

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ (mecC) ΚΑΙ ΤΩΝ

ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ (MRSA)

ΑΠΟ ΣΦΑΓΕΙΟ ΧΟΙΡΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ»

ΣΟΦΙΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ
ΠΕΞΑΡΑ ΑΝΔΡΕΑΝΑ
ΠΑΠΠΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2024

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σημαντικοί όροι: *Staphylococcus aureus*, MRSA, *mecC*, λύματα, ανθεκτικότητα, RT-PCR

Η ραγδαία αύξηση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, όλο και περισσότερων στελεχών βακτηρίων, αποτελεί μια σημαντική πρόκληση στη σύγχρονη ιατρική και παράλληλα έναν μεγάλο κίνδυνο στα πλαίσια της Δημόσιας και Ενιαίας Υγείας. Ειδικότερα, ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) αποτελεί ένα σημαντικό παθογόνο, υπεύθυνο για λοιμώξεις σε νοσοκομειακές μονάδες αλλά και στην κοινότητα. Στελέχη από τον Σταφυλόκοκκο, είναι δυνατό να βρεθούν, μέσω των αποβλήτων, σε επιφανειακά ύδατα και στην ατμόσφαιρα, με αποτέλεσμα «εμπλουτίζεται» η περιβαλλοντική δεξαμενή των γενετικών καθοριστικών παραγόντων αντιβιοαντοχής και παθογένειας.

Σκοπός εργασίας

Η μελέτη αυτή έχει ως σκοπό τον έλεγχο της παρουσίας και των χαρακτηριστικών των MRSA στελεχών σε λύματα από χώρους σφαγείων χοίρων στη Λάρισα. Για τη διερεύνηση αυτή, πραγματοποιείται εξέταση του φαινοτύπου των στελεχών αυτών, καθώς και ποσοτικοποίηση του *mecC* γονιδίου ανθεκτικότητας, με τη χρησιμοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου RT-PCR.

Υλικά και μέθοδοι

Για την παρούσα έρευνα, συγκεντρώθηκαν δείγματα λυμάτων πριν και μετά το στάδιο της επεξεργασίας τους από το σφαγείο τη Λάρισας. Στα δείγματα πραγματοποιείται εξαγωγή ολικού DNA και ακολούθως ποσοτικοποίηση του *mecC* γονιδίου μέσω RT-PCR. Στη συνέχεια, ακολουθεί απομόνωση των MRSA στελεχών με συγκεκριμένες καλλιεργητικές διαδικασίες και η ταυτοποίησή τους. Τα στελέχη που απομονώνονται, υφίστανται έλεγχο μικροβιακής αντοχής με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων, εμποτισμένων με αντιβιοτικά σε άγαρ (Kirby Bauer) σε έντεκα αντιβιοτικά.

Αποτελέσματα

Συνολικά εξετάστηκαν 26 δείγματα λυμάτων. Από τα προαναφερθέντα δείγματα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δεκαεννιά (19) στελέχη ανθεκτικά MRSA, από τα

οποία 12 προ της επεξεργασίας τους (12/13) σε ποσοστό 92,31% και 7 μετά την επεξεργασία τους (7/13) σε ποσοστό 53,85% .

Τα δεκαεννιά (19) στελέχη που καταγράφηκαν ως MRSA εξετάστηκαν με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων ως προς την ευαισθησία τους σε 10 αντιβιοτικά. Η πλειοψηφία (12/19, 63,16%) των στελεχών που απομονώθηκαν, εμφανίστηκαν πολυανθεκτικά, καθώς παρουσίασαν αντιβιοαντοχή προς τουλάχιστον 5 από τις 10 αντιβιοτικές ουσίες.

Αναλυτικότερα παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά αντοχής στα πενικιλίνη G (1 µg) (100,0%), κεφοξιτίνη (30 µg), τετρακυκλίνη (30 µg) (100,0%), κλινταμυκίνη (2 µg) (73,6%), σιπροφλοξασίνη (5 µg) (68,4%), ερυθρομυκίνη (15µg) (52,6%) χλωραμφαινικόλη (30 µg) (22%) που συγκαταλέγονται ως «Κρίσιμης και Υψηλής Σημαντικότητας για την Ανθρώπινη Υγεία Αντιμικροβιακές Ουσίες» από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζουν τα λύματα των σφάγιων χοίρου ως σημαντική δεξαμενή ανθεκτικών στελεχών MRSA, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να διαδοθούν ευρύτερα στη φύση και τελικά στην ανθρώπινη κοινότητα, καθιστώντας την προσέγγιση «Ενιαίας Υγείας» περισσότερο αναγκαία από ποτέ στο παρελθόν.

ABSTRACT

Keywords: Staphylococcus aureus, MRSA, mecC, wastewater , resistance, RT-PCR

The rapid increase in antibiotic resistance of an increasing number of bacterial strains is a major challenge in modern medicine and at the same time a major risk in the context of Public and Unified Health. In particular, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is an important pathogen responsible for infections in hospital units and in the community. Staphylococcus aureus strains can be found, through waste, in surface water and in the atmosphere, thus 'enriching' the environmental reservoir of genetic determinants of antibiotic resistance and pathogenicity.

Objective

The purpose of this study is to monitor the presence and characteristics of MRSA strains in wastewater from pig slaughterhouse premises in Larissa. For this investigation, an examination of the phenotype of these strains, as well as quantification of the *mecC* resistance gene, is performed using the RT-PCR real-time polymerase chain reaction.

Materials and Methods

For the present study, samples of wastewater before and after the treatment stage were collected from the Larissa slaughterhouse. Total DNA extraction is performed on the samples followed by quantification of the *mecC* gene by RT-PCR. This is followed by isolation of MRSA strains by specific culture procedures and their identification. The isolated strains are subjected to antimicrobial resistance testing by the agar-agar (Kirby Bauer) antibiotic-soaked disk diffusion method on eleven antibiotics.

Results

A total of 26 wastewater samples were examined. Nineteen (19) MRSA strains were isolated and identified from the above samples, of which 12 before their treatment (12/13) at a rate of 92.31% and 7 after their treatment (7/13) at a rate of 53.85% .

The nineteen (19) strains identified as MRSA were investigated by the disk diffusion method for their susceptibility to 10 antimicrobial agents. The majority (12/19, 63.16%) of the isolated strains were multiresistant, having shown resistance against at least 5 out of 10 antimicrobial substances.

In particular, high rates of resistance to penicillin G (1 µg) (100.0%), cefoxitin (30 µg), tetracycline (30 µg) (100.0%), clindamycin (2 µg) (73.6%), ciprofloxacin were observed (5 µg) (68.4%), erythromycin (15 µg) (52.6%) chloramphenicol (30 µg) (22%) which are considered "Antimicrobial Substances of Critical and High Importance to Human Health" by the World Health Organization.

Conclusions

The results of the present study depict pig slaughterhouse sewage as a significant reservoir of resistant MRSA strains, while at the same time they can spread to the wider environment and ultimately to the human community, making the "One Health" approach more imperative than ever before.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
A.1 Η επιδημιολογική κατηγοριοποίηση του MRNA.....	7
A.1.1 Νοσοκομειακά MRSA Στελέχη (Hospital Associated - HA-MRSA).....	8
A.1.2 Τα στελέχη κοινότητας (CA-MRSA).....	8
A.1.3 Τα στελέχη ζωικού κεφαλαίου (Livestock Associated - LA-MRSA).....	9
A.2. MRSA σε λύματα.....	11
B. ΣΚΟΠΟΣ.....	16
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
Γ.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών	17
Γ.2 Μέθοδος Ελέγχου Αντοχής στα Αντιβιοτικά.....	17
Γ.3 Εξαγωγή ολικού DNA.	18
Γ.4 Έλεγχος της παρουσίας του γονιδίου mecC στα δείγματα λυμάτων	18
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	21
Δ.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών.....	21
Δ.2 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακές ουσίες.....	21
Δ.3 Παρουσία του γονιδίου mecC στα δείγματα λυμάτων που εξετάστηκαν	25
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	26
E.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών	26
E.2 Αντιμικροβιακή αντοχή των MRSA στελεχών.....	27
E.3 Ποσοτικοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας mecA σε λύματα	29
ΣΤ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	33

Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες για την σημαντική βοήθεια και την άψογη συνεργασία στον επιβλέποντα καθηγητή Σολωμάκο Νικόλαο και τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Πεξάρá Ανδρεάνα και Παππά Ιωάννη.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σταφυλόκοκκος συγκροτεί ένα γένος βακτηρίων που περιλαμβάνει πολλά είδη, με τον *Staphylococcus aureus* να αποτελεί ένα από τα πλέον παθογόνα και κλινικά σημαντικά είδη. Η οικογένεια των *Staphylococcaceae* περιλαμβάνει επικίνδυνα παθογόνα που μπορούν να προκαλέσουν από απλές δερματικές λοιμώξεις έως σοβαρές μολύνσεις του αίματος και των ιστών. Ο *Staphylococcus aureus*, συγκεκριμένα, αποτελεί ένα από τα πιο παθογόνα είδη του γένους και έχει καταγραφεί να προκαλεί μια ευρεία γκάμα μολύνσεων στον άνθρωπο και τα ζώα. Εξαιτίας της ικανότητάς του να προκαλεί επικίνδυνες καταστάσεις για την υγεία του ανθρώπου, ο *S. aureus* αντιμετωπίζεται με μεγάλο ενδιαφέρον από την Ιατρική και Επιστημονική κοινότητα. Η ιδιότητα που τον καθιστά τόσο επικίνδυνο είναι η ικανότητά του να αναπτύσσει αντίσταση σε πολλά αντιβιοτικά, καθιστώντας τις μολύνσεις που προκαλεί ιδιαίτερα δύσκολες στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία τους, ενώ αυξάνει τον κίνδυνο σοβαρών επιπλοκών. Επομένως, η κατανόηση της βιολογίας, των μηχανισμών αντοχής και της επιδημιολογίας του *S. aureus* αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας βήμα για μια ουσιαστική προσέγγιση του θέματος αυτού.

Εκτός από τον *S. aureus*, αξίζει να γίνει αναφορά και σε κάποια άλλα σημαντικά είδη σταφυλοκόκκων, όπως ο *Staphylococcus epidermidis* ο οποίος ανήκει στην φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπινου δέρματος. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει μολύνσεις σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή ή σε ασθενείς με ιατρικές συσκευές, όπως εμφυτεύματα καρδιάς ή καθετήρες. Άλλα είδη είναι ο *Staphylococcus saprophyticus* και ο *Staphylococcus haemolyticus* ο οποίος είναι συνήθως ανθεκτικός σε πολλά αντιβιοτικά και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές παθήσεις, ιδίως σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή. Ο σταφυλόκοκκος είναι ένας σφαιρικός μονοκύτταρος οργανισμός που μπορεί να εμφανίζει διάφορες διαστάσεις ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξής του. Το κυτταρικό τοίχωμα του σταφυλοκόκκου αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, οι οποίοι προσδίδουν ανθεκτικότητα και διαμορφώνουν την μορφή του κυττάρου.

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του είναι η ικανότητά του να αναπτύσσει αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά. Αυτή η αντοχή συχνά οφείλεται σε μηχανισμούς όπως η παραγωγή ενζύμων που αποσυνθέτουν τα αντιβιοτικά ή συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της εισόδου του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου. Πιο αναλυτικά, ορισμένα στελέχη του *S. aureus* παράγουν β-λακταμάσες, ένζυμα που υδρολύουν τον δακτύλιο της β-λακτάμης που βρίσκεται στα αντιβιοτικά β-λακτάμης, όπως οι πενικιλλίνες και οι

κεφαλοσπορίνες. Τα ένζυμα αυτά καθιστούν τα αντιβιοτικά αναποτελεσματικά έναντι των βακτηρίων. Ένας άλλος μηχανισμός είναι η μεταβολή των πρωτεϊνών που δεσμεύουν την πενικιλίνη (PBPs). Ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) και άλλα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη έχουν αποκτήσει ένα γονίδιο που ονομάζεται *mecA*, το οποίο κωδικοποιεί μια τροποποιημένη πρωτεΐνη δέσμευσης πενικιλίνης (PBP2a).

Ένα άλλο μέσο που χρησιμοποιεί ο Σταφυλόκοκκος *aureus* είναι οι αντλίες εκροής, μέσω των οποίων, μπορεί να αντλεί τα αντιβιοτικά από το βακτηριακό κύτταρο. Αυτές οι αντλίες απομακρύνουν τα αντιβιοτικά από το κύτταρο προτού μπορέσουν να ασκήσουν τα αντιμικροβιακά τους αποτελέσματα, μειώνοντας τη συγκέντρωση των αντιβιοτικών εντός του βακτηριακού κυττάρου και συμβάλλοντας έτσι τελικά στην ανθεκτικότητα. Επιπρόσθετα, Ο *S. aureus* μπορεί να τροποποιήσει τις θέσεις-στόχους των αντιβιοτικών, όπως το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα ή τα ριβοσώματα, για να εμποδίσει την αποτελεσματική δέσμευση των αντιβιοτικών. Για παράδειγμα, οι μεταβολές στις πρωτεΐνες που δεσμεύουν την πενικιλίνη μπορούν να αποτρέψουν τη δέσμευση των αντιβιοτικών β-λακτάμης και την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Παράλληλα, έναν άλλο σημαντικό μηχανισμό ανθεκτικότητας, αποτελεί ο σχηματισμός βιοφίλμ, πολύπλοκων βακτηριακών δομών, δηλαδή, ενσωματωμένων στην εξωκυτταρική επιφάνεια. Τα βιοϋμένια παρέχουν προστασία έναντι των αντιβιοτικών και της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, καθιστώντας δύσκολη την εξάλειψη των βακτηριακών λοιμώξεων.

Μεταξύ των βασικών μηχανισμών ανάπτυξης ανθεκτικότητας, βρίσκεται η οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας. Ο *S. aureus* μπορεί να αποκτήσει γονίδια ανθεκτικότητας μέσω μηχανισμών οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, όπως η σύζευξη, ο μετασχηματισμός και η μεταγωγή. Αυτό επιτρέπει στα βακτήρια γενικότερα να αποκτούν και τα μεταφέρουν γρήγορα χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας από και προς άλλα βακτήρια στο περιβάλλον τους. Τέλος, άλλοι 2 μηχανισμοί αύξησης της αντοχής είναι η ρύθμιση παραγόντων ιογένεσης και γονιδίων ανθεκτικότητας σε σχέση με την κυτταρική πυκνότητα, αλλά και οι γενετικές μεταλλάξεις στο βακτηριακό γονιδίωμα.

Η παθογένεια του *S. aureus* περιλαμβάνει μια πολύπλευρη αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηριακών παραγόντων μολυσματικότητας και ανοσολογικών αποκρίσεων του ξενιστή. Ο *S. aureus* είναι ένα εξαιρετικά ευπροσάρμοστο παθογόνο ικανό να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, από επιφανειακά δερματικά αποστήματα έως απειλητικές για τη ζωή συστηματικές νόσους όπως η σήψη και η ενδοκαρδίτιδα. Ο *Staphylococcus*

aureus αποικίζει αρχικά τις επιθηλιακές επιφάνειες του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένου του δέρματος και των βλεννογόνων, μέσω μηχανισμών προσκόλλησης που διαμεσολαβούνται από επιφανειακές πρωτεΐνες όπως οι προσκολλητίνες και τα συστατικά της μικροβιακής επιφάνειας που αναγνωρίζουν μόρια προσκολλητικής μήτρας (MSCRAMMs). Αυτές οι πρωτεΐνες διευκολύνουν τη σύνδεση με τους υποδοχείς των κυττάρων του ξενιστή, επιτρέποντας στα βακτήρια να εγκαθίστανται και να αντιστέκονται στη μηχανική απομάκρυνση.

Ο *S. aureus* παράγει μια σειρά εξωτοξινών, ενζύμων και κυτταρολυτικών παραγόντων που συμβάλλουν στην εισβολή και τη βλάβη των ιστών. Αυτοί οι παράγοντες μολυσματικότητας περιλαμβάνουν αιμολυσίνες, λευκοσιδίνες, πρωτεάσες και υπεραντιγόνα. Οι αιμολυσίνες διαταράσσουν τις κυτταρικές μεμβράνες του ξενιστή, ενώ οι λευκοσιδίνες στοχεύουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας σε κυτταρική λύση και καταστροφή των ιστών. Οι πρωτεάσες αποικοδομούν τις πρωτεΐνες του ξενιστή, διευκολύνοντας την εξάπλωση των βακτηρίων και την αποφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης. Τα υπεραντιγόνα ενεργοποιούν μια ισχυρή ανοσολογική απόκριση, οδηγώντας σε υπερβολική φλεγμονή και βλάβη των ιστών.

Επιπρόσθετα, ο σταφυλόκοκκος *aureus* χρησιμοποιεί διάφορες στρατηγικές για να αποφύγει και να διαμορφώσει τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή. Μπορεί να αντισταθεί στη φαγοκυττάρωση από τα φαγοκύτταρα μέσω της παραγωγής επιφανειακών πρωτεϊνών που αναστέλλουν την οψωνοποίηση και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Επιπλέον, μπορεί να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί εντός των φαγοκυττάρων, επιτυγχάνοντας να αποφύγει τις άμυνες του ξενιστή και να διαδοθεί εντός του. Το βακτήριο ρυθμίζει επίσης την παραγωγή κυτταροκινών και τα μονοπάτια σηματοδότησης για να υπονομεύσει τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή, προωθώντας την επιβίωση και την εμμονή του.

Παράλληλα, ο *Staphylococcus aureus* παράγει μια ποικιλία εξωτοξινών που συμβάλλουν στην παθογένεια ασθενειών που προκαλούνται από τοξίνες. Αυτές οι τοξίνες περιλαμβάνουν τις σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (SEs), την τοξίνη-1 του συνδρόμου τοξικού σοκ (TSST-1) και τις απολεπιστικές τοξίνες (ETs). Οι SEs και η TSST-1 προκαλούν τροφική δηλητηρίαση και σύνδρομο τοξικού σοκ, αντίστοιχα, διεγείροντας την υπερβολική παραγωγή κυτταροκινών και τη συστηματική φλεγμονή. Οι ETs προκαλούν το σύνδρομο του σταφυλοκοκκικού ζεματισμένου δέρματος (SSSS)

διασπώντας τις πρωτεΐνες δεσμογλεΐνης στην επιδερμίδα, οδηγώντας στη χαρακτηριστική απολέπιση του δέρματος.

Η εκτεταμένη και αλόγιστη, σε αρκετές περιπτώσεις, χρήση αντιμικροβιακών ουσιών τόσο για την πρόληψη όσο και για τη αντιμετώπιση διαφόρων λοιμώξεων, καθώς και η χρησιμοποίησή τους ως ουσίες με ιδιότητες αυξητικών παραγόντων σε παραγωγικά ζώα, αλλά και η εφαρμογή τους στον γεωργικό τομέα τα προηγούμενα χρόνια, έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη και τη διάδοση ανθεκτικών στελεχών αλλά και γονιδίων ανθεκτικότητας ευρύτερα στο περιβάλλον. Η υπέρμετρη χρησιμοποίηση αυτών των παραγόντων, σε συνάρτηση με την υψηλή σταθερότητά τους, έχει λειτουργήσει ως επιλεκτική πίεση στον φυσικό βακτηριακό πληθυσμό, μετατρέποντάς τον ως έναν μείζονος σημασίας καθοριστικό παράγοντα στην ανάπτυξη, την εξάπλωση και τη διατήρηση της αντοχής στα αντιβιοτικά. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες έρευνες καταδεικνύουν πως οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων μπορούν πιθανόν να επιδράσουν καίρια στην εξάπλωση και την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών, καθώς αδυνατούν να αφαιρέσουν ή να εξαλείψουν πλήρως τους αντιμικροβιακούς παράγοντες ή τα εν λόγω βακτήρια.

Τα σφαγεία χοίρων διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη βιομηχανία επεξεργασίας κρέατος, παρέχοντας προϊόντα χοιρινού κρέατος στους καταναλωτές σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, τα λύματα που παράγονται από τις εγκαταστάσεις αυτές δημιουργούν ανησυχίες για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία λόγω της παρουσίας παθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου του *Staphylococcus aureus*. Η κατανόηση του επιπολασμού, της δυναμικής μετάδοσης και του προφίλ αντοχής στα αντιβιοτικά του *S. aureus* στα λύματα των σφαγείων χοίρων είναι ζωτικής σημασίας για τον μετριασμό των κινδύνων που συνδέονται με τη μόλυνσή τους. Πολυάριθμες μελέτες έχουν τεκμηριώσει την παρουσία του *Staphylococcus aureus* στα λύματα των σφαγείων χοίρων. Το υψηλό οργανικό φορτίο και η παρουσία ζωικών περιττωμάτων δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη και επιβίωση βακτηρίων στα λύματα. Ο *S. aureus* μπορεί να μολύνει τα υγρά απόβλητα κατά τη διάρκεια διαφόρων σταδίων της διαδικασίας σφαγής, συμπεριλαμβανομένων του εκσπλαχνισμού, του πλυσίματος των σφαγίων και της επεξεργασίας των λυμάτων.

Η μετάδοση του *Staphylococcus aureus* στα υγρά απόβλητα σφαγείων χοίρων μπορεί να συμβεί μέσω της άμεσης επαφής με μολυσμένες επιφάνειες, της αερολύμανσης των βακτηρίων κατά τη διάρκεια των δραστηριοτήτων επεξεργασίας και των ανεπαρκών πρακτικών υγιεινής. Η διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των σφαγίων και του

περιβάλλοντος, καθώς και μεταξύ των εργαζομένων και του εξοπλισμού, συμβάλλει περαιτέρω στην εξάπλωση του *S. aureus* στο περιβάλλον του σφαγείου. Τα στελέχη του *S. aureus* που απομονώνονται από τα λύματα των σφαγείων χοίρων παρουσιάζουν συχνά ανθεκτικότητα σε πολλαπλά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των β-λακταμών, των μακρολιδίων και των τετρακυκλινών. Η ευρεία χρήση αντιβιοτικών στις πρακτικές εκτροφής χοίρων συμβάλλει, μεταξύ άλλων, στην δημιουργία ανθεκτικών στελεχών, οδηγώντας στη διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά στο περιβάλλον. Οι διαδικασίες επεξεργασίας των λυμάτων μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην επιλογή και τη διάδοση στελεχών *S. aureus* ανθεκτικών στα αντιβιοτικά.

Η παρουσία του *Staphylococcus aureus* στα λύματα των σφαγείων χοίρων αποτελεί κίνδυνο για τη δημόσια υγεία μέσω της μόλυνσης του περιβάλλοντος και της πιθανής έκθεσης των κοντινών κοινοτήτων σε παθογόνα βακτήρια. Η εισπνοή ή η κατάποση μολυσμένων αερολυμάτων ή νερού μπορεί να οδηγήσει σε λοιμώξεις, ιδίως σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα ή προϋπάρχουσες συνθήκες υγείας. Επιπλέον, η διάδοση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών *S. aureus* από τα λύματα των σφαγείων στο περιβάλλον μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών θεραπειών για λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα. Ο μετριασμός των κινδύνων που συνδέονται με τη μόλυνση από *Staphylococcus aureus* στα λύματα των σφαγείων χοίρων απαιτεί ολοκληρωμένες στρατηγικές διαχείρισης. Η εφαρμογή αυστηρών πρωτοκόλλων υγιεινής, συμπεριλαμβανομένου του τακτικού καθαρισμού και της απολύμανσης του εξοπλισμού και των εγκαταστάσεων, μπορεί να συμβάλει στη μείωση της βακτηριακής μόλυνσης. Επιπλέον, η βελτιστοποίηση των διαδικασιών επεξεργασίας λυμάτων και η εφαρμογή προγραμμαμάτων αντιμικροβιακής διαχείρισης στις πρακτικές εκτροφής χοίρων μπορούν να ελαχιστοποιήσουν τη διάδοση στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά.

Η μόλυνση από *Staphylococcus aureus* στα λύματα των σφαγείων χοίρων εγείρει άλλον έναν προβληματισμό για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Η αντιμετώπιση του επιπολασμού, της δυναμικής μετάδοσης και του προφίλ ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά του *S. aureus* στα λύματα σφαγείων είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας και τον περιορισμό των κινδύνων από τη μόλυνση του περιβάλλοντος. Η εφαρμογή αποτελεσματικών στρατηγικών μετριασμού και η προώθηση βιώσιμων πρακτικών σε ολόκληρη τη βιομηχανία επεξεργασίας κρέατος αποτελούν κρίσιμα βήματα προς τη μείωση της μετάδοσης παθογόνων βακτηρίων και την προστασία της ανθρώπινης και περιβαλλοντικής υγείας.

Ο σταφυλόκοκκος, ένα κοινό παθογόνο βακτήριο που βρίσκεται στο περιβάλλον, το έδαφος, το νερό, τη σκόνη, τις επιφάνειες, τους ανθρώπους, τα ζώα και τα τρόφιμα. Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας των βλεννογόνων, του δέρματος και των νυχιών σε θηλαστικά και πτηνά. Παρά το γεγονός ότι αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας, ειδικά το ευκαιριακό παθογόνο *Staphylococcus aureus*, μπορεί να προκαλέσει από λιγότερο σοβαρές έως αρκετά σοβαρές λοιμώξεις λόγω της παραγωγής διαφόρων λοιμωδών παραγόντων. Μεταξύ όλων των ειδών *Staphylococcus*, ο *S. aureus* θεωρείται το πιο παθογόνο, που σχετίζεται με ένα ευρύ φάσμα νοσηρότητας, από ακίνδυνες δερματικές λοιμώξεις έως εξαιρετικά επικίνδυνες για τη ζωή ασθένειες όπως η ενδοκαρδίτιδα και η νεκρωτική πνευμονία. Αυτές οι παθολογικές καταστάσεις μπορούν να λάβουν χώρα όχι μόνο σε περιβάλλοντα υγειονομικής περίθαλψης αλλά πλέον και στην κοινότητα. Παρόλο που ο σταφυλόκοκκος *aureus* αποτελεί το αντιπροσωπευτικό είδος στο γένος, ο αρνητικός στην κοαγουλάση σταφυλόκοκκος (CoNS), κεντρίζει το ενδιαφέρον ως υπεύθυνος παράγοντας για λοιμώξεις.

Πριν από τη ριζική αύξηση στη ποικιλία των αντιβιοτικών ουσιών, οι λοιμώξεις από *S. aureus* ήταν συχνά θανατηφόρες. Με τη χρησιμοποίηση της πενικιλίνης αναβαθμίστηκε καίρια πρόγνωση για τους ασθενείς με βαριές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις. Ωστόσο, μετά από μια σειρά ετών χρήσης, σε κλινικό επίπεδο, αυτού του αντιβιοτικού, εμφανίστηκε αντοχή εξαιτίας της παραγωγής βήτα-λακταμασών. Η ημισυνθετική πενικιλίνη-μεθικιλίνη που εφαρμόστηκε μερικά χρόνια μετά, χαρακτηρίζεται από υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι των παθογόνων σταφυλόκοκκων. Ωστόσο, κατά τρόπο όμοιο με την πενικιλίνη, τα στελέχη ανέπτυξαν ειδική αντοχή σε αυτό το αντιβιοτικό μετά από αρκετά χρόνια χρησιμοποίησης. Επί του παρόντος, ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, καθώς είναι ανθεκτικός σε όλα τα αντιβιοτικά βήτα-λακτάμης και προκαλεί επιδημίες σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα στην Ευρώπη (π.χ. Ελλάδα, Ηνωμένο Βασίλειο), Ιαπωνία και Ηνωμένες Πολιτείες. Σε ορισμένες περιοχές, το 40-60% των μεμονωμένων στελεχών του *S. aureus* στα νοσοκομεία είναι MRSA.

Το γονίδιο το *mecA* ευθύνεται για την αντίσταση στη μεθικιλίνη στον MRSA, καθώς και για στους αρνητικούς στην κοαγουλάση ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκους (CoNS). Ο μόνος φορέας του *mecA* που περιγράφεται είναι το χρωμόσωμα της κινητής σταφυλοκοκκικής κασέτας (SCC*mec*). Εξαιτίας της ανεξάρτητης σε σχέση με το είδος διατήρησης του γονιδιακού συμπλόκου, η μεταφορά του

χρωμοσώματος της κασέτας πιστεύεται ότι συμβαίνει αρκετά συχνά. Το αντιβιοτικό εκλογής για τη θεραπεία λοιμώξεων από MRSA είναι η βανκομυκίνη, έναντι στην οποία, ωστόσο, έχουν εμφανιστεί ανθεκτικά στελέχη *S. Aureus*, γεγονός που τα τελευταία χρόνια αποτελεί μια μείζονος σημασίας ανησυχία για τη δημόσια υγεία, καθιστώντας τη θεραπεία των λοιμώξεων από MRSA δυσκολότερη. Γενικότερα, γίνεται αντιληπτό πως η συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στις αντιμικροβιακές ουσίες βακτήρια αυξάνεται παγκοσμίως και γίνεται μια από τις μεγαλύτερες ιατρικές προκλήσεις της εποχής μας.

A.1 Η ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ MRSA

Σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη του σταφυλόκοκκου MRSA σε συνδυασμό με την εμπλοκή του στη δημόσια υγεία, ταξινομείται σε 3 κύριες κατηγορίες (Hou et al., 2023) . **A) Τα νοσοκομειακά στελέχη (Hospital acquired - HA)**, από το 1961 έως και την δεκαετία του 1980 έκαναν την εμφάνισή τους σε υγειονομικές μονάδες και προσέβαλλαν κυρίως άτομα με προδιάθεση στα οποία προκαλούσαν συχνά σοβαρή νόσο. **B) Τα στελέχη κοινότητας (Community acquired - CA)** ανακαλύφθηκαν από τη δεκαετία του 1990 και μετά, ανευρίσκονται σε μέρη άσχετα με υγειονομικές δομές και δύνανται να προσβάλλουν υγιή πληθυσμό. Στα στελέχη αυτά η μετάδοση πραγματοποιείται μέσω στενής επαφής των ατόμων και παρουσιάζεται τροπισμός στο δέρμα και τους μαλακούς ιστούς. Με βάση μελέτες, τα νοσοκομειακά και κοινοτικά στελέχη επιβιώνουν στο νερό ποταμιών και θαλασσών το λιγότερο για 14 μέρες αφού ενοφθαλμιστούν. **Γ) Τα στελέχη ζωικού κεφαλαίου (Livestock acquired - LA)** εντοπίζονται στις αρχές της δεκαετίας του 2000 σε οικόσιτα ζώα. Κοινό χαρακτηριστικό απ' τις παραπάνω κατηγορίες των MRSA στελεχών αποτελεί η ικανότητα τους να προσαρμόζονται επιτυχώς στις περιβαλλοντικές μεταβολές, ανταλλάζοντας γενετικό υλικό με άλλους μικροοργανισμούς, μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Αυτή η «μετάδοση» καθοριστικών παραγόντων αντοχής μεταξύ κλινικά συναφών βακτηρίων, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τις αυξημένες ανεπιτυχείς θεραπείες. Ο κίνδυνος γίνεται ακόμη μεγαλύτερος, εάν αυτή η ανθεκτικότητα απευθύνεται σε κρίσιμα ή εξαιρετικά σημαντικά αντιμικροβιακά φάρμακα της ιατρικής.

A.1.1 Νοσοκομειακά MRSA Στελέχη (Hospital Associated – HA MRSA)

Σήμερα, ο ανθεκτικός στη Μεθικιλίνη σταφυλόκοκκος αποτελεί τον κύριο και πιο διαδεδομένο παράγοντα ενδοноσοκομειακών λοιμώξεων σε παγκόσμια κλίμακα. Τα πρώτα στελέχη του, απομονώθηκαν από ασθενείς σε νοσοκομεία τη δεκαετία του 1960. Πλέον, τα στελέχη αυτά έχουν «διαρρέυσει» εκτός των αμιγώς νοσοκομειακών δομών, όπως σε μονάδες υγειονομικής περίθαλψης (π.χ δομές μακροχρόνιας αποκατάστασης). Κρίσιμο σημείο αποτελεί η εμφάνιση ανθεκτικότητας στη μεθικιλίνη, αφού από τότε σημειώνεται μια τεράστια ενδοноσοκομειακή διάδοση ανθεκτικών στελεχών παγκοσμίως. Από τα στελέχη αυτά έχει καταγραφεί μια πληθώρα παθήσεων σε νοσηλευόμενους, όπως μικρές δερματολογικές λοιμώξεις, αποφολιδωτικό σύνδρομο αποκολλήσεως επιδερμίδας, σύνδρομο τοξικής καταπληξίας, πνευμονία, μετεγχειρητικές λοιμώξεