/acanthamoeba_keratitis.html.
35. Ben Abdesslem N, Mahjoub A, Seghaier MA, Mahjoub A Romdhani S, Ghorbel M, et al. *Acanthamoeba* keratitis in contact lens wearers in a tertiary center of Tunisia, North Africa. *Ann Med Surg (Lond)* 2021; 70:102834
36. Szentmáry N, Daas L, Shi L, Laurik KL, Lepper S, Milioti G, et al. *Acanthamoeba* keratitis – Clinical signs, differential diagnosis and treatment. *J Cur Ophthalmol* 2019; 31:16–23.
37. Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M. Έλμινθες. *Ιατρική Μικροβιολογία*. Λευκωσία, Κύπρος: Broken Hill Publishers Ltd, 2016, σελ. 788–802.
38. World Health Organization (WHO). Soil–transmitted helminth infections. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>.
39. World Health Organization (WHO). Quantitative microbial risk assessment: Application for water safety management. *World Health Organization (WHO)*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246195/9789241565370-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
40. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Ascariasis. *Ascaris lumbricoides*. <https://www.cdc.gov/dpdx/ascariasis/>.
41. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trichuriasis. *Trichuris trichiura*. <https://www.cdc.gov/dpdx/trichuriasis/>.
42. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis and its impact in neurological disease. *Clin Microbiol Rev* 2020; 33:1–23.
43. Mendlovic F, Fleury A, Flisser A. Zoonotic *Taenia* infections with focus on cysticercosis due to *Taenia solium* in swine and humans. *Res Vet Sci* 2021; 134:69–77.
44. Weka R, Luka P, Ogo N, Weka P. *Taenia solium* cysticercosis in pigs and human: a review of epidemiological data in West Africa (1990–2019). In: Derbel F, Braiki M (eds). Overview in Echinococcosis. IntechOpen; 2020.
45. Gonzales I, Rivera JT, Garcia HH. Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Parasite Immunol* 2016; 38:136–146.
46. García HH, Gonzalez AE, Evans CAW, Gilman RH, Cystercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science. *Lancet* 2003; 362:547–556.
47. Anderson TJC, Enabulele EE. *Schistosoma mansoni*. *Trends Parasitol* 2020; 37:176
48. World Health Organization (WHO). Schistosomiasis and soil–transmitted helminthiasis: treating millions of people, despite the pandemic. <https://www.who.int/news/item/08-12-2021-schistosomiasis-and-soil-transmitted-helminthiasis-treating-millions-of-people-despite-the-pandemic>.
49. González–Miguel J, Becerro–Recio D, Siles–Lucas M. Insights into *Fasciola hepatica* Juveniles: Crossing the Fasciolosis Rubicon. *Trends Parasitol* 2022; 37:176.
50. Mas–Coma S, Bargues MD, Valero MA. Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. *Parasitol* 2018; 145:1665–1699.
51. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fascioliasis. *Fasciola hepatica*. <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>
52. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Water transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Res* 2007; 5:1–38.
53. Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2011–2016. *Water Res* 2017; 114:14–22.
54. Ma JY, Li MY, Qi ZZ, Fu M, Sun TF, Elsheikha HM, et al. Waterborne protozoan outbreaks: An update on the global, regional, and national prevalence from 2017 to 2020 and sources of contamination. *Sci Total Environ* 2022; 806(Pt2):150562.
55. Masangkay FR, Milanez GD, Tsiami A, Hapan FZ, Somsak V, Kotepui M, et al. Waterborne protozoan pathogens in environmental aquatic biofilms: Implications for water quality assessment strategies. *Environ Pollut* 2020; 259:113903
56. Taniguchi K, Yoshida M, Sunagawa T, Tada Y, Okabe N. Imported infectious diseases and surveillance in Japan. *Travel Med Infect Dis* 2008; 6:349–354.
57. Slifko T, Smith H, Rose J. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol* 2000; 30:1379–1393.



58. Cotruvo JA, Durfour A, Rees G, Bartram J, Carr R, Cliver DO, *et al.* *Waterborne zoonoses: identification causes and control*. World Health Organization. London, UK: IWA Publishing, 2004.
59. Lanata CF. Studies of food hygiene and diarrhoeal disease. *Int J Environ Health Res* 2003; 13 (Suppl 1), S175–183
60. Current W, Garcia L. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:325–358.
61. Gertler M, Dürr M, Renner P, Poppert S, Askar M, Breidenbach J, *et al.* Outbreak of *Cryptosporidium hominis* following river flooding in the city of Halle (Saale), Germany, August 2013. *BMC Infect. Dis* 2015; 15:88.
62. Mak JW. Important zoonotic intestinal protozoan parasites in Asia. *Trop Biomed* 2004; 21: 39–50.
63. Adeyemo FE, Singh G, Reddy P, Stenström TA. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: from microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Trop* 2018; 184:15–28.
64. Crannell Z, Castellanos–Gonzalez A, Nair G, Mejia R, White AC, Richards–Kortum R. Multiplexed recombinase polymerase amplification assay to detect intestinal protozoa. *Anal Chem* 2016; 88:1610–1616.
65. Fradette MS, Charette SJ. Working toward improved monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts in water samples: testing alternatives to elution and immunomagnetic separation from USEPA Method 1623.1. *BMC Res Notes* 2022; 15:254.
66. UK Statutory Instruments No 1524. 1999. <https://www.legislation.gov.uk/ukSI/1999/1524/contents/made>
67. Νταράκας Ε, Πεταλά Μ, Τσιρίδης Β. Διεργασίες επεξεργασίας νερού και υγρών αποβλήτων. *Περιβαλλοντική Χημεία και Μηχανική*. Αθήνα: Εκδόσεις Τζιόλα, 2020, σελ. 281–484.
68. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and Control. *Parasites*. <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/prevention-control.html> .
69. Cutler D, Miller G. The role of public health improvements in health advances: the twentieth– century United States. *Demography* 2005; 42:1–22.
70. Goh S, Reacher M, Casemore D, Verlander N, Charlett A, Chalmers R, *et al.* Sporadic cryptosporidiosis decline after membrane filtration of public water supplies, England, 1996–2002. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:251–259.
71. Betancourt WQ. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol* 2004; 126:219–234.
72. Adeyemo FE, Singh G, Reddy P, Bux F, Stenström TA. Efficiency of chlorine and UV in the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater. *PLoS One* 2019; 14:e0216040.
73. Linden KG, Hull N, Speight V. Thinking outside the treatment plant: UV for water distribution system disinfection. *Acc Chem Res* 2019; 52:1226–1233.
74. Ercumen A, Gruber JS, Colford JM. Water distribution system deficiencies and gastrointestinal illness: a systematic review and meta–analysis. *Environ Health Perspect* 2014; 122:651–660
75. World Health Organization (WHO). A global overview of national regulations and standards for drinking water. *World Health Organization*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240023642>

Isolation and study of bioactive properties of secondary metabolites of *Aspergillus fischeri* VO1R, inhibiting pancreatic lipase

Tashkhan Gulyamova, Dilaram Ruzieva, Maftuna Yoldosheva, Gulchekhra Rasulova,
Liliya Abdulmyanova, Iqbol Mukhammedov
Institute of Microbiology, Academy of Sciences Republic of Uzbekistan, Tashkent, 100128 Uzbekistan.

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10203202>



Summary

Pancreatic lipase (PL) inhibition is one of the most extensively researched mechanisms for determining the potential effectiveness of natural products as anti-obesity agents. The article discusses the extraction and bioactivity of secondary metabolites inhibiting PL from the endophyte of *Aspergillus fischeri* VO1R, isolated from *Viola odorata*. A comparison of eight solvents revealed that ethyl acetate and methanol extract the most inhibitory metabolites, amounting to 65 and 73 mg/g of biomass with PL-inhibiting activity of 91,5 and 65%, respectively. In addition, a phytochemical analysis of the metabolite composition revealed that flavonoids are abundant in all extracts with high and moderate inhibitory activity. The DPPH(1,1-diphenyl-2-

picrylhydrazyl) and H₂O₂ assays demonstrated that ethyl acetate has high antioxidant activity with half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of 301 and 246 µg/ml comparable with IC₅₀ of ascorbic acid as the standard. The anti-inflammatory activity of the extract in vitro was 79.3% and exceeded the action of aspirin (74,5%). Therefore, it was concluded that the ethyl acetate extract of *A. fischeri* VO1R contains low-molecular-weight secondary metabolites capable of exhibiting complex PL-inhibitory, antioxidant, and anti-inflammatory effects in vitro and thus can be used to develop a comprehensive obesity treatment.



Key words

obesity, endophytes, secondary metabolites, flavonoids, pancreatic lipase, inhibitory activity, antioxidants, anti-inflammation activity

Corresponding author

Iqbol Mukhammedov
Institute of Microbiology,
Academy of Sciences Republic of Uzbekistan,
Tashkent, 100128 Uzbekistan
E-mail: muxammedov1989@mail.ru

Introduction

Obesity is a common chronic lipid metabolism disorder characterized by excessive adipose tissue accumulation.^{1,2} Clinical obesity affects approximately 300 million of the world's more than 1 billion overweight adults, according to the World Health Organization.^{3,4} Overweight and obesity, on the other hand, are significant risk factors for diabetes, coronary heart disease, hypertension, hyperlipidemia, atherosclerosis, and other chronic diseases.⁴ In this regard, one of the tasks of health policy in many countries is to reverse the current trends of rising percentages of overweight and obese individuals.^{5,6}

A significant difficulty in determining treatment and prevention of the disease is the multifactorial origin of the etiology, which is associated with oxidative stress and chronic inflammation in obese people.^{7,8} Many scientific trials have been conducted to treat obesity.⁹ One of the therapeutic approaches to the prevention of obesity is slowing the absorption of fatty acids by inhibiting lipase in the digestive organs.^{10,11} Pancreatic lipase (triacylglycerolacylhydrolase, PL), which catalyzes the hydrolysis of triacylglycerides in the gastrointestinal tract, is a crucial enzyme for lipid absorption. It is responsible for 50-70% of all dietary fats hydrolysis. Therefore, PL inhi-

bition is one of the most widely studied mechanisms for determining the potential effectiveness of natural products as anti-obesity agents.¹¹

Orlistat, a lipstatin derivative derived from *Streptomyces toxytricini*, is the only PL inhibitor approved by the FDA for treating obesity.^{12,13} At the same time, the drug has many undesirable side effects, such as high blood pressure, insomnia, headache, dry mouth and others.¹⁴ Nevertheless, the success of Orlistat stimulated research to identify new inhibitors of PL obtained from natural sources, such as *Anthemis palaestina* Boiss., *Ononis natrix* L.,¹⁵ and *Sapindus rarak* DC¹⁶ and oolong tea.¹⁷

Endophytes, which live asymptotically inside plant tissues, have been identified as a rich source of unique chemical structures for pharmaceutical, agricultural and other uses.^{18,19} Microbial natural products, particularly secondary metabolites of medicinal plant endophytic fungi, are an alternative to plant sources of enzyme inhibitors.²⁰ Endophytic fungi produce a wide range of bioactive compounds of various chemical classes, such as alkaloids, terpenoids, flavonoids, quinones, steroids, and phenolic acids, which have antimicrobial, anticancer, and immunomodulatory properties as well as inhibitory activity to several enzymes.^{18,21}

Several studies have found that secondary metab-

olites of endophytic fungi can inhibit pancreatic lipase activity.²²⁻²⁶ In particular, Gupta et al.^{23,24} screened the culture filtrates of 70 endophytic fungi isolated from *Aegle marmelos*. A high PL inhibitory potential was detected in isolate 57TBBALM, with an IC₅₀ value of 3.69 mg/ml, comparable to the IC₅₀ of Orlistat (2.73 mg/ml) as a positive control.²³ Sarkar et al.²⁵ evaluated the PL-inhibitory activity of 39 endophytic fungi from medicinal plants of the Andaman Islands. The highest inhibitory potential was exposed in 2 strains isolated from *Citrus lemon* and *Aegle marmelos*, with an activity of 75% and 83%, respectively. At differential extraction of inhibitory metabolites in various solvents, the hexane extract of the endophyte 9CLHTAI from *C. lemon* contains a substance with an activity of 87% and an IC₅₀ of 15.46 µg/ml.

According to the results of gas-liquid chromatography, the metabolite was identified as caryophyllene.²⁵ Seven known and one new compounds, named 13-angeloyloxy-diplosporin, were isolated from endophytic *Phomopsis* sp. 0391 cultured in the presence of a histone deacetylase inhibitor. When assessing their PL-inhibitory activity, it was found for the first time that the compounds cytosporine B and dotiorelon A exhibit significant inhibitory activity with IC₅₀ values at 115 and 275 µg/ml, respectively.^{26,27}

Previously, we isolated several endophytic fungi from various plants in Uzbekistan that can inhibit pancreatic lipase activity.²⁸ *Aspergillus* sp. VO1R was isolated from the root of *Viola odorata*, producing secondary metabolites with at least 70% inhibitory activity during ethyl acetate extraction. The purpose of this study was to determine the nature and bioactivity of secondary metabolites that mediate the strong PL inhibitory effect of *Aspergillus* sp. VO1R extract.

Materials and methods

Cultivation of endophytic strain

Endophyte were grown submergely on a Chapek-Dox medium at 28°C for seven days on an orbital shaker at 120 rpm. The biomass was separated by centrifugation at 6000 rpm and stored at +4°C.

Extraction of secondary metabolites

The isolation of secondary metabolites was carried out according to Hazalin et al.²⁹ 5 g of mycelial mass was homogenized, transferred into a conical flasks with 50 ml of different solvents (ethyl acetate, ethanol, methanol, acetonitrile, hexane, chloroform, butanol, water) and left for a day on a shaker at room temperature. The mixtures were filtered through a paper (Whatman N°1), and Na₂SO₄ was added (40 µg/ml) to

remove the aqueous layer. Then the extracts were evaporated to dryness, and 1 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added. The obtained extracts was used as a stock and stored at +4°C.

PPL inhibition assay

Porcine pancreatic lipase (PPL) activity was quantified according colorimetric assay by the release of p-nitrophenol using p-nitrophenyl palmitate (PNPP) as a substrate.³⁰ 50 mg of lipase (Sigma, 100 U/ml) was suspended in 10 ml in tris-HCl buffer (2.5 mmol, pH 7.4 with 2.5 mmol NaCl). The solution was intensively shaken for 15 min and centrifuged at 4000 rpm for 10 min and the supernatant was recovered. The extracts and Xenical as a positive control were prepared in DMSO with linear concentrations ranging from 1.56–2000 µg/ml and 0.78–1000 µg/mL, respectively. The reaction mixture consisting of 875 µl of buffer, 100 µl of enzyme and 20 µl of extract in various initial concentrations was preincubated for 5 min at 37°C. The reaction was then started by adding 10 µL PNPP as a substrate. After incubation at 30°C for 1 hour, the amount of p-nitrophenol released was measured on a spectrophotometer (SPEKOL 1300) at 405 nm, the percentage of inhibition was calculated by the formula: % inhibition = (Ae-At)/Aex100, where Ae is the optical density of the enzyme control (without an inhibitor), and At is the difference between the optical density of the test sample with and without a substrate.

Phytochemical analysis of extracts of secondary metabolites

Qualitative composition of compounds in extracts of endophytic fungi were determined according to Prabhavathi et al.³¹

The tannins and phenolic substances were determined by adding 2-3 drops of 1% FeCl₃ solution to 2 ml of the extract. In the presence of iron ions, tannins give a black-blue or black-green color, and phenols are purple.

The presence of saponins was established by diluting 1 ml of the extract with 5 ml of hot water (60°C) with intensive shaking for 5 minutes until the formation of a persistent foam. The foam volume was maintained for the next 30 minutes.

The terpenoids were determined by mixing 0.5 ml of the extract with 2 ml chloroform and 3 ml of H₂SO₄ (conc.). The formation between the phases of red-brown staining indicates the presence of terpenoids. 2 ml of the extract was mixed with 4 ml of hexane and shaken to determine the terpenoids. At the same time, the separation of the extract into 2 layers was observed. The upper layer was separated, 4 ml of 10%



ammonia was added, and the lower layer's color was determined. The purple-pink color indicated the presence of anthraquinones.

The presence of cardiac glycosides was determined by mixing 1 ml of the extract with 1 ml of glacial acetic acid and then adding one drop of 3% ferric chloride in methanol. Then H₂SO₄ (conc.) was added along the tube wall, and the color of the lower layer was determined. Blue-green staining indicated the presence of cardiac glycosides.

To determine flavonoids, a few drops of 20% sodium hydroxide were added to 2 ml of each extract, and the formation of an intense yellow color was observed. Next, a few drops of 70% dilute hydrochloric acid was added, and the yellow color disappeared. The formation and disappearance of yellow color indicate the presence of flavonoids in the sample extract.

The alkaloids was determined by their ability to form compounds insoluble in water with complex iodides, which makes it possible to establish the presence of alkaloids even with their insignificant content. A solution of iodine in potassium iodide (Wagner reagent, Bouchard reagent) with alkaloids form brown, hardly soluble in water precipitates. Five drops of the reagent for precipitation of alkaloids are added to 1 ml of the extract. In the presence of alkaloids, a brown precipitate appears.

Molecular taxonomy and phylogenetic identification of endophytic fungi

Genomic DNA extraction of the bioactive isolate of the endophytic fungus *VO1R* was performed by scraping the cultivated mycelium from a 3–4 day old culture using a pre-sterilized inoculation loop and grinding to a very fine powder with liquid nitrogen in a pestle and mortar. Further DNA extraction was performed using the ITS-based genomic DNA purification kit (100). The obtained data were analyzed by alignment in the BLAST program on the international database NCBI.³³

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging assay

To check the antioxidant activity through free radical scavenging by the test samples, the change in optical density of DPPH radicals was monitored.³⁴ Various dilutions of the aqueous extract were prepared (100, 200, 300, 400 and 500 µg/ml). The DPPH solution was prepared in ethanol according to Blois et al.³⁵ To 1 ml of the extract preparations from each dilution, 1 ml of 0.2 mM DPPH was added and incubated in the dark at room temperature for 30 minutes. A mixture of 1 ml of ethanol and 1 ml of DPPH solution (without extract) was used as a control, and ascorbic acid was

used as a standard. The optical density was determined at 517 nm. The formula calculated the percentage of free radical uptake activity: % activity = (Ac – As)/Ac × 100, Where Ac is the absorption of the control; As is the absorption of the extract.

Hydrogen peroxide scavenging (H₂O₂) assay

The activity of fungal extracts to scavenge hydrogen peroxide was estimated by following the method of Govindappa et al.³⁴ A solution of hydrogen peroxide (40 mmol/L) was prepared in phosphate buffer (50 mmol/L, pH 7.4). The concentration of hydrogen peroxide was determined by absorption at 230 nm using a spectrophotometer. Endophytic extracts (100, 200, 300, 400 and 500 µg/ml) in distilled water was added to hydrogen peroxide and absorbance at 230 nm was determined after 10 min against a blank solution containing phosphate buffer without hydrogen peroxide. The percentage of hydrogen peroxide scavenging was calculated as follows: scavenged H₂O₂ (%) = (Ai – At)/Ai × 100, where Ai is the absorbance of control and At is the absorbance of test samples.

In vitro anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity of the extracts was assessed by suppression of albumin denaturation.³⁶ The test sample consisted of an endophyte extract of a selected concentration (100–500 µg/ml) and a 1% aqueous solution of bovine serum albumin (Sigma). The pH of the reaction mixture was adjusted to 6.5 using 1 n HCl and incubated at 37°C for 20 minutes. The incubation mixture was then heated at 57°C for 10 minutes. The denaturation process stopped by cooling the samples. The turbidity of the obtained solutions was measured on a spectrophotometer at a wavelength of 660 nm. Diclofenac sodium or aspirin in a concentration similar to the experimental extract was used as a standard. Inhibition of protein denaturation (X) was expressed as a percentage and calculated by the formula: X=(A0 – At)/A0 × 100 where A0 – optical control density; At – optical density of the test sample.

All experiments were carried out in triplicate.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by carrying out Student's t-test. Values were expressed as mean ± SD. Experiments were conducted in triplicates and the replicates were considered for calculating mean.

Results and discussion

Aspergillus sp.VO1R is the most bioactive endophyte

isolate with high inhibitory activity against pancreatic lipase as identified by subsequent analysis of the ITS using the BLAST program in the international database NCBI. The isolate was found to be 99.12% identical to *Aspergillus fischeri* (MN121343.1). These data were compared with the database, the phylogenetic tree of the stamm was formed by "neighbor-joining" method in the MEGA program, and it was registered in the NCBI data under the name *Aspergillus fischeri* VO1R. (Fig.1).

Isolation and purification of biologically active compounds from endophytes is an essential process determining the suitability of the endophyte for the isolation of desired objects. Various polar and non-polar solvents are used to extract secondary metabolites, depending on the nature of the extracted compound.³⁷ Since endophytic fungi produce a variety of bioactive compounds of various chemical classes, including alkaloids, terpenoids, flavonoids, anthraquinones, steroids, phenolic acids, polar and nonpolar solvents are used for extraction separately or in combination based on the solubility of the target metabolite. Ethyl acetate, methanol, dichloromethane, hexane, and ethanol are the most commonly used solvents to extract metabolites from culture broth. When the nature and polarity of the active compound are unknown, it is customary to screen solvents to select the conditions for extracting the sub-

stance with the highest desired bioactivity. The most common technique involves liquid-liquid extraction using an organic solvent from liquid media of a fungal culture or mycelial biomass. Many researchers use methanol, which often results in the extraction of large amounts of hydrophilic substances such as sugars, and ethyl acetate and acetone are lipophilic. However, they can also extract a wide range of metabolites.³⁸

The degree of secondary metabolites extraction and their inhibitory activity level during the extraction of *A. fischeri* VO1R biomass was studied using eight commonly used solvents - ethyl acetate, methanol, ethanol, acetonitrile, water, hexane, butanol and chloroform.

As seen from the data presented in Table 1, the total yield of secondary metabolites significantly depends on the solvent used. It ranges from 19 to 73 mg/g of wet mycelium, and the level of inhibitory activity of extracts varies from 21% to 91,5%. At the same time, extraction with ethanol and acetonitrile does not lead to the extraction of inhibitory compounds. The most significant number of inhibitory secondary metabolites about 65 ± 0.21 and 73 ± 0.33 mg/g of wet biomass with an activity of $91,5 \pm 0.31$ and $65 \pm 0.25\%$, was extracted with ethyl acetate and methanol, respectively. It should be noted that during the extraction of *Myristica fragrans* with petroleum

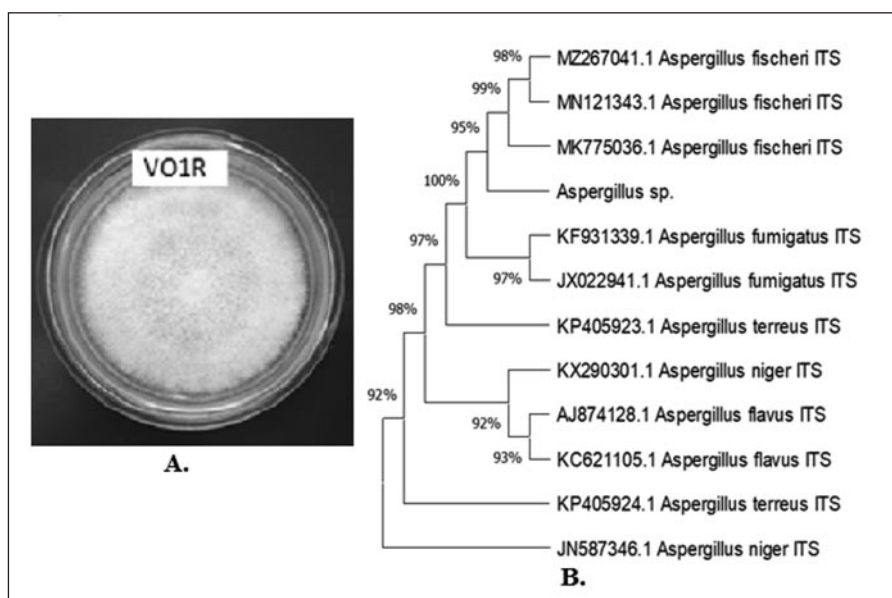


Figure 1 Macrocolony of *Aspergillus fischeri* VO1R (A), Phylogenetic tree showing rDNA based (ITS region) molecular taxonomy and phylogenetic analysis of bioactive endophyte (B)

Table 1 Yield and inhibitory activity of *A. fischeri VOIR* extracts during extraction with various solvents.

№	Solvents	<i>A.fischeri VOIR</i>	
		Extract mg/g	Inhibition %
1	ethyl acetate	65±0.21	91,5±0.31
2	methanol	73±0.33	65±0.25
3	ethanol	26±0.19	–
4	acetonitrile	25±0.29	–
5	hexan	49±0.35	36,6±0.28
6	butanol	36,6±0.39	47,8±0.30
7	water	19±0.31	22,6±0.27
8	chloroform	29±0.26	21±0.29

ether, chloroform, and ethanol, significant PPL inhibitory (66,24%) activity in vitro compared to other extracts was also shown by ethanol extract at a concentration of 100 µg/ml.³⁹

Thus, almost all used solvents, except for ethanol and acetonitrile, extract inhibitory metabolites with varied activity. However, given the nature of the solvents and the degree of their polarity, it is evident that the composition of the metabolites in these extracts is different. Preliminary phytochemical analysis of extracts in various solvents showed that endophytic *A. fischeri VOIR* produces eight chemical compounds, including alkaloids, flavonoids, terpenoids, saponins, tannins, cardiac glycosides, and anthraquinones. All these chemical compounds have different bioactivity and medicinal properties. Nevertheless, in all extracts with high and moderate PL-inhibitory activity, mainly flavonoids are detected. In particular, an ethyl acetate extract with inhibitory activity of 91,5±0.31 %, along with flavonoids contained an insignificant amount of alkaloids and terpenoids. In hexane, butanol and aqueous extracts with activity 36,6±0.28%, 47,8±0.30% and 22,6±0.27%, flavonoids also prevailed. The methanol extract with inhibitory activity of 65% contained terpenoids, glycosides and antraquinones, but not flavonoids. (Table 2).

According to obtained, the inhibitory activity of *A. fischeri VOIR* extracts are mainly associated with flavonoids and terpenoids. It is worth noting that flavonoids and terpenes are the main chemical components responsible for reducing lipid peroxidation.⁴⁰

It is known that obesity, which is a feature of metabolic syndrome, was associated with chronic inflammation in obese people.⁷ Due to the prominent role of

oxidative stress in the pathogenesis of obesity, there is a growing interest in weakening the pro-oxidant state in obesity since antioxidants contribute to the normalization of the inflammatory response. Acting through inflammatory cascades such as PKC and NF-kb, antioxidants reduce the levels of various inflammatory mediators, including TNF-a, IL-1b, VCAM-1, and IL-6 (182-184). In this regard, antioxidant and anti-inflammatory action agents are of therapeutic importance in the development of anti-obesity drugs. Endophytic fungi are an abundant and reliable source of new antioxidant compounds, evidenced by a sufficient number of reports on the antioxidant properties of endophytic metabolites.^{41,43} For example, Yadav et al. demonstrated that metabolites produced by endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* can be a potential source of new natural antioxidant compounds using three methods of determining antioxidant activity.⁴⁴

Nakai et al.¹⁸ used the DPPH radical removal method to demonstrate the antioxidant activity of ethyl acetate extracts of 13 isolates of endophytic fungi. The most potent antioxidant capacity was found in *A. minisclerotigenes* AKF1 and *A. oryzae* DK7 isolates, with of *Aspergillus sp. VOIR* 0 values of 142.96 µg/ml and 145.01 µg/ml, respectively.

Gautam et al. discovered that ethyl acetate extracts the most significant amount of total phenols and flavonoids from the endophytic *Nigrospora sphaerica* isolated from the pantropical weed *Euphorbia hirta* L., positively correlating with antioxidant activity. Simultaneously, compounds with inhibitory activity similar to quercetin were discovered in the phenolic compound composition.⁴⁵

In vitro antioxidant activity of an ethyl acetate ex-

Table 2 Phytochemical screening of PL inhibitory extracts of *A. fischeri* VO1R.

№	Phyto-Constituents	Solvents					
		91,5%	65%	36,6%	47,8%	22,6%	21%
		ethylacetate	methanol	hexane	butanol	water	chloroform
1	alkaloids	+	-	-	-	-	-
2	flavonoids	++	-	++	++	++	-
3	terpenoids	+	++	-	-	-	-
4	saponines	-	-	+	-	-	+
5	tannins	-	-	-	-	+	-
6	phenols	-	-	-	-	+	-
7	glycosides	-	+	-	+	-	-
8	antraquinones	-	+	-	-	+	+

"+" –indicates the presence of a substance, "-" –indicates the absence of a substance

Table 3 DPPH antiradical activity of ethyl acetate extract of *A. fischeri* VO1R.

№	Concentration µg/ml	antiradical activity (%)			
		Ascorbic acid,%	IC ₅₀ µg/ml	Extract, %	IC ₅₀ µg/ml
1	100	21,5±0.11	288	15,6±0.27	301
2	200	33,4±0.15		29,7±0.29	
3	300	44,2±0.09		45,3±0.15	
4	400	86±0.11		64,1±0.39	
5	500	97,5±0.16		81,3±0.31	

tract of *A. fischeri* VO1R containing flavonoids with significant PL-inhibitory effect was determined using two free radical models – DPPH and H₂O₂.

The DPPH method measured antioxidant activity by changing the color of DPPH from purple to yellow. At concentrations ranging from 100 to 500 µg/ml, the activity of free radical absorption by ethyl acetate extract increased from 15% to a maximum of 81.3% at

500 µg/ml (Table 3). At the same time, the antiradical activity of the extract 300 µg/ml increased slightly with concentration, reaching 45.3±0.15% compared to 44.2±0.09% for the standard.

In general, antioxidant activity increases with metabolite concentration. The calculated IC₅₀ value of ethyl acetate extract was 301 µg/ml, whereas ascorbic acid had an IC₅₀ value of 288 µg/ml.



When determining antioxidant activity by H₂O₂, the same correlation dependence on extract concentration was observed (Table 4).

This assay shows that the activity of the extract increases from 15.8±0.41% at 100 µg/ml to 78.4±0.33% at 500 µg/ml.

However, the antioxidant activity of ethyl acetate extract is higher than that of ascorbic acid at all concentrations used in this test, with a maximum of 70.5±0.19%. The high antioxidant activity of ethyl acetate extract is confirmed by a significantly lower IC₅₀ value of 246 µg/ml compared to the standard's IC₅₀ of 300 µg/ml.

This study's findings are consistent with previous research on the antioxidant activity of endophytic

fungi. Thus, the total phenol content (TPC) and total flavonoids content (TFC) were highest in the ethyl acetate crude extract of *Nigrospora sphaerica* fermented in potato-dextrose broth (77.74 = 0.046 mg/g and 230.59 = 2.0 mg/g, respectively), with the highest antioxidant activity of 96.80%.⁴⁵ Extracts of *A. nidulans* and *A. flavus* isolated from *Ocimum basilicum* also demonstrated potential antioxidant activity, with IC₅₀ of 166.3 g/ml and 347.1 g/ml, respectively, using DPPG.⁴⁶

The anti-inflammatory activity of *A. fischeri* VO1R extract was assessed using an albumin denaturation assay and aspirine as a positive control. The maximum inhibition of albumin denaturation was observed at 500 g/ml aspirin concentration, and the degree of in-

Table 4 Antioxidant activity of ethyl acetate extract of *A. fischeri* VO1R by H₂O₂ absorption assay.

№	Concentration µg/ml	H ₂ O ₂ absorption, %			
		Ascorbic acid, %	IC ₅₀ µg/ml	Extract, %	IC ₅₀ µg/ml
1	100	10,4±0.16	300	15,8±0.41	246
2	200	25,8±0.16		30,4±0.37	
3	300	30,4±0.20		45,5±0.39	
4	400	45,2±0.11		61,5±0.29	
5	500	70,5±0.19		78,4±0.33	

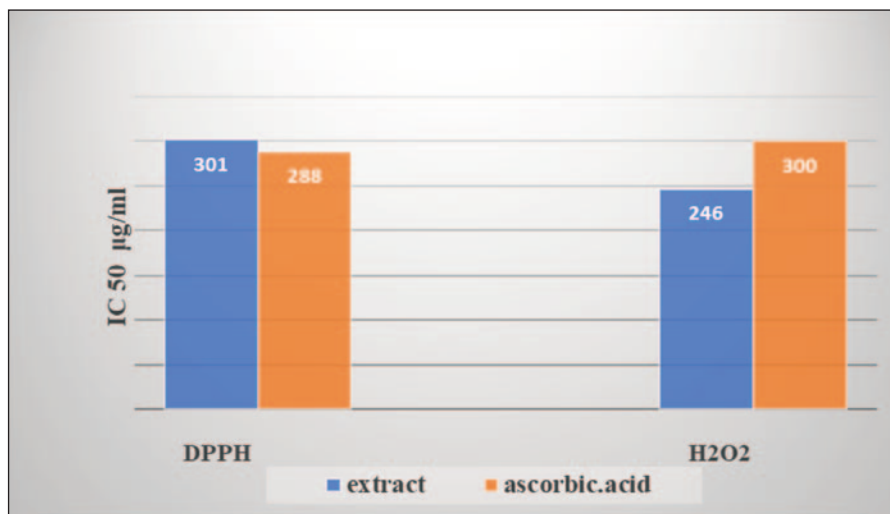


Figure 2 IC₅₀ values of antioxidant activity of *A. fischeri* VO1R extract and ascorbic acid.

Table 5 Anti-inflammatory activity of *A.fischeri* VO1R by albumin denaturation assay.

№	Concentration µg/ml	Aspirine, %	Inhibition ,%
1	100	25,8±0.20	31,2±0.27
2	200	36,4±0.15	40,2±0.41
3	300	49,2±0.18	55,2±0.36
4	400	60,2±0.24	60,5±0.34
5	500	74,5±0.1	79,3±0.39

hibition by the extract at the same concentration exceeded the positive control by 79.3±0.39%. It could be a preliminary indication of the anti-inflammatory properties of *A.fischeri* VO1R ethyl acetate extract.

Conclusion

This study shows that endophytes associated with *V.odorata* have tremendous bioactive potential as PL inhibitors. These endophytic extracts can be studied to develop potential drugs for the treatment of obesity by isolating potent molecules. The most active isolate *Aspergillus* sp.VOR1 was identified as *Aspergillus fischeri* VO1R.

According to the results of the experiments, the ethyl acetate extract of *A.fischeri* VO1R contains low

molecular weight secondary metabolites capable of exhibiting a complex PL-inhibitory, antioxidant, and anti-inflammatory effect in vitro. Given that the ethyl acetate extract contains flavonoids, terpenoids, and alkaloids, more research is needed to determine whether the extract's activities are the result of a synergistic effect of these substances or of a single compound with the properties of a multitargeted ligand.

As a result of the data presented, it is possible to speculate that *A.fischeri* VO1R isolated from *Viola odorata* can be used to develop a new therapeutic agent with multiple actions, allowing for an integrated approach to the treatment of obesity.

Conflict to interest

The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that could influence the research reported in this article.



Περίληψη

Isolation and study of bioactive properties of secondary metabolites of *Aspergillus fischeri* VO1R, inhibiting pancreatic lipase

Tashkhan Gulyamova, Dilaram Ruzieva, Maftuna Yoldosheva, Gulchekhira Rasulova, Liliya Abdulmyanova, Iqbol Mukhammedov*

Institute of Microbiology, Academy of Sciences Republic of Uzbekistan, Tashkent, 100128 Uzbekistan

*Corresponding author

Η αναστολή της παγκρεατικής λιπάσης (PL) είναι ένας από τους πιο εκτενώς ερευνημένους μηχανισμούς για τον προσδιορισμό της πιθανής αποτελεσματικότητας των φυσικών προϊόντων ως παραγόντων κατά της παχυσαρκίας. Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει την εκχύλιση και τη βιοδραστικότητα δευτερογενών μεταβολιτών που αναστέλλουν την PL από το ενδόφυτο του *Aspergillus fischeri* VO1R, που απομονώθηκε από το *Viola odorata*. Μια σύγκριση οκτώ διαλυτών αποκάλυψε ότι ο οξικός αιθυλεστέρας και η μεθανόλη αποτελούν τους περισσότερο ανασταλτικούς μεταβολίτες, εκχυλιζόμενοι σε 65 και 73 mg/g βιομάζας με ανασταλτική δράση PL 91,5 και 65%, αντίστοιχα. Επιπλέον, μια φυτοχημική ανάλυση της σύνθεσης του μεταβολίτη αποκάλυψε ότι τα φλαβονοειδή είναι άφθονα σε όλα τα εκχυλίσματα με υψηλή και μέτρια ανασταλτική δράση. Οι αναλύσεις DPPH (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλιδραζόλιο) και H₂O₂ έδειξαν ότι ο οξικός αιθυλεστέρας έχει υψηλή αντιοξειδωτική δράση με τιμές μισής μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀) 301 και 246 μg/ml συγκρίσιμες με το IC₅₀ ασκορβικού οξέος ως πρότυπο. Η αντιφλεγμονώδης δράση του εκχυλίσματος in vitro ήταν 79,3% και ξεπέρασε τη δράση της ασπιρίνης (74,5%). Ως εκ τούτου, συνήχθη το συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του *A. fischeri* VO1R περιέχει δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους ικανούς να επιδεικνύουν σύνθετες ανασταλτικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις in vitro και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης θεραπείας της παχυσαρκίας.



Λέξεις κλειδιά

παχυσαρκία, ενδόφυτα, δευτερογενείς μεταβολίτες, φλαβονοειδή, παγκρεατική λιπάση, ανασταλτική δράση, αντιοξειδωτικά, αντιφλεγμονώδη δράση

References

1. Yanovski SZ, Yanovski JA. Obesity. *N Engl J Med* 2002; 346:591-602.
2. Avenell A, Broom J, Brown TJ, Poobalan A, Aucott L, Stearns SC, *et al.* Systematic review of the long-term effects and economic consequences of treatments for obesity and implications for health improvement. *Health Technol Assess* 2004; 8:1-182.
3. Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:(2583-2589).
4. Aljaadi AM, Alharbi M. Overweight and Obesity Among Saudi Children: Prevalence, Lifestyle Factors, and Health Impacts. *Handbook of Healthcare in the Arab World*, 2021; 1155–1179.
5. Multiple Regression and the Global Health Observatory Data (2015): Female Life Expectancy, Health Expenditures, and Legislation.
6. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity. Overweight, Obesity, and Health Risk. *Arch Intern Med* 2000; 160:898-904.
7. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci* 2017; 13:851-863.
8. Tun S, Spainhower CJ, Cottrill CL, Lakhani HV, Pillai SS, Dilip A, *et al.* Therapeutic Efficacy of Antioxidants in Ameliorating Obesity Phenotype and Associated Comorbidities. *Front Pharmacol* 2020; 11:1234.
9. Achkasov EE, Razina AO, Runenko SD. [Pathogenetically targeted method for conservative treatment of obesity and overweight correction]. *Klin Med (Mosk)* 2016; 94:509-517.
10. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* 2012; 2:303-336.
11. Drent ML, van der Veen EA. Lipase inhibition: a novel concept in the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993; 17:241-244.
12. Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* 1987; 40:1081-1085.
13. Orlistat (Xenical). (2008). Encyclopedia of Obesity. <https://doi.org/10.4135/9781412963862.n357>.
14. Filippatos TD, Derdemezis CS, Gazi IF, Nakou ES, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Orlistat-associated adverse effects and drug interactions: a critical review. *Drug Saf* 2008; 31:53-65.
15. Seyedan A, Alshawsh MA, Alshagga MA, Koosha S, Mohamed Z. Medicinal Plants and Their Inhibitory Activities against Pancreatic Lipase: A Review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015:973143.
16. Meshram V, Uppal K, Gupta M. Endophytes: A Gold Mine of Enzyme Inhibitors. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*, Springer 2018; 61–92.
17. Bustanji Y, Al-Masri IM, Mohammad M, Hudaib M, Tawaha K, Tarazi H, *et al.* Pancreatic lipase inhibition activity of trilactone terpenes of *Ginkgo biloba*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2011; 26:453-459.
18. Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, Shibata H, *et al.* Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J Agric Food Chem* 2005; 53:4593-4598.
19. Kondrasheva KV, Egamberdiev FB, Suyarova RA, Ruzieva DM, Nasmetova SM, Abdulmyanova LA, *et al.* Production of indole-3-acetic acid by endophytic fungi of halophyte plants under salt stress. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 2022; 1068:012040.
20. Morikawa T, Xie Y, Asao Y, Okamoto M, Yamashita C, Muraoka O, *et al.* Oleanane-type triterpene oligoglycosides with pancreatic lipase inhibitory activity from the pericarps of *Sapindus rarak*. *Phytochemistry* 2009; 70:1166-1172.
21. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers* 2010; 41:1–16.
22. Slama HB, Chenari Bouket A, Alenezi FN, Pourhassan Z, Golińska P, Oszako T, *et al.* Potentials of Endophytic Fungi in the Biosynthesis of Versatile Secondary Metabolites and Enzymes. *Forests* 2021; 12:1784.
23. Gupta M, Saxena S, Goyal D. Potential pancreatic lipase inhibitory activity of an endophytic *Penicillium* species. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2015; 30:15-21.
24. Gupta M, Saxena S, Goyal D. Lipase inhibitory activity of endophytic fungal species of *Aegle marmelos*: a bioresource for potential pancreatic lipase inhibitors. *Symbiosis* 2014; 64:149–157.
25. Sarkar SJ, Dioundi D, Gupta M. Endophytic pestalotiopsis species from andaman islands: a potential pancreatic lipase inhibitor. *Asian J Pharm Clin Res* 2017; 10:82.
26. Patil MP, Patil RH. Data on the inhibitory effect of endophytic fungi of traditional medicinal plants against pancreatic lipase (PL). *Data Brief* 2019; 27:104797.
27. Katoch M, Paul A, Singh G, Sridhar SNC. Fungal endophytes associated with *Viola odorata* Linn. as bioresource for pancreatic lipase inhibitors. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17:385.
28. Gulyamova TG, Ruzieva DM, Yoldosheva MM, Rasulova GA, Kondrasheva KV. Screening of Pancreatic Lipase Inhibitors of Endophytic Fungi of Medicinal Plants in Uzbekistan. *Biosci Biotechnol Res Asia* 2022; 19:1037–1044.



29. Hazalin NA, Ramasamy K, Lim SM, Wahab IA, Cole AL, Abdul Majeed AB. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complement Altern Med* 2009; 9:46
30. Bustanji Y, Al-Masri IM, Mohammad M, Hudaib M, Tawaha K, Tarazi H, *et al.* Pancreatic lipase inhibition activity of trilactone terpenes of Ginkgo biloba. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2010; 26:453–459.
31. Prabhavathi RM, Prasad MP, Jayaramu M. Studies on Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of Cissus quadrangularis. *Adv Appl Sci Res* 2016; 7:11-17.
32. Litvinov MA. Determinant of microscopic soil fungi 1967; pp.284-290.
33. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, Volume 4, Issue 4, Jul 1987, Pages 406–425, Published: 01 July 1987
34. Govindappa M, Channabasava R, Kumar KRS, Pushpalatha KC. Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Crude Endophytes Extracts of *Tabebuia argentea* & *Bursera* K. Sch. *Am J Plant Sci* 2013; 4:1641–1652.
35. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 1958; 181:1199–1200.
36. Sakat SS, Juvekar AR, Gambhire MN. (2010). In vitro antioxidant and antiinflammatory activity of methanol extract of oxalis corniculata Linn. *Int J Pharm Pharmacol Sci* 2010; 2:146-155.
37. Madhusudhan M, Bharathi T, Prakash H. Isolation and Purification of Bioactive Metabolites from Fungal Endophytes—A Review. *Curr Biochem Eng* 2015; 2:111–117.
38. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2011; 8:1-10.
39. Vangoori Y, Dakshinamoorthi A, Kavimani S. Prominent Pancreatic Lipase Inhibition and Free Radical Scavenging Activity of a Myristica fragrans Ethanol Extract in vitro. Potential Role in Obesity Treatment. *Maedica (Bucur)* 2019; 14:254-259.
40. Gutiérrez-del-Río I, López-Ibáñez S, Magadán-Corpas P, Fernández-Calleja L, Pérez-Valero Á, Tuñón-Granda M, *et al.* Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation. *Antioxidants* 2021; 10:1264.
41. Kuralarasi R, Sundar M, Lingakumar K. Endophytic Fungi: As A Pool Of Secondary Metabolites. *Int J Adv Res* 2018; 6:248–256.
42. Khalil DMA, El-Zayat SA, El-Sayed MA. Phytochemical Screening and Antioxidant Potential of Endophytic Fungi Isolated From Hibiscus sabdariffa. *J Appl Biotechnol Rep* 2020; 7:116-124.
43. Habisukan UH, Elfita Widjajanti H, Setiawan A, Kurniawati AR. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated from Syzygium aqueum Leaves. *J Phys Conf Ser* 2021; 1751:012059.
44. Yadav M, Yadav A, Yadav JP. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from Eugenia jambolana Lam. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 7: S256–S261.
45. Gautam VS, Singh A, Kumari P, Nishad JH, Kumar J, Yadav M, *et al.* Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of an endophytic fungus *Nigrospora sphaerica* (EHL2), inhabiting the medicinal plant *Euphorbia hirta* (dudhi) L. *Arch Microbiol* 2022; 204:140
46. Sharaf MH, Abdelaziz AM, Kalaba MH, Radwan AA, Hashem AH. Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic Activities and Phytochemical Analysis of Fungal Endophytes Isolated from *Ocimum Basilicum*. *Appl Biochem Biotechnol* 2021; 194:1271–1289.

Bacterial Aetiologic Profile and Antibiotic Response Patterns of Lower Respiratory Tract Infection (LRTI) among HIV/AIDS Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) in Uyo, South-south Nigeria

Rachel Sylvester Okon¹, Ifeanyi Onwuezobe², Ekom Ndifreke Edem³, Unwana Ezekiel Akereuke⁴, Samuel Bonne⁵, Ene Omenyi Bawonda⁴

¹Department of Biological Sciences, Akwa Ibom State Polytechnic, Ikot Osurua, Ikot Ekpene, Nigeria,

²Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Health Sciences, University of Uyo, Uyo, Nigeria,

³Kelina Hospital, Lagos, Nigeria, ⁴Department of Medical Microbiology and Parasitology, Faculty of Basic Clinical Sciences, University of Uyo, Nigeria, ⁵Faculty of Medicine, McGill University, Canada.

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10203217>



Summary

Highly active antiretroviral therapy (HAART) decreases HIV viral load which in turn increases CD4 counts and that is expected to reduce the risk of opportunistic infections like lower respiratory tract infection (LRTI). The present study therefore assessed the bacterial aetiologic profile and their antibiotic response patterns of lower respiratory tract infection (LRTI) among HIV patients on highly active antiretroviral therapy (HAART) in Uyo, Nigeria. This study included 61 people living with HIV/AIDS (PLWHA) on HAART. Hospital records, standardized questionnaires

were administered and sputum specimen free from salivary contamination was collected from the participants. The sputum samples were subjected to laboratory analysis of the sputum samples including macroscopy, microscopy, culture and biochemical analysis on isolates were done. Antibiotic susceptibility testing on isolates using conventional bacteriologic methods was also performed. According to our results, of the 61 samples, 24 (39.3%) yielded bacterial growth comprising of *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Rothia kristinae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus* spp. Prevalence of LRTI was statistically associated ($p < 0.05$) with CD4 counts, viral load and age, but not statistically associated ($p > 0.05$) with sex, occupation, marital status and educational level of patient. In both Gram positive and Gram negative isolates, imipenem showed high sensitivity while trimethoprim-sulfamethoxazole showed high level of resistance. In conclusion, the present study confirms increased CD4 count and reduced viral load to be the best intervention for the prevention of opportunistic infections like LRTI in PLWHA on HAART.



Key words

lower respiratory tract infections (LRTIs), antiretroviral therapy (ART), people living with HIV/AIDS (PLWHA), CD4, Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome (HIV/AIDS)

Corresponding author

Ekom Ndifreke Edem
Kelina Hospital,
Lagos, Nigeria
Email: ekomedem@gmail.com

Introduction

HIV is a major contributor to the global burden of disease.¹ Despite the gains made in fighting Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome (HIV/AIDS), the epidemic still remains a major cause of morbidity and mortality worldwide, particularly in sub-Saharan Africa due to co-infection with opportunistic infections.² As at the end of 2019, about 38 million people around the world were thought to be living with HIV, 25.6 million of these were in sub-Saharan Africa.³ Nigeria has the second highest number of people living with HIV/AIDS in the world after South Africa.³ In 2021, a survey conducted in Uyo by Akwa Ibom AIDS Indicator Survey (AKAIS) had HIV prevalence to be 4.8% and recorded 13,000 new cases of HIV infections annually in Akwa Ibom.⁴ The immune system, through white blood cells helps the body fight infections and other diseases.⁵ HIV eliminates the white blood cell lymphocyte subpop-

ulations of CD4 T-cells and B-cells⁶ thereby making the body lose its ability to defend itself against common pathogens. When HIV infection is untreated, majority of patients experience immune system deficits that lead to deadly opportunistic infections, like lower respiratory tract infections (LRTIs).^{7,8} However, initiation of antiretroviral therapy (ART) significantly reduces the incidence of opportunistic infections including LRTIs among PLWHA,⁹ by increasing the CD4 counts to a normal range.¹⁰ Clinicians use CD4 cells to monitor the effectiveness of the antiretroviral treatment (ART),¹¹ and a decline in CD4 cells can lead to opportunistic infections, which in turn leads to mortality.¹² The respiratory system is the most frequently affected organ system by HIV infection.¹³ LRTI are 25-fold more common in people with AIDS than in the general population, occurring in about 90 cases per 1,000 person-years.¹⁴ HIV infection causes alteration in several lines of host defenses in the respiratory tract that contribute to an increased risk for pulmonary in-

fection.¹⁵ These alterations include abnormalities in mucociliary function and soluble defense molecules, such as defensins within respiratory secretions. Within the lung parenchyma, innate and adaptive immune responses to pathogens may be impaired.¹⁶ For example, alveolar macrophages from HIV infected individuals have been shown to be deficient in pathogen recognition. Besides, HIV also results in chronic stimulation and activation of inflammatory cells within the alveolar space.¹⁷ The lower respiratory tract infections are the most frequent respiratory diseases among HIV infected patients and are frequently the first clinical manifestations of the HIV infections.¹⁸ Diverse types of organisms including Gram positive and Gram negative bacteria are responsible for LRTIs in people living with HIV (PLWHA) which include *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. tuberculosis* and *Acinetobacter spp.*¹⁹ Diagnosing LRTI could be done using GeneXpert MTB/RIF²⁰ or sputum microscopy, culture and sensitivity (MCS).²¹ The right diagnosis or identification of pathogens causing LRTI and their antimicrobial susceptibility tests provide great guidance to clinicians for better management of the HIV patient. There is currently no study from this region that assessed LRTI prevalence in PLWHA on HAART. Therefore, this study bridged that gap by analyzing sputum samples from HIV patients on HAART with the view to identify LRTI causing organisms present, and test for their susceptibility and resistance pattern to available antibiotics in use in the hospital and the region.

Materials and Methods

Study Size, Population and Area

A total of 61 people living with HIV/AIDS on antiretroviral therapy (ART) attending HIV clinics at University of Uyo Teaching Hospital (UUTH) and St Luke Hospital Anua (SLHA), within Uyo metropolis from the period of November to December, 2021, were recruited using simple random sampling technique (balloting). Uyo is the capital of Akwa Ibom State, South-Southern part of Nigeria. Uyo lies between latitude 5.50N and 6.00N and longitude 6.00E and 6.50E of Greenwich Meridian.

Inclusion Criteria

Eligible individuals for this study were consenting HIV infected patients on antiretroviral therapy (ART) that provided on-request sputum samples for suspected lower respiratory tract infection.

Exclusion Criteria

Exclusion criteria included HIV negative patients, HIV positive patients not on ART and those on antibiotic usage within 1 week prior to clinic visit.

Method of Data Collection

The 61 selected participants were informed of the study's objectives, methods, and relevance. Hospital records and standardized questionnaires presented by interviewers were used to collect data. The questionnaires were administered to the respondents by trained health-care providers and were appropriately completed with close monitoring/guidance. Each responder in the study group had their most recent CD4 counts (within the previous six months) taken from their folders and entered into the questionnaires.

Collection and Laboratory Analysis of Samples

An early morning or spot sputum specimen of required quality was aseptically collected from each participant using sterile containers.²² These samples were promptly transported and analyzed in the laboratory within 4 hours. The samples were aseptically inoculated on Sheep blood agar (SBA), Mac Conkey agar and chocolate agar plates by direct inoculation using a sterile loop. The inoculated SBA plates were then incubated aerobically at 35°C for 24hours, while the chocolate agar plates were incubated in an anaerobic jar at 37°C also for 24hours. After incubation, the plates were properly identified following morphological characteristics; growth of the pathogens, sizes and shapes of colonies, odour, pigmentation, haemolysis and swarming movement, Gram reaction and biochemical tests included citrate, oxidase, indole, coagulase, catalase, methyl red and Voges-Proskauer test.²³ *Streptococcus sp* was properly identified using automated method with the VITEK 2 system (BioMérieux, France) (figure 1).

Antibiotic Sensitivity Screening

Mueller-Hinton agar plates were inoculated with 0.5 McFarland preparation of the inoculum using the spread plate technique. Standard antibiotic discs were placed on the surface of the inoculated agar plates using sterile forceps. The plates were then incubated at 37°C for 24 hours. After 24 hours, the plates were observed for the zones of inhibition and interpreted as 'Resistant', 'Intermediate/Moderately susceptible', or 'Susceptible' according to the standard chart using the Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines.²⁴

Ethical Consideration

Ethical approval was obtained from the medical re-



search and ethics committee of UUTH, Uyo and letter of introduction was sent to St. Luke's Hospital, Anua, Uyo, Akwa Ibom State. Informed consent form was issued to the eligible subjects and only subjects that gave informed consent were included in the study.

Statistical Analysis

All the gathered data from the participants were entered into Microsoft Excel and analysed using SPSS Statistics software package (version 22.0). Descriptive statistics was used for data summarization and presentation. Data obtained was analyzed statistically using Chi-square test. P values <0.05 was considered significant.

Results

Socio-demographic Profile of Participants

In the 61 sputum samples submitted, 24 (39.3%) were culture positive while 37 (60.7%) were culture negative. Bacterial occurrence was higher in females (18: 40%) than in males (6: 37.5%) (Table 1). The highest bacterial occurrence was among the age range 31-45 years with 13 (59.1%), and unemployed participants were also observed to have the highest bacterial occurrence of 11 (55%). Participants that were single had the highest culture positivity rate of 42.9%, while those married had 31.6% rate (Table 1). Those with primary level of education had the highest prevalence (5: 45.5%), while those with secondary education had the lowest (7: 33.3%) (Table 1). Prevalence of LRTI was

statistically not associated ($p > 0.05$) with sex, occupation, marital status and educational level of patient, but was statistically associated ($p < 0.05$) with age of patient (Table 1).

Distribution of Bacterial Isolates from Sputum Samples

Out of the 61 samples processed, a total of 24 (39.3%) (Figure 2) samples yielded clinically significant pathogens comprising of 4 different Gram-positive organisms [*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Rothia kristinae* (formerly *Kocuria kristinae*), *Staphylococcus aureus*] and 3 Gram-negative organisms (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp*). St. Luke Hospital, Anua (SLHA) had the highest number of bacterial isolates with 79.2% occurrence rate, while University of Uyo Teaching Hospital (UUTH) had 20.8% occurrence rate (Table 2).

Distribution of Bacterial growth according to CD4 count and Viral Load

Among different CD4 cell count categories, rate of LRTI was higher among those with CD4 cell of 201-300 cells/mm³ (9, 64.3%), while those with CD4 cells above 301-400 cells/mm³ (2: 16.7%) had the lowest LRTI rate (Table 3). Of the total cases on ART, those with viral load above 1000 copies/ml (23, 45.1%) had the highest LRTI prevalence rate compared with those that had viral load below 1000 copies/ml (1: 10%) (Table 3). Prevalence of LRTI was statistically associated ($p < 0.05$) with CD4 counts and viral load of patient (Table 3).



Figure 1 The Vitek 2 Compact 60 (BioMérieux, France) system in University of Uyo teaching hospital.

Table 1 Occurrence of Bacterial Isolates according to their Socio-demographic Characteristics.

Socio-Demographic Characteristics		No of Samples	Growth (%)	No growth (%)	X ²	p-value
Sex	Male	16	6 (37.5)	10 (62.5)	0.031	0.86
	Female	45	18 (40)	27 (60)		
Age (yrs)	≤15	4	0 (0)	4 (100)	8.155	0.043
	16-30	29	8 (27.6)	21 (72.4)		
	31-45	22	13 (59.1)	9 (40.9)		
	≥ 46	6	3 (50)	3 (50)		
Occupation	Self employed	16	7 (43.8)	9 (56.2)	6.099	0.192
	Trader	7	3 (42.9)	4 (57.1)		
	Student	12	2 (16.7)	10 (83.3)		
	Civil Servant	6	1 (16.7)	5 (83.3)		
	Unemployed	20	11 (55)	9 (45)		
Marital status	Single	42	18 (42.9)	24 (57.1)	0.697	0.404
	Married	19	6 (31.6)	13 (68.4)		
Educational Levels	None	7	3 (42.9)	4 (57.1)	0.549	0.908
	Primary	11	5 (45.5)	6 (54.5)		
	Secondary	21	7 (33.3)	14 (66.7)		
	Tertiary	22	9 (40.9)	13 (59.1)		
Total		61	24 (39.3)	37 (60.7)		

*Significance at $p = 0.05$ | Source: Field data, 2021

Figure 2

Distribution of Bacterial Isolates.

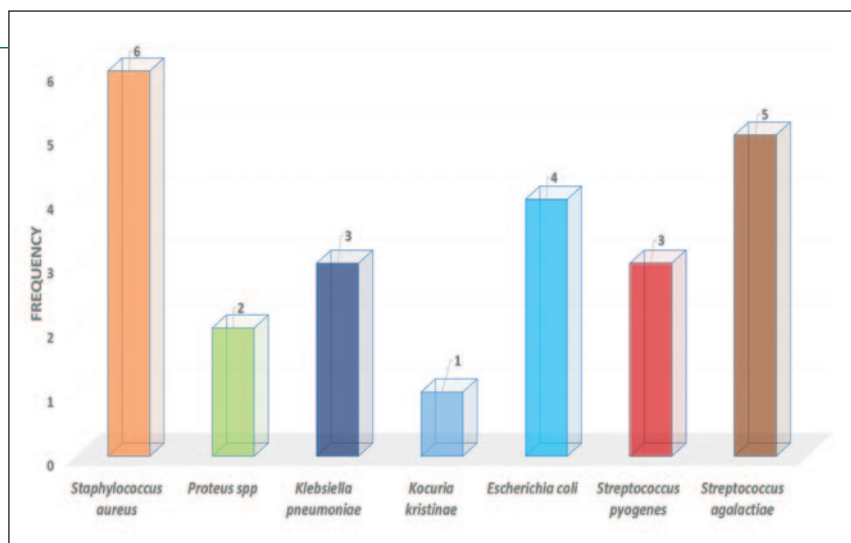


Table 2 Distribution of Bacterial Isolates Identified from Sputum Specimen of Patient with suspected LRTI at University of Uyo Teaching Hospital and SLHA.

Isolate	Gram reactions	Growth (%)	UUTH (%)	SLHA (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ve	6 (25)	2 (33.3)	4 (66.7)
<i>Proteus spp</i>	-ve	2 (8.3)	0 (0)	2 (100)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-ve	3 (12.5)	1 (33.3)	2 (66.7)
<i>Rothia kristinae</i>	+ve	1 (4.2)	0 (0)	1 (100)
<i>Escherichia coli</i>	-ve	4 (16.7)	1 (2.3)	3 (75)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+ve	3 (12.5)	0 (0)	3 (100)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+ve	5 (20.8)	1 (20)	4 (80)
Total		24	5 (20.8)	19 (79.2)

Source: Field data, 2021
Abbreviations: UUTH= University of Uyo Teaching Hospital, SLHA = St. Luke Hospital, Anua, +ve = Positive, -ve = Negative

Table 3 Distribution of Bacterial Isolates according to Immunologic staging (CD4 count) and Viral Load.

Variables	No of Samples	Growth	No Growth	X ²	p-value
CD4 (cells/mm³)					
<200	24	11 (45.8)	13 (54.2)	9.594	0.048
201-300	14	9 (64.3)	5 (35.7)		
301-400	12	2 (16.7)	10 (58.3)		
401-500	7	2 (28.6)	5 (71.4)		
>500	4	0 (0)	4 (100)		
Viral Load (copies/ml)					
Suppressed <1000	11	2 (18.2)	9 (81.8)	4.316	0.038
Unsuppressed ≥1000	50	22 (44)	28 (56)		
Total	61	24	37		

Source: Field data, 2021

Antibiotics Susceptibility Pattern of Bacterial Isolates

Gram positive and Gram negative bacteria were most sensitive to imipenem, 93.3% and 77.8% respectively. Trimethoprim-sulfamethoxazole (40%) and ceftriax-

one (51.7%) were the most resisted antibiotics by Gram positive bacteria (Table 4), while gentamicin (44.4%), azithromycin (33.3%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (33.3%) were the most resisted antibiotics by Gram positive bacteria (Table 5).

Table 4 Antibiotic Susceptibility Patterns of Gram positive Isolates from Lower Respiratory Tract Infection (LRTI).

Antibiotics (μ g)	Sensitive	Intermediate	Resistant
CN (10)	9 (60)	4 (26.7)	2 (13.3)
AMC (10)	7 (46.7)	6 (40)	2 (13.3)
CRO (30)	6 (40)	5 (33.3)	4 (26.7)
IMI (10)	14 (93.3)	1 (6.7)	0 (0)
SXT (25)	7 (46.7)	2 (13.3)	6 (40)
E (15)	6 (40)	8 (53.3)	1 (6.7)
DA (2)	8 (53.3)	5 (33.3)	2 (13.3)

Source: Field data, 2021
Abbreviations: AMC = amoxicillin clavulanic acid, CN = gentamicin, IMI = imipenem, DA = clindamycin, SXT = Trimethoprim-sulfamethoxazole, E = erythromycin, CRO = ceftriaxone, S = Sensitivity, I = Intermediate, R = Resistance

Table 5 Antibiotic Susceptibility Patterns of Gram negative Isolates from Lower Respiratory Tract Infection (LRTI).

Antibiotics (μ g)	Sensitive	Intermediate	Resistant
CN (10)	4 (44.4)	1 (11.1)	4 (44.4)
AMC (10)	6 (66.7)	2 (22.2)	1 (11.1)
CAZ (30)	5 (55.6)	3 (33.3)	1 (11.1)
IMI (10)	7 (77.8)	1 (11.1)	1 (11.1)
SXT (25)	5 (55.6)	1 (11.1)	3 (33.3)
CRO (30)	6 (66.7)	2 (22.2)	1 (11.1)
AZM (15)	2 (22.2)	4 (44.4)	3 (33.3)

Source: Field data, 2021
Abbreviations: AMC = amoxicillin clavulanic acid, CN = gentamicin, AZM = azithromycin, IMI = imipenem, SXT = Trimethoprim-sulfamethoxazole, CRO = ceftriaxone, CAZ = ceftazidime

Discussion

Upper and lower respiratory tract infections, such as tuberculosis, pneumonia, and systemic mycosis infections, pose a significant health burden on immunocompromised individuals.²⁵ However, the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) has shown promising results in reducing the incidence of these infections. HAART works by effectively reducing

the viral load of HIV in the pulmonary system and mitigating the associated inflammatory responses.^{9,26} The incidence rate of LRTI in this study was 39.3% which is higher than 13.9% rate reported by Odeyemi *et al.* in a study carried out in Osun state, Nigeria.³ Our rate was however lower than 39.7% and 70.8% rate reported by Ojha *et al.* and Khushbu and Satyam respectively.^{19,27} These variations in incidence rates can be attributed to several factors, including differences



in population characteristics, geographical locations, and healthcare practices. Nonetheless, the findings highlight the substantial prevalence of LRTIs among immunocompromised individuals. LRTI occurrence was only observed in participants with CD4 counts less or equals 500 cells/mm³, though highest in those with CD4 count less than 200 cells/mm³. It was observed that the development of LRTI was significantly associated with lower CD4 cell count. This is in accordance with studies by Odeyemi *et al.*, Ojha *et al.*, and Lamas *et al.*,^{3,19,25} which reported increased CD4 count to have protected against LRTI. The reason for this can be attributed to previously documented findings that increased CD4 cells count aide in controlled and efficient immune response to pathogens whereas decreased CD4 cell counts increases infection (including LRTI) risk in PLWHA. Since CD4 cells are one of HIV's primary targets, its decline is correlated with high viral loads with increased infection risk.²⁸ In line with this, our study observed higher occurrence rate of LRTI in those with viral load greater or equal to 1000 copies/mL and also showed there was a statistical association between LRTI prevalence and viral load. This is in line with previous findings by Crothers *et al.*, Candiani *et al.*, and de Campos *et al.*^{26,29,30} However, although those who achieve viral load suppression aren't at risk of infection as reported by Lamas *et al.*,²⁵ but our study observed 11% LRTI occurrence rate in those with viral load less than 1000 copies/mL. This observation is supported by Crothers *et al.* and Grubb *et al.*,^{26,31} as they reported infectious lung disease occurrence in HIV virally suppressed participants. The reason for this could have been due to setting cut off value for viral load suppression in this study as < 1000 copies/mL compared with other studies with cut off value of <400 copies/mL. HAART has really transformed opportunistic infections in PLWHA from a uniformly fatal risk into manageable risk through its ability to reduce viral load and restore CD4 cells.^{32,33} This could explain the statistically insignificance (p>0.05) between the prevalence of LRTI and socio-demographic factors like sex, occupation, marital status and educational level of participants in this study. This is consistent with reports by Samson *et al.*⁷ that occupation, marital status and educational level are not associated with infection prevalence. However, age was observed to be statistically associated (p<0.05) with LRTI prevalence in participants. This observation supports the notion by Crothers *et al.*²⁶ that age is an important risk factor for many pulmonary diseases among HIV-infected patients.

In this study, about 18.2% of the virally suppressed patients had LRTI and they were found to have CD4

count within 401-500. This was also observed in a study by Ledergerber *et al.*,³⁴ where minority of patients, developed opportunistic infections despite being suppressed virally suppressed. Anglaret *et al.*³⁵ also stated HIV infected individuals, even with high CD4 cell count are still at high risk (though those with CD4 cell count less than 200 cells/mm³ still have the highest risk) of developing both common and opportunistic infections than the general population. Ledergerber *et al.*³⁴ stated that the reason could be that there're disparities in CD4 cell recovery rate as some have slow CD4 cell recovery rate despite suppressed viral load. Also, the reason could be due to behavioral factors being neglected by patient.³⁶

The antimicrobial susceptibility pattern in this study demonstrated that imipenem exhibited the highest effectiveness among the tested antibiotics. This finding aligns with a study conducted by Uzoamaka *et al.*,³⁷ suggesting that imipenem's clinical efficacy may be attributed to its limited use and lower incidence of misuse by patients. Similar research conducted by Mukhopadhyay,³⁸ and Behera *et al.*³⁹ has also reported limited resistance to carbapenems due to their restricted usage. Conversely, trimethoprim-sulfamethoxazole displayed a high level of resistance against both Gram-negative and Gram-positive bacteria in the study. The frequent prescription of trimethoprim-sulfamethoxazole to people living with HIV or its potential misuse by these individuals may contribute to the observed resistance. This finding is consistent with a study conducted by Khushbu and Satyam,²⁷ which reported a high resistance rate to cotrimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole) among both Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Conclusion

This study has given information on Lower Respiratory Tract Infection (LRTI) among PLWHA on HAART in the study region. We found that infectious and non-infectious pulmonary diseases are substantially increased among PLWHA and our data suggests a clear correlation between LRTI occurrence with CD4 count and viral load of PLWHA irrespective of sex, marital status, occupation or level of education, hitherto an underscore of the importance of factors such as CD4 cell counts, viral load, and age in determining the risk of developing these infections. This study revealed that the routine antibiotic given in the region to PLWHA as prophylaxis is showing high level of resistance which creates alarm for an immediate action for judicious use of antibiotics.



Περίληψη

Bacterial Aetiologic Profile and Antibiotic Response Patterns of Lower Respiratory Tract Infection (LRTI) among HIV/AIDS Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) in Uyo, South-south Nigeria

Rachel Sylvester Okon¹, Ifeanyi Onwuezobe², Ekom Ndifreke Edem^{3*}, Unwana Ezekiel Akereuke⁴, Samuel Bonne⁵, Ene Omenyi Bawonda⁴

¹Department of Biological Sciences, Akwa Ibom State Polytechnic, Ikot Osurua, Ikot Ekpene, Nigeria,

²Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Health Sciences, University of Uyo, Uyo, Nigeria, ³Kelina Hospital, Lagos, Nigeria, ⁴Department of Medical Microbiology and Parasitology, Faculty of Basic Clinical Sciences, University of Uyo, Nigeria, ⁵Faculty of Medicine, McGill University, Canada.

* Corresponding author

Η εξαιρετικά αποτελεσματική αντιρετροϊκή θεραπεία (HAART) μειώνει το ιικό φορτίο του HIV, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει τον αριθμό των CD4 και αναμένεται να μειώσει τον κίνδυνο ευκαιριακών λοιμώξεων, όπως η λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (LRTI). Ως εκ τούτου, η παρούσα μελέτη αξιολόγησε το βακτηριακό αιτιολογικό προφίλ και τα πρότυπα ανταπόκρισής τους στα αντιβιοτικά της λοίμωξης της κατώτερης αναπνευστικής οδού (LRTI) μεταξύ ασθενών με HIV υπό HAART στο Uyo της Νιγηρίας. Αυτή η μελέτη συμπεριέλαβε 61 άτομα που ζούσαν με HIV/AIDS (PLWHA) και ελάμβαναν HAART. Χρησιμοποιήθηκαν τα νοσοκομειακά αρχεία, τυποποιημένα ερωτηματολόγια και συλλέχθηκε από τους συμμετέχοντες δείγμα πτυέλων απαλλαγμένο από σάλιο. Τα δείγματα πτυέλων υποβλήθηκαν σε εργαστηριακή ανάλυση: μικροσκοπική εξέταση, καλλιέργεια και ταυτοποίησης των απομονούμενων παθογόνων. Πραγματοποιήθηκε επίσης έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με χρήση συμβατικών βακτηριολογικών μεθόδων. Από τα 61 δείγματα, τα 24 (39,3%) έδωσαν *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Rothia kristinae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp*. Ο επιπολασμός των LRTI συσχετίστηκε στατιστικά ($p < 0,05$) με τον αριθμό των CD4, το ιικό φορτίο και την ηλικία, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά ($p > 0,05$) με το φύλο, το επάγγελμα, την οικογενειακή κατάσταση και το μορφωτικό επίπεδο του ασθενούς. Τόσο στα Gram-θετικά όσο και στα Gram-αρνητικά παθογόνα, η ιμιπενέμη έδειξε υψηλή ευαισθησία, ενώ η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη έδειξε υψηλό επίπεδο αντοχής. Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει ότι ο αυξημένος αριθμός CD4 και το μειωμένο ιικό φορτίο είναι η καλύτερη παρέμβαση για την πρόληψη ευκαιριακών λοιμώξεων, όπως το LRTI σε PLWHA υπό HAART.



Λέξεις κλειδιά

λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, αντιρετροϊκή αγωγή, άτομα που ζουν με HIV, CD4, Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας/Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (HIV/AIDS)



References

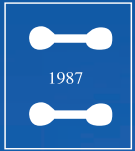
1. Anikpe JN, Chukwu AJ, Edem EN, Elahmar AAE, Sinha S, Arome D. Effect of anthropometric and sociodemographic variables on physical activity levels of people living with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome on highly active antiretroviral therapy. *Tzu Chi Med J* 2022; 35:200-204.
2. Ayyagari A, Sharma AK, Prasad KN. Spectrum of opportunistic infections in human immunodeficiency virus (HIV) infected cases in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol* 1999; 17:78-80.
3. Odeyemi AO, Odeyemi AO, Awopeju OF, Adewole OO, Tanimowo MO, Erhabor GE. Community-acquired lower respiratory tract infections in an adult population with HIV infection in a Nigerian tertiary hospital. *Res J Health Sci* 2021; 9:150-157
4. Negedu-Momoh OR, Balogun O, Dafa I, Etuk A, Olatide EA, Adedokun O, *et al.* Estimating HIV incidence in the Akwa Ibom AIDS indicator survey (AKAIS), Nigeria using the limiting antigen avidity recency assay. *J Int AIDS Soc* 2021; 24:e25669.
5. Edem EN, Umo AN, Akinjogunla OJ, Akereuke UE. Pus cell as an indicator for *Mycobacterium tuberculosis* diagnostic yield by GeneXpert MTB/RIF in South-South Nigeria: A prospective study. *J Clin Sci* 2022; 19:62-66.
6. Cano RLE, Lopera HDE. Introduction to T and B lymphocytes. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, *et al.*, editors. Autoimmunity: From Bench to Bedside. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013; Chapter 5.
7. Samson ES, Ajike AO, Cletus IJ, Abiodun O. Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* and *Mycobacterium tuberculosis* Co-Infection among HIV Infected Adult Patients on HAART in Ogun State, Nigeria. *Int J Virol AIDS* 2019; 6:048.
8. Kumar L, Randhawa K. Comparison between Gene Expert MTB/RIF Assay and Sputum Microscopy in Diagnosis of Tuberculosis in HIV Patients at Tertiary Care Centre. *J Med Sci Clin Res* 2021; 09:17-23
9. Lima VD, Lourenço L, Yip B, Hogg RS, Phillips P, Montaner JS. AIDS incidence and AIDS related mortality in British Columbia, Canada, between 1981 and 2013: a retrospective study. *Lancet HIV* 2015; 2:e92-97
10. Guihot A, Tubiana R, Breton G, Marcelin AG, Samri A, Assoumou L, *et al.* Immune and virological benefits of 10 years of permanent viral control with antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)* 2010; 24:614-617.
11. Battistini Garcia SA, Guzman N. Acquired Immune Deficiency Syndrome CD4+ Count. In *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022.
12. Helleberg M, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Pedersen C, Obel N, *et al.* CD4 decline is associated with increased risk of cardiovascular disease, cancer, and death in virally suppressed patients with HIV. *Clin Infect Dis* 2013; 57:314-321.
13. Odeyemi AO. HIV/AIDS and the respiratory system. In: Asekun-Olarinmoye E.O. and Alebiosu C.O. (eds.) *New insights into HIV/AIDS for students and Health care Professionals*. Newcastle upon Tyne, UK: Cambridge Scholars Publishing; 2019. 99- 125.
14. Feikin DR, Feldman C, Schuchat A, Janoff EN. Global strategies to prevent bacterial pneumonia in adults with HIV disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:445-455.
15. Gingo MR, Morris A. Pathogenesis of HIV and the Lung. *Curr HIV/AIDS Rep* 2013; 10:42-50.
16. Edem EN, Umo AN, Olaniyan UO. Coronavirus Disease (COVID-19) Infection and Innate Immuno-Response: Pathway to Eradicating the Pandemic. *Virol Immunol J* 2021; 5:000270.
17. Crothers K, Thompson BW, Burkhardt K, Morris A, Flores SC, Diaz PT, *et al.* HIV-associated lung infections and complications in the era of combination antiretroviral therapy. *Proc Am Thorac Soc* 2011; 8: 275-281.
18. Mayaud C, Parrot A, Cadranet J. Pyogenic bacterial lower respiratory tract infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Eur Respir J* 2002; 20(Suppl. 36):28s-39s.
19. Ojha CR, Rijal N, Khagendra KC, Palpasa K, Kansakar P, Gupta BP, *et al.* Lower respiratory tract infections among HIV positive and control group in Nepal. *Virusdisease* 2015; 26:77-81.
20. Edem EN, Umoh A, Olaniyan UO, Anikpe JN. Genexpert MTB/RIF Diagnostic Yield of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampicin Resistance in Uyo, Nigeria. *Clin Med* 2021; 3:1034.
21. Shen F, Sergi C. *Sputum Analysis*. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
22. Edem EN, Onwuezobe IA, Ochang EA, Samuel A. Microscopic Quality Evaluation of Sputum Specimens Submitted for Diagnosis of Tuberculosis at the TB Clinic, University of Uyo Teaching Hospital, Akwa Ibom State, Nigeria. *Int J Adv Res Biol Sci* 2016; 3:104-108
23. Cheesbrough M. *District Laboratory Practice in Tropical Countries part 2*. Cambridge University Press, UK,2005; pp 105 – 194.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Twentyninth Informational Supplement, CLSI document 2020, 30. Villanova, PV: 2020; M100-S29.

25. Lamas CC, Coelho LE, Grinsztejn BJ, Veloso VG. Community-acquired lower respiratory tract infections in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: predictors in a contemporary cohort study. *Infection* 2017; 45:801–809.
26. Crothers K, Huang L, Goulet JL, Goetz MB, Brown ST, Rodriguez-Barradas MC, *et al.* HIV infection and risk for incident pulmonary diseases in the combination antiretroviral therapy era. *Am J Resp Crit Care Med* 2011; 183:388–395.
27. Khushbu Y, Satyam S. Bacteriological Profile of Lower Respiratory Tract Infection (LRTI) among HIV Seropositive Cases in Central Terai of Nepal. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2015; 4:431-442
28. Abdullahi SB, Ibrahim OR, Okeji AB, Yandoma RI, Bashir I, Haladu S, *et al.* Viral suppression among HIV-positive patients on antiretroviral therapy in northwestern Nigeria: an eleven-year review of tertiary care centre records, January 2009-December 2019. *BMC Infect Dis* 2021; 21:1031.
29. Candiani TM, Pinto J, Cardoso CA, Carvalho IR, Dias AC, Carneiro M, *et al.* Impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on the incidence of opportunistic infections, hospitalizations and mortality among children and adolescents living with HIV/AIDS in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Cadernos de saude publica* 2007; 23 Suppl 3, S414–S423.
30. de Campos KR, Granga DD, Olorunju S, Masekela R. The impact of highly active antiretroviral therapy on the burden of bacterial lower respiratory tract infections in children. *South Afr Med J* 2015; 105:554–557.
31. Grubb JR, Moorman AC, Baker RK, Masur H. The changing spectrum of pulmonary disease in patients with HIV infection on antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)* 2006; 20:1095–1107.
32. Rathbun RC, Lockhart SM, Stephens JR. HIV treatment guidelines-An overview. *Curr Pharm Dis* 2006; 12:1045–1063.
33. Ikpeme EE, Etukudo OM, Ekrikpo UE. Seroprevalence of HBV and HIV co-infection in children and outcomes following highly active antiretroviral therapy (HAART) in Uyo, South-South Nigeria. *Afr Health Sci* 2013; 13:955–961.
34. Ledergerber B, Egger M, Erard V, Weber R, Hirschel B, Furrer H, *et al.* AIDS-related opportunistic illnesses occurring after initiation of potent antiretroviral therapy: the Swiss HIV Cohort Study. *JAMA* 1999; 282:2220–2226.
35. Anglaret X, Minga A, Gabillard D, Ouassa T, Messou E, Morris B, *et al.* AIDS and non-AIDS morbidity and mortality across the spectrum of CD4 cell counts in HIV-infected adults before starting antiretroviral therapy in Cote d’Ivoire. *Clin Infect Dis* 2012; 54:714-723
36. Edem EN, Mbong EO, Olaniyan UO. Environmental and human behavioral factors associated with Vulvovaginal Candidiasis among single and married Women in Eket. *Glob J Infect Dis Clin Res* 2021; 7:037-042.
37. Uzoamaka M, Ngozi O, Johnbull OS, Martin O. Bacterial Etiology of Lower Respiratory Tract Infections and Their Antimicrobial Susceptibility. *Am J Med Sci* 2017; 354: 471-475.
38. Mukhopadhyay C. Infection control in intensive care units. *Indian J Resp Care* 2018; 7:14.
39. Behera B, Sahu KK, Bhoi P, Mohanty JN. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria in ICU patients with lower respiratory tract infection: A cross-sectional study. *J Acute Dis* 2020; 9:157-60





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Με την επιστημονική συνδιοργάνωση της
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ



10^ο

**Πανελλήνιο Συνέδριο
Ιατρικής Βιοχημείας**

6^ο

**Συμπόσιο Εργαστηριακής
Αιματολογίας & Αιμοδοσίας**

**Αθήνα, Royal Olympic Hotel, 11-13 Απριλίου 2024
(υβριδικό)**

**ΧΟΡΗΓΟΥΝΤΑΙ ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ (C.M.E. CREDITS)**



Congresses - Publications - Digital Constructions

Μιχαλακοπούλου 29, Αθήνα • Τ. 210 7213225 • Ε: sioran@ascentltd.gr • www.ascentltd.gr

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

Οδηγίες προς τους συγγραφείς

Γενικά στοιχεία - Σκοπός του περιοδικού

Το Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας είναι η επίσημη τριμηνιαία έκδοση της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, με σκοπό τη συνεχή εκπαίδευση των Βιοπαθολόγων, Κλινικών Μικροβιολόγων, αλλά και κάθε επιστήμονα που ασχολείται με την εργαστηριακή και κλινική ιατρική.

Κύρια επιδίωξη είναι η δημοσίευση μελετών στην Ελληνική ή την Αγγλική γλώσσα που αφορούν όλους τους τομείς της Κλινικής Μικροβιολογίας (Βακτηριολογία, Παρασιτολογία, Μυκητολογία, Ιολογία), αλλά και τις λοιπές εξειδικεύσεις της Ιατρικής Βιοπαθολογίας (Εργαστηριακή Αιματολογία-Αιμοδοσία, Ιατρική Βιοχημεία και Ανοσολογία).

Πρόσβαση στο περιοδικό

Η πρόσβαση στο περιοδικό γίνεται με ηλεκτρονικό τρόπο, σε όλα τα μέλη της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, μέσω της ιστοσελίδας του περιοδικού της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας (<https://acta.hms.org.gr/>).

Διαδικασία υποβολής προς δημοσίευση

Τα άρθρα υποβάλλονται αποκλειστικά μέσω της ηλεκτρονικής πλατφόρμας στο www.hms.org.gr (Περιοδικό/Ηλεκτρονική Υποβολή Άρθρων). Χειρόγραφα που παραλαμβάνονται με το ταχυδρομείο, ανεξάρτητα της ύπαρξης ή όχι ηλεκτρονικού αρχείου, δεν θα λαμβάνονται υπ' όψιν. Το υποβαλλόμενο άρθρο θα πρέπει να συνοδεύεται από επιστολή-δήλωση του υπεύθυνου συγγραφέα που να βεβαιώνει ότι όλοι οι συγγραφείς έχουν διαβάσει και συμφωνούν με την υποβολή του χειρογράφου και ότι το άρθρο ή ένα σημαντικό μέρος αυτού δεν έχει δημοσιευθεί ή υποβληθεί για δημοσίευση κάπου αλλού. Επίσης θα πρέπει να αναφέρεται κάθε σύγκρουση συμφερόντων όλων των συγγραφέων. Κατά την παραλαβή, το άρθρο ελέγχεται για την πληρότητα και στη συνέχεια αποστέλλεται απαντητικό ηλεκτρονικό μήνυμα στον υπεύθυνο για αλληλογραφία συγγραφέα.

Είδη άρθρων προς δημοσίευση

Δημοσιεύονται οι παρακάτω κατηγορίες άρθρων:

Ερευνητικές εργασίες: Περιέχουν αποτελέσματα εργαστηριακών, επιδημιολογικών ή κλινικών μελετών προοπτικού ή αναδρομικού χαρακτήρα που δημοσιεύονται για πρώτη φορά. Η έκταση του κειμένου χωρίς τη βιβλιογραφία δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 5.000 λέξεις.

Βραχείες δημοσιεύσεις: Έχουν την γενική δομή των ερευνητικών εργασιών, όμως έχουν μικρότερο μέγεθος έως 1.800 λέξεις και έως 15 βιβλιογραφικές αναφορές. Αφορούν μελέτες που δεν δικαιολογούν την έκταση μιας πλήρους ερευνητικής εργασίας. Η Συντακτική Επιτροπή, μετά από πρόταση των εκάστοτε κριτών, διατηρεί το δικαίωμα να συστήσει στους συγγραφείς να μετατρέψουν μια πλήρη ερευνητική εργασία σε βραχεία δημοσίευση, εφόσον, κατά την κρίση τους, δεν δικαιολογείται η έκταση που έχει δοθεί. Οι συγγραφείς μπορούν επίσης να υποβάλλουν εργασίες που έχουν εξαρχής τη μορφή βραχειών δημοσιεύσεων.

Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις: Αποτελούν νέες ή πολύ σπάνιες περιπτώσεις νοσημάτων, σπάνιες εκδηλώσεις, εφαρμογή νέων διαγνωστικών κριτηρίων ή νέων θεραπευτικών μεθόδων. Η έκταση του κυρίως κειμένου να μην υπερβαίνει τις 1.500 λέξεις και η βιβλιογραφία να μην υπερβαίνει τις 15 παραπομπές.

Ανασκοπήσεις: Αναλύονται σύγχρονα ιατρικά θέματα, στα οποία παρουσιάζονται οι πρόσφατες εξελίξεις ή αναφέρονται τα συμπεράσματα σειράς ερευνητικών μελετών των συγγραφέων. Οι ανασκοπήσεις γράφονται από έναν ή περισσότερους συγγραφείς, ανάλογα με τη θεματολογία τους. Η έκταση του κυρίως κειμένου να μην υπερβαίνει τις 10.000 λέξεις και η βιβλιογραφία τις 100 παραπομπές.

Επιστολές προς την Σύνταξη: Περιέχουν κρίσεις ή παρατηρήσεις για δημοσιευμένες μελέτες κ.λπ. Η



έκτασή τους να μην υπερβαίνει τις 500 λέξεις και η βιβλιογραφία τις 5 αναφορές.

Άρθρα της Σύνταξης: Σύντομα άρθρα σχολιασμού ή κρίσης επίκαιρων θεμάτων, τα οποία γράφονται μετά από πρόσκληση της συντακτικής επιτροπής. Η έκτασή τους να μην υπερβαίνει τις 1.000 λέξεις και η βιβλιογραφία τις 10 αναφορές.

Ορισμός συγγραφέα άρθρου

Ως συγγραφέας ενός άρθρου ορίζεται ένα άτομο που έχει συνεισφέρει στον σχεδιασμό ή στην εκτέλεση της συγκεκριμένης έρευνας που παρουσιάζει το άρθρο, σύμφωνα με τις οδηγίες της Διεθνούς Επιτροπής Συντακτών Ιατρικών Περιοδικών (ICMJE): [http://www.icmje.org/ethical_1author.html]. Το περιοδικό θεωρεί όλους τους συγγραφείς, ανεξάρτητα της σειράς τους, ως φέροντες εξίσου την πλήρη ευθύνη ενός άρθρου, συμπεριλαμβανομένου και του ορισμού του τίτλου και της σειράς των υπολοίπων συγγραφέων. Άτομα που παρεχώρησαν προς χρήση εγκαταστάσεις ή εξοπλισμό, κλινικά ή πρότυπα στελέχη, αναλώσιμα ή αντιδραστήρια, έδωσαν οικονομική βοήθεια μέσω δημόσιας ή ιδιωτικής χρηματοδότησης, ή συμπλήρωσαν ερωτηματολόγια, δεν μπορούν να θεωρηθούν ότι πληρούν τα κριτήρια του συγγραφέα. Επίσης τα κριτήρια αυτά δεν πληρούν άτομα που σχολίασαν, ή διόρθωσαν ή παρείχαν συμβουλές κατά τη διαδικασία της συγγραφής μέρους ή όλου του άρθρου. Αυτά τα άτομα μπορούν να αναφερθούν στο κεφάλαιο των ευχαριστιών. Ομάδες εργασίας μπορεί να αναφερθούν ως συγγραφείς, εφόσον όλα τα μέλη που αποτελούν την ομάδα πληρούν τα κριτήρια που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Τέλος, αναφέρεται ρητά ότι ο τίτλος του συγγραφέα δεν μπορεί να αποδοθεί «τιμής ένεκεν» λόγω θέσης. Τυχόν διαφωνίες που ανακύψουν σχετικά με την απονομή του τίτλου του συγγραφέα ή την σειρά των συγγραφέων σε ένα άρθρο, θα σημαίνουν αυτόματα την αναστολή της διαδικασίας κρίσης, έως ότου αυτά λυθούν, είτε από το σύνολο των συγγραφέων, ή από την αρμόδια επιτροπή βιοηθικής και δεοντολογίας του ιδρύματος προέλευσης του άρθρου.

Ευχαριστίες

Τα άτομα στο κεφάλαιο των ευχαριστιών θα πρέπει να έχουν εγκρίνει την συμμετοχή τους σε αυτό. Για

υλικό που έχει δημοσιευθεί με οποιοδήποτε άλλο τρόπο και υπόκειται σε περιορισμό πνευματικής ιδιοκτησίας και δικαιωμάτων (copyright) θα πρέπει να αναφερθεί αναλυτικά ο τρόπος με τον οποίο αυτό αποκτήθηκε και πως δόθηκε η άδεια. Κάθε οικονομική βοήθεια, είτε δημόσια είτε ιδιωτική θα πρέπει να αναφέρεται ρητά.

Σύγκρουση συμφερόντων

Όλοι οι συγγραφείς θα πρέπει να αναφέρουν στο άρθρο κάθε πιθανή σύγκρουση συμφερόντων, σχετικά με την υπό δημοσίευση μελέτη, σύμφωνα με τις οδηγίες της Διεθνούς Επιτροπής Συντακτών Ιατρικών Περιοδικών (ICMJE):

[http://www.icmje.org/ethical_4conflicts.html]. Θα πρέπει να αναφέρεται κάθε χρηματοδότηση που θα μπορούσε να οδηγήσει ή να υπονοήσει κατευθυνόμενη εξαγωγή συμπερασμάτων, όπως επίσης κάθε οικονομική δραστηριότητα που μπορεί να έχει σχέση με την μελέτη (π.χ. και όχι περιοριστικά, προηγούμενη κατοχή μετοχών ή συμμετοχή σε Διοικητικά Συμβούλια ή λήψη χρηματοδότησης για ομιλίες από εταιρία της οποίας τα προϊόντα ελέγχονται στην συγκεκριμένη μελέτη, κ.λπ.). Η μη ύπαρξη σύγκρουσης συμφερόντων θα πρέπει επίσης να αναφέρεται. Εδώ σημειώνεται ότι οι λεπτομέρειες της σύγκρουσης συμφερόντων δεν δημοσιεύονται μαζί με το άρθρο, αλλά παραμένουν στην Συντακτική Επιτροπή υπό αυστηρή εχεμύθεια. Στο άρθρο δημοσιεύεται μια γενικόλογη φράση, π.χ. «Ο συγγραφέας Χ.Χ έλαβε ενίσχυση από την εταιρία Ψ.Ψ. για ερευνητικούς σκοπούς, ή για ομιλίες σε συνέδρια κ.λπ.». Αποτυχία της συμμόρφωσης με αυτή την οδηγία θα οδηγήσει σε επιστροφή του άρθρου για συμπλήρωση, πριν την επιστημονική κρίση. Σε περίπτωση που εκ των υστέρων αποκαλυφθεί σύγκρουση συμφερόντων που δεν δηλώθηκε, η συντακτική επιτροπή διατηρεί το δικαίωμα να το αναφέρει σε επόμενο τεύχος με την μορφή «Ο συγγραφέας Χ.Χ. δεν δήλωσε πιθανή σύγκρουση συμφερόντων, σχετικά με το άρθρο Ζ.Ζ. και την εταιρία Ψ.Ψ.».

Οδηγίες σύνταξης άρθρων

Για τη σύνταξη των άρθρων το περιοδικό ακολουθεί τις υποδείξεις της Διεθνούς Επιτροπής Συντακτών Ιατρικών Περιοδικών (ICMJE):

[http://www.icmje.org/urm_main.html]. Αποτυχία των συγγραφέων να συμμορφωθούν με τις οδηγίες μπορεί να σημαίνει επιστροφή του άρθρου, πριν την κρίση, για διόρθωση και εκ νέου υποβολή. Το χειρόγραφο, με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή και λογισμικού επεξεργασίας κειμένου, δακτυλογραφείται σε μορφοποίηση μεγέθους σελίδας A4 (212 x 297 mm) με περιθώρια εκατέρωθεν τουλάχιστον 2,5 cm, σε διπλό διάστημα και με συνεχή αρίθμηση σειρών στο αριστερό περιθώριο (Μενού: Διάταξη σελίδας/Αρίθμηση γραμμών/Συνεχόμενη αρίθμηση).

Οι **ερευνητικές εργασίες**, οι **βραχείες δημοσιεύσεις** και οι **ενδιαφέρουσες περιπτώσεις** θα πρέπει να έχουν την ίδια κοινή δομή και να περιλαμβάνουν τα εξής τμήματα, σε ένα ενιαίο αρχείο κειμένου (word, text, ή άλλο): τη σελίδα τίτλου, την ελληνική περίληψη με τις λέξεις κλειδιά, την αγγλική περίληψη με τις λέξεις κλειδιά στα αγγλικά, το κυρίως κείμενο, τις ευχαριστίες, τη δήλωση σύγκρουσης συμφερόντων, τη δήλωση άδειας από την αρμόδια Επιτροπή Βιοηθικής ή/και τον ΕΟΦ (εφόσον απαιτείται, σύμφωνα με την κείμενη νομοθεσία, για ερευνητικές εργασίες παρεμβατικού τύπου), τη βιβλιογραφία, τους πίνακες και τις λεζάντες των εικόνων. Οι εικόνες θα πρέπει να υποβάλλονται σε ξεχωριστά αρχεία, σύμφωνα με τις οδηγίες που ακολουθούν.

Η **σελίδα τίτλου** αποτελεί την πρώτη σελίδα του άρθρου και περιλαμβάνει: (α) τον τίτλο του άρθρου, στον οποίο δεν επιτρέπονται συντμήσεις λέξεων, (β) τα ονόματα των συγγραφέων (πλήρες όνομα και επώνυμο), (γ) το εργαστήριο ή την κλινική και το νοσοκομείο ή το ίδρυμα από το οποίο προέρχεται η εργασία, (δ) την πλήρη διεύθυνση του υπεύθυνου για την αλληλογραφία συγγραφέα, συμπεριλαμβανομένου ενός αριθμού τηλεφώνου και μιας ενεργούς διεύθυνσης ηλεκτρονικής αλληλογραφίας (e-mail) και (ε) βραχύ τίτλο όχι μεγαλύτερο από 40 γράμματα με τα διαστήματα. Όλες οι παραπάνω πληροφορίες θα πρέπει να αναφέρονται στην Ελληνική γλώσσα και στη συνέχεια και στην Αγγλική γλώσσα.

Η **περίληψη** θα πρέπει να έχει έκταση 250–400 λέξεις (εκτός από τις ενδιαφέρουσες περιπτώσεις

που θα έχει έκταση έως 250 λέξεις), στην Ελληνική και την Αγγλική γλώσσα και θα πρέπει να χωρίζεται σε 4 παραγράφους (Σκοπός, Υλικό-Μέθοδος, Αποτελέσματα, Συμπεράσματα). Κάτω από την περίληψη θα πρέπει να αναφέρονται οι **λέξεις κλειδιά** (3-6) στην Ελληνική και την Αγγλική γλώσσα, που πρέπει να αντιστοιχούν στους διεθνείς όρους του Index Medicus και να αποδίδονται στα Ελληνικά σύμφωνα με το ΙΑΤΡΟΤΕΚ (MeSH-Hellas-Βιοϊατρική Ορολογία).

Το **κυρίως κείμενο** θα πρέπει να χωρίζεται στα τμήματα: **Εισαγωγή, Υλικό και μέθοδοι, Αποτελέσματα, Συζήτηση**, εκτός από τις ενδιαφέρουσες περιπτώσεις που θα πρέπει να αποτελούνται από τα τμήματα: **Εισαγωγή, Περιγραφή περίπτωσης, Σχόλιο ή Συζήτηση**. Στο Υλικό και Μέθοδοι περιγράφεται λεπτομερώς ο τρόπος επιλογής του υλικού ή των ασθενών, καθώς και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν, ώστε η έρευνα να μπορεί να αναπαραχθεί από ερευνητές που επιθυμούν την εφαρμογή της. Σε περιπτώσεις ερευνών που αφορούν σε ανθρώπους, πρέπει να διευκρινίζεται ότι τηρήθηκε η Διακήρυξη του Ελσίνκι (1975) και θα πρέπει να αναφέρεται εάν η μελέτη έχει λάβει έγκριση από την αντίστοιχη Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας. Στα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται αναλυτικά τα αποτελέσματα με μορφή κειμένου ή πινάκων (όσο πιο συνοπτικά γίνεται, χωρίς επαναλήψεις). Στη συζήτηση μπορεί να γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων εργασιών και να αναφέρονται τα συμπεράσματα, τα οποία προκύπτουν από τα αποτελέσματα της μελέτης. Ανάλογα με το μέγεθος του άρθρου μπορεί να γίνει σύντμηση των κεφαλαίων των αποτελεσμάτων και της συζήτησης σε ένα κεφάλαιο (Αποτελέσματα-Συζήτηση).

Οι **ευχαριστίες** θα πρέπει να απευθύνονται σε άτομα με ουσιαστική συμβολή στην πραγματοποίηση της έρευνας, όπως προαναφέρθηκε πιο πάνω.

Η **δήλωση σύγκρουσης συμφερόντων** θα πρέπει να είναι αναλυτική για όλους τους συγγραφείς.

Η **δήλωση έγκρισης από την αρμόδια Επιτροπή Βιοηθικής ή τον ΕΟΦ** (για μελέτες που αυτό απαιτείται σύμφωνα με την κείμενη νομοθεσία, π.χ. μελέτες παρεμβατικού τύπου, με ασθενείς, μελέτες



ασθενών-μαρτύρων, κ.λπ.) θα πρέπει να περιλαμβάνει τον αριθμό πρωτοκόλλου και την ημερομηνία έγκρισης. Καθίσταται σαφές ότι δεν μπορεί να δημοσιευθεί μελέτη για την οποία οι συγγραφείς ζήτησαν αναδρομικά έγκριση για εργασίες που ήδη είχαν γίνει. Οι επιδημιολογικές μελέτες, οι εργασίες ελέγχου της μικροβιακής αντοχής, οι συγκρίσεις εργαστηριακής μεθοδολογίας και οι παρουσιάσεις περιστατικών αποτελούν είδη ερευνητικών εργασιών που δεν απαιτούν παρόμοια έγκριση.

Στη **βιβλιογραφία** ακολουθείται το διεθνές σύστημα Vancouver. Επειδή η αναπαραγωγή των άρθρων από τις ιστοσελίδες ανεύρεσης δεν μεταφέρει απόλυτα όλα τα τυπογραφικά στοιχεία (π.χ. ειδικά γράμματα) οι συγγραφείς για να εξασφαλίσουν την ορθή απόδοση των αναφορών θα πρέπει να ανατρέχουν στο τυπωμένο κείμενο, είτε σε έντυπη, είτε σε ηλεκτρονική μορφή (αρχεία .pdf). Όλοι οι συγγραφείς ενός άρθρου θεωρούνται από κοινού υπεύθυνοι για την σωστή αναπαραγωγή των βιβλιογραφικών αναφορών του άρθρου και η συντακτική ομάδα του περιοδικού δεν ελέγχει την τυπογραφική ακρίβειά τους. Κόστος διόρθωσης λάθους αναφοράς που τυχόν ζητηθεί από τρίτο άτομο μετά την τελική εκτύπωση του τεύχους του περιοδικού, επιβαρύνει εξ ολοκλήρου τους συγγραφείς. Η αρίθμηση των αναφορών στο κείμενο γίνεται με την σειρά που αναφέρονται στο κείμενο, με αραβικούς αριθμούς, ως εκθέτες, μετά τα σημεία στίξης (π.χ.: η συγκεκριμένη παρατήρηση έχει αναφερθεί αρχικά από τους Jones και συν.⁴ και έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες.^{5,7,8-12}).

Άρθρα περιοδικών δημοσιευμένα: Γράφονται τα επώνυμα των συγγραφέων και τα αρχικά του ονόματος χωρίς τελείες, στην συνέχεια το περιοδικό στην συντετμημένη του μορφή με πλάγια γράμματα, στην συνέχεια το έτος, ο αριθμός τόμου (χωρίς τον αριθμό τεύχους σε παρένθεση) και οι σελίδες (π.χ. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:662-685). Όταν οι συγγραφείς είναι περισσότεροι από έξι, αναγράφονται τα πρώτα έξι ονόματα και ακολουθεί η λέξη "et al." με πλάγια γράμματα, ή «και συν.» για ελληνικό άρθρο (π.χ. Garcia HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Diaz JF et al. Discrepancies between cerebral computed

tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:152-157). Σε περίπτωση αναφοράς ονομάτων συγγραφέων στο κείμενο, αναγράφεται μόνο το επώνυμό τους. Εάν οι συγγραφείς είναι δύο, μεταξύ των επωνύμων τοποθετείται η λέξη "and" ή «και» (για ελληνική δημοσίευση). Αν το άρθρο είναι ανυπόγραφο, στη θέση των ονομάτων των συγγραφέων αναφέρεται "Anonymous" ή «Ανώνυμος» (για ελληνική δημοσίευση). Για τα ηλεκτρονικά περιοδικά που δεν έχουν σελιδοποίηση, ή όπου αυτό επίσης είναι εφικτό, μετά την συντομογραφία του τίτλου του περιοδικού θα πρέπει να αναφέρεται ο κωδικός DOI (Digital Object Identifier) (π.χ. Kalil AC. *Is cefepime safe for clinical use? A Bayesian viewpoint. J Antimicrob Chemother* 2011; doi: 10.1093/jac/ dkr 138).

Άρθρα περιοδικών υπό δημοσίευση: Αφορά άρθρα που έχουν γίνει αποδεκτά και εκκρεμεί η τελική δημοσίευσή τους. Ακολουθείται η προηγούμενη οδηγία και μετά την συντομογραφία του περιοδικού αναγράφεται "in press" ή «υπό δημοσίευση». Εάν κατά την διάρκεια της διαδικασίας κρίσης το άρθρο τελικά δημοσιευθεί, οι συγγραφείς είναι υπεύθυνοι για την ανανέωση της αναφοράς με τα στοιχεία του περιοδικού (τεύχος, σελίδες ή νούμερο DOI).

Σύγγραμμα: αναφέρονται το όνομα του συγγραφέα, ο τίτλος, ο αριθμός της έκδοσης (αν υπάρχουν περισσότερες από μία), ο εκδότης, ο τόπος έκδοσης, το έτος και οι σελίδες της αναφοράς. Για τα κεφάλαια βιβλίων αναφέρεται επιπλέον μετά το όνομα του εκδότη και ο τίτλος του βιβλίου (π.χ. Griffiths WD. Old world cutaneous leishmaniasis. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds). *The leishmaniasis in biology and medicine*. Vol. II. London, Academic Press, 1987:617-636).

Εργασίες υπό μορφή ανακοινώσεων σε συνέδρια (προφορικές ή ανητημένες), δεν περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία, αλλά μπορεί να παρατίθενται σε παρένθεση στο κείμενο, εφόσον δεν έχουν παρέλθει πάνω από δύο έτη από την παρουσίασή τους, αναφέροντας το όνομα του πρώτου συγγραφέα, το συνέδριο και την σελίδα του τόμου πρακτικών (π.χ. Juncosa B et al, XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal Diseases, Porto Heli, Greece, 2008, pp63). Με παρόμοιο τρόπο θα πρέπει να αναγράφονται και οι

αναφορές σε ιστοσελίδες, όπου επιπλέον θα πρέπει να αναφέρεται και η ημερομηνία της τελευταίας επίσκεψης και ελέγχου από τους συγγραφείς (π.χ. <http://www.mednet.gr/whonet>, τελευταία επίσκεψη, 1η Μαΐου 2013).

Οι φωτογραφίες, τα σχήματα, τα διαγράμματα κ.λπ. ονομάζονται ως εικόνες (εφόσον είναι φωτογραφίες) ή γραφήματα (εφόσον είναι σχέδια), αναφέρονται στα σημεία του κειμένου όπου αντιστοιχούν και αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς (εικόνα 1, εικόνα 2, κ.ο.κ.). Υποβάλλονται ηλεκτρονικά ως ανεξάρτητα αρχεία εικόνων (JPEG, TIFF, EPS, κλπ.) στην υψηλότερη δυνατή ανάλυση (το λιγότερο 300 dpi για ασπρόμαυρες ή έγχρωμες φωτογραφίες και 600 dpi για γραφήματα που περιέχουν σχέδια και γράμματα) και όχι ενσωματωμένα στο αρχείο κειμένου του άρθρου. Η τελική αποδοχή προϋποθέτει τον έλεγχο τους από τεχνική άποψη. Για εικόνες που δεν πληρούν τις τεχνικές προδιαγραφές ζητείται η εκ νέου υποβολή τους από τους συγγραφείς. Οι λεζάντες των εικόνων θα πρέπει να γράφονται όλες μαζί σε ξεχωριστή σελίδα στο κείμενο του άρθρου.

Όλοι οι **πίνακες** αναφέρονται στα σημεία του κειμένου όπου αντιστοιχούν και αριθμούνται με συνεχόμενους αραβικούς αριθμούς (πίνακας 1, πίνακας 2, κ.ο.κ.). Οι πίνακες δακτυλογραφούνται σε διπλό διάστημα και σε ξεχωριστή σελίδα ο καθένας. Η έκταση κάθε πίνακα καλόν είναι να μην υπερβαίνει τη μία σελίδα. Όλοι οι πίνακες πρέπει να έχουν λεζάντες, οι οποίες γράφονται στο άνω μέρος της αντίστοιχης σελίδας. Τυχόν επεξηγήσεις αναφέρονται με παραπομπές στο τέλος του πίνακα.

Στην **ονοματολογία** και στις **μονάδες μέτρησης**, οι φαρμακευτικές ουσίες αναφέρονται με την χημική και όχι την εμπορική ονομασία τους. Οι μονάδες των διαφόρων μεγεθών αναφέρονται με τους διεθνώς παραδεκτούς συμβολισμούς και όχι με τις ελληνικές ονομασίες τους. Για παράδειγμα, γράφεται κύτταρα/μl και όχι κύτταρα κ.κ.χ. Η ονοματολογία των βακτηρίων είναι αυτή που αναφέρεται στο: *Approved lists of Bacterial names* (Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, ed. American Society for Microbiology (1989) και στο *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Τα ονόματα των ιών θα πρέπει να είναι τα εγκεκριμένα

από τη διεθνή επιτροπή για την ταξινόμηση των ιών (ICTV), όπως αναφέρονται στο *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses, Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses* (van Regenmortel et al, ed. Academic Press, San Diego, Calif, 2000).

Οι **ανασκοπήσεις** ακολουθούν τις ίδιες προηγούμενες γενικές οδηγίες εκτός της κεφαλαιοποίησης που είναι ανάλογη του θέματος (δεν ακολουθείται δηλ. η κεφαλαιοποίηση «εισαγωγή, υλικό και μέθοδοι, αποτελέσματα συζήτησης»).

Οι **επιστολές προς την Σύntαξη** και τα **άρθρα της Σύntαξης** ακολουθούν τις προηγούμενες γενικές οδηγίες, εκτός του γεγονότος ότι δεν έχουν περιληψη ή κεφαλαιοποίηση (υποβάλλονται σε μια ενιαία παράγραφο).

Διαδικασία κρίσης

Όλες οι εργασίες που υποβάλλονται κρίνονται από τουλάχιστον έναν εξωτερικό κριτή και από την ομάδα σύntαξης του περιοδικού. Οι κριτές μπορεί να αποτελούν μέλη της Συντακτικής Επιτροπής ή να είναι άλλοι, ειδικοί για το θέμα, επιστήμονες. Καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια η κρίση για την αποδοχή, την τροποποίηση ή την απόρριψη μια υποβληθείσας εργασίας να ολοκληρώνεται σε εύλογο χρονικό διάστημα (τρεις έως τέσσερις εβδομάδες) από την ημερομηνία υποβολής της. Όλη η αλληλογραφία πραγματοποιείται μέσω της ηλεκτρονικής διεύθυνσης (email) του υπεύθυνου συγγραφέα, γι' αυτό τον λόγο ένας ενεργός λογαριασμός ηλεκτρονικού ταχυδρομείου είναι απολύτως απαραίτητος. Σε περίπτωση που οι κριτές ζητήσουν διορθώσεις ή προτείνουν αλλαγές, το τελικό διορθωμένο κείμενο υποβάλλεται εκ νέου από τον υπεύθυνο συγγραφέα, σε διάστημα τριών εβδομάδων από την επιστροφή του για τροποποίηση και συνοδευόμενο από επιστολή στην οποία θα αναφέρονται σημείο προς σημείο όλες οι αλλαγές στο κείμενο, καθώς και η αιτιολογημένη αποδοχή ή απόρριψη των προτάσεων των κριτών. Μετά την τελική αποδοχή, η μελέτη αποστέλλεται στο τυπογραφείο. Οι συγγραφείς, εφόσον το επιθυμούν, δύνανται να λάβουν τυπογραφικά δοκίμια για έλεγχο. Τα δοκίμια πρέπει να επιστρέφονται στο Τυπογραφείο σε τρεις



το πολύ ημέρες με την χρήση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου. Εφόσον οι συγγραφείς επιθυμούν ανάτυπα, θα πρέπει να αποστείλουν επιστολή που θα δηλώνουν τον αριθμό ανατύπων που επιθυμούν. Η σχετική δαπάνη βαρύνει εξ ολοκλήρου τους συγγραφείς. Δεν επιτρέπεται αλλαγή του κειμένου στο στάδιο των τυπογραφικών δοκιμίων χωρίς την άδεια της Σύνταξης.

Δήλωση άδειας έκδοσης

Μετά την οριστική αποδοχή του άρθρου προς δημοσίευση, ο υπεύθυνος συγγραφέας θα πρέπει να

συμπληρώσει και να υπογράψει την επιστολή ανάθεσης της άδειας έκδοσης που μπορεί να βρει στην ιστοσελίδα της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας. Η συμπληρωμένη φόρμα θα πρέπει να ταχυδρομηθεί (κατά προτίμηση με συστημένη επιστολή ή υπηρεσία ταχυμεταφοράς) στην διεύθυνση «Συντακτική Επιτροπή, Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, ASCENT IKE, Μιχαλακοπούλου 29, 115 28, Αθήνα». Σημειώνεται εδώ ότι μόνο μετά την παραλαβή της επιστολής θα ξεκινάει η διαδικασία ενσωμάτωσης του άρθρου στο επόμενο τεύχος και η στοιχειοθέτησή του.

JOURNAL OF THE HELLENIC MICROBIOLOGICAL SOCIETY

Instructions to authors

General features – Scope of the Journal

The *Journal of the Hellenic Society for Microbiology (Journal of HMS)* is the official Journal of the Hellenic Society for Microbiology, aiming at the constant education of Biopathologists, Clinical Microbiologists, as well as of every scientist involved in Laboratory and Clinical Medicine. The *Journal of the Hellenic Society for Microbiology* is a quarterly peer-reviewed journal, cited in Scopus® database.

Its main objective is the publication of studies in Greek and/or English language, which are relevant to all fields of Clinical Microbiology (Bacteriology, Parasitology, Mycology, Virology) and to the other subspecialties of Medical Biopathology (Laboratory Haematology- Blood Donation, Medical Biochemistry and Immunology). In addition, *Journal of HMS* is an appropriate forum for the publication of information related to the role of the laboratory in both the management of infectious diseases and the elucidation of the epidemiology of infections. Manuscripts which present the results of original scientific investigations are encouraged. Finally, *Journal of HMS* welcomes submission of manuscripts which describe novel molecular methods for use in the diagnosis or elucidation of infections. The Journal does not charge page or article processing or any other fees to the authors. All articles are available over the Internet after publications as Open Access.

Access to the Journal

All members of the Hellenic Society for Microbiology can access the journal through the HMS website (<https://acta.hms.org.gr/>).

Submission procedure for publication

Submit your manuscript through our online system www.hms.org.gr (Journal/Submission). Manuscripts received by post, regardless of whether compleme-

nted with an electronic file or not, will not be taken into consideration.

Submitted manuscripts must be accompanied by a relevant personal statement of the author confirming that all authors involved have read the manuscript and agree with its submission, and that neither the article nor a substantial part of it have been published or submitted for publication elsewhere. In addition, any conflict of interest among all authors has to be mentioned. Upon its receipt, the manuscript will be checked for its integrity; a reply e-mail will then be sent to the author in charge of the correspondence.

Types of papers for publication

The following types of articles are published in the journal:

Original articles: contain the results of prospective or retrospective laboratory, epidemiological or clinical studies which are published for the first time. The length of the text -excluding literature- should not exceed 5,000 words, four to five tables or figures and 35 bibliographical references.

Short communication: generally share the same structure as research papers, but their length is smaller and does not exceed 1,800 words, two tables or figures and 15 bibliographical references. They relate to studies that do not justify the scope of a full research paper. The Editorial Board reserves the right to ask the authors to convert a research paper into a short-form paper, upon a relevant proposal by the respective referees, when they consider that the topic does not justify the original length. The authors may submit their work in the form of short papers from the outset.

Case reports: include new or very rare cases of diseases, rare occurrences and the implementation of



new diagnostics criteria or new therapeutic methods. The length of the text should not exceed 1,500 words two tables or figures and 15 bibliographical references.

Review articles: modern medical issues are analyzed, where the latest developments are presented or the conclusions of series of research studies by the authors are listed. Review articles are written by one or more authors, according to their theme. The main text should not exceed 10,000 words, including up to 100 references.

Letters to the Editors: contain opinions or comments on published studies, etc. Their length should be no more than 500 words, including up to 5 references.

Editorial articles: brief articles commenting on or assessing contemporary issues, published upon invitation by the Editorial Board. Their length should not exceed 1,000 words and 10 references.

Defining the author of an article

The author of an article is defined as the person who has assisted in designing and/ or carrying out a specific research presented in the article, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)

[http://www.icmje.org/ethical_1author.html].

The journal considers all authors, irrespective of the order of appearance, as equally bearing full responsibility of an article, including its title and order of appearance of other authors. Any individuals who offered specific equipment or facilities, clinical or reference strains, consumables or reagents, financial assistance through public or private financing, or who completed questionnaires, do not meet the criteria of an author and cannot be defined as such. Moreover, individuals who commented, edited or advised during the writing process of the article cannot be included as authors. Rather, these individuals can be mentioned in the *Acknowledgements* section. Working groups can be included as auth-

ors, provided that all group members fulfill the criteria mentioned above. Finally, it is explicitly stated that no individual can be included as an author *honoris causa*, because of a position that he/she holds. Any disputes that arise with regard to the inclusion of an individual as an author or to the authors' order of appearance in an article, will automatically trigger the suspension of the evaluation process until these disputes are resolved, either by all authors or by the competent bioethics and ethics committee of the institution of origin of the article.

Acknowledgements

The inclusion of individuals in the *Acknowledgements* section must have been approved by the former beforehand. In case of material which has been published in any other manner and is subject to copyright provisions, the way in which this material and the permission to publish it were acquired has to be indicated in detail. Any relevant funding, either from public or private sources, must be explicitly stated.

Conflict of interest

All authors must state any conflict of interest in the article, regarding the study under publication, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE):

[http://www.icmje.org/ethical_4conflicts.html].

Any source of funding with direct or indirect implications of biased conclusions has to be mentioned, along with any financial activity that could be associated with the study (for instance –and not exclusively– previous shareholding or participation in Boards of Directors, financing of lectures by specific companies whose products are examined in the study, etc.). Nonexistence of conflicting interests should also be mentioned. At this point, it should be noted that all details regarding conflicting interests are not published together with the article; instead, the Editorial Board shall retain them under strict confidentiality. In the latter case, the article will be accompanied by a generic phrase, e.g. "Author XX re-

ceived support from the company YY for research purposes, or for lectures at conferences, etc.” Failure to comply with this guideline will result in the article being returned to its authors for completion, before its scientific evaluation. Should an undeclared conflict of interest emerge ex post, the Editorial Board reserves the right to report it in the next issue, in the form of “Author XX did not state a potential conflict of interest concerning article ZZ and company YY”.

Guidelines for writing articles

Regarding the writing of articles, the journal complies with the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [http://www.icmje.org/urm_main.html].

Failure of the authors to comply with these guidelines can lead to the article being returned for adjustments and resubmission, prior to its evaluation.

With the use of a computer and word processing software, the manuscript is typed on A4 page format (212 x 297 mm) with margins on both sides of at least 2,5 cm, double-spaced and with continuous line numbering in the left margin (Menu: Page Layout > Line Numbers > Continuous).

Research papers, Short-form papers and Interesting cases should have a common structure and include the following sections in a single text file (word, text or other): title page, Greek abstract with key words (for manuscripts in Greek), English abstract with key words, main body of the text, acknowledgements, declaration of competing interests, declaration of authorization by the competent Bioethics Committee and/ or the National Organization for Medicines (for Greek authors EOF) (when required, in accordance with current legislation, in the case of interventionist research papers), references, tables and image captions. Images have to be submitted in separate files, in accordance with the instructions that follow.

The **title page** is the first page of the article and includes: (a) the title of the article, where no abbreviations can be used, (b) the names of the authors (full name and surname), (c) the laboratory or clinic

and hospital or institution where the study was carried out, (d) the full address of the author in charge of correspondence, including a telephone and fax number and an active e-mail address, and (e) a brief title no longer than 40 characters including spaces. All the above information should be provided first in Greek and then in English.

The **abstract** has to be between 250 and 400 words (except for interesting cases where the abstract should not exceed 250 words) in the Greek and English language (for a Greek speaking article) or solely in English (for an English speaking article) and it should be divided into four paragraphs (Aim of the study, Materials and Methodology, Results, Conclusions). **Three to six key words** are listed below the abstract both in Greek and/or English (as mentioned above), which must correspond to the international terms of *Index Medicus* and be attributable to Greek according to IATROTEK (MeSH-Hellas-Biomedical Terminology).

The main body of the text, for the **Research papers** and the **Short-form papers**, must be divided into sections: **Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion**. For the **Interesting Cases format** it should be divided into the following sections: **Introduction, Case Description, Comments or Discussion**.

In the **Materials and Methods section**, the way in which the material or patients were selected is described in detail, as well as the methods implemented, in order for other researchers to be able to reproduce the research. In case that the research involves people, compliance with the Declaration of Helsinki (1975) has to be stated, whereas it should also be defined whether the study has been approved by the respective Bioethics and Ethics Committee and the respective decision No has to be quoted (please see below).

In the **Results section**, the results have to be mentioned analytically in the form of either text or tables (as concisely as possible, without repetitions). The results can then be compared with the results of other studies in the **Discussion section**, where



the conclusions stemming from these results will also be mentioned. According to the length of the article, the **Results and Discussion sections** can be merged into a single section (Results-Discussion).

The **Acknowledgements section** has to be addressed to individuals with substantial contribution to the realization of the research, as mentioned above.

The **declaration of competing interests** should be analytical for all authors involved.

The declaration of authorization by the competent Bioethics Committee or the National Organization for Medicines (for Greek authors-EOF) (when required in accordance with current legislation, e.g. for interventionist research papers, research involving patients, studies of patients-witnesses, etc.) must include the protocol number and date of authorization. It is made clear that no research can be published for which the authors requested retroactive authorization for work that had already been carried out. Epidemiological studies, antimicrobial resistance control reports, comparisons between laboratory methodologies and cases reports constitute types of research that require no such authorization.

References follow the international Vancouver system (Vancouver reference style). Due to the fact that the referencing of articles from their websites of origin does not fully transfer all typefaces used (e.g. special lettering), the authors should refer to the relevant printed text in order to ensure proper referencing, either in printed or in electronic format (.pdf files). The authors of an article are all held equally responsible for the proper reproduction of references, whereas the Editorial Board of the journal does not check references for their typographical accuracy. In case of any request by a third party to correct a reference error after the final print of the respective issue of the journal, the financial cost is entirely borne by the authors. The numbering of references follows the sequence in which they appear

in the text, using Arabic numerals, in the form of superscripts and following punctuation (e.g.: this was originally observed by Jones *et al.*⁴ and has been confirmed by other studies as well.^{5,7,8-12}).

Published journal articles: The surnames of the authors are written first along with the initials of their names without dots, followed by the title of the journal in its abbreviated form in italics, then by the year, volume number (without the issue number in parentheses) and pages (e.g. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:662-685). When the authors are more than six, the first six names are listed and followed by the phrase "*et al.*" in italics (e.g. Garcia HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Diaz 5 JF *et al.* Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:152-157). When mentioning the name of an author within the text, only their surname is given. If the authors are two, the word "and" should be placed between their surnames. When an article is unsigned, instead of the names of the authors the word "Anonymous" is used. For electronic journals with no page numbers, or whenever this is possible, the DOI (Digital Object Identifier) code should follow the abbreviated title of the journal (e.g. Kalil AC. *Is cefepime safe for clinical use? A Bayesian viewpoint.* *J Antimicrob Chemother* 2011; doi: 10.1093/jac/dkr 138).

Journal articles under publication: these are articles which have been approved and pending final publication. The previous instructions should be followed, whereas the abbreviated journal title is followed by the phrase "in press" or "under publication". When an article is published during the evaluation process, the authors are responsible for renewing the reference by mentioning the relevant journal details (issue, page numbers or DOI).

PhD thesis, book chapters or equivalent: the reference includes the name of the author, title, publication edition (in case of more than one editions), publisher, city of publication, year and page numbers. For book chapters, the title of the book must

also be mentioned after the name of the publisher (e.g. Griffiths WD. Old world cutaneous leishmaniasis. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds). The leishmaniasis in biology and medicine. Vol. II. London, Academic Press, 1987:617-636).

Works in the form of notices at conferences (either oral or posted) are not included in literature, but they can be set out in the text in parentheses, as long as no more than two years have passed since their presentation, indicating the name of the first author, the conference and specific page(s) in the volume of the minutes of the conference (e.g. Junco B et al, XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal Diseases, Porto Heli, Greece, 2008, pp63). References to websites should be listed in a similar manner, further indicating the date of the authors' last access to the website (e.g. <http://www.mednet.gr/whonet>, cited 1 September 2015).

Photographs, figures, diagrams, etc. are defined as images (in case of photos) or graphs (in case of drawings) and they are listed in the corresponding points of the text and numbered in Arabic numerals (Figure 1, Figure 2, etc.). They are submitted in electronic format as individual image files (JPEG, TIFF, EPS, etc.) in the highest possible resolution (at least 300 dpi for black and white or color photos and 600 dpi for graphs containing drawings and letters) and not as attachments to the text file of the article. Their final admission requires approval after technical control. When images do not meet the specifications, the authors will be requested to resubmit them. Image captions should be written together on a separate page in the text.

All **tables** are listed in the corresponding points of the text and numbered in continuous Arabic numerals (Table 1, Table 2, etc.). The tables must be typed using double-spacing, at the end of the manuscript, after the references, in the same file. Each table should fit in one page. All tables must be accompanied by captions, which are written in the upper part of the corresponding page. Any clarifica-

tions are listed as references at the end of the table.

As far as **nomenclature** and **units of measurement** are concerned, pharmaceutical substances are mentioned by their chemical rather than by their brand name. The various units of measurement are referred to according to the internationally acceptable standards. The nomenclature of bacteria can be found in: Approved lists of Bacterial names (Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, ed. American Society for Microbiology (1989) and in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. The nomenclature of viruses has to be approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), as referred to in Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses, Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses (van Regenmortel et al, ed. Academic Press, San Diego, Calif, 2000).

Reviews follow the same general guidelines except for their structure, which should be analogous to the subject (i.e. the "introduction, materials and methodology, results, discussion" structure is not applicable).

Letters to the editors and Editorial articles conform to the general guidelines laid out above, apart from the fact that they have no abstract and no individual sections (instead, they are submitted in a single paragraph).

Evaluation process

All submitted manuscripts are evaluated by at least one external reviewer, as well as by the Editorial Board. The reviewers may be members of the Editorial Board or other scientists who are experts on the respective subject. Every effort is made so as to complete the evaluation process within a reasonable time (three to four weeks) from the date of its submission, regardless of whether the paper is accepted or rejected, or has to be modified. All correspondence takes place via the e-mail of the author in charge and therefore an active e-mail account is necessary. In case that the reviewers request cor-



rections or suggest modifications, the final amended version will be resubmitted by the author in charge, within three weeks from its return and accompanied by a relevant letter stating all modifications made in the text point by point, as well as the reasoned acceptance or rejection of the reviewers' proposals. Following its final acceptance, the manuscript is sent for printing. If they wish, the authors may receive printing proofs for checking. The proofs have to be resent to the printing office by e-mail within three days at the most. If the authors wish to receive reprints, they should send a letter stating the number of desired copies. The relevant expense is borne entirely by the authors. Extensive changes cannot be performed while in the process

of proof reading without prior permission by the Editorial Board.

Declaration of publication permission

After the final acceptance of the article for publication, the author in charge must fill in and sign the letter of publication and printing permission, which can be found on the Hellenic Society for Microbiology website (www.hms.org.gr). The completed form should be mailed (preferably by registered mail or courier) to the address: "Editorial Board, Journal of Hellenic Society for Microbiology, Ascent, 29 Michalakopoulou 11528, Athens, Greece". It should be noted here that the article will be sent to the printer's only after the letter of permission has been received.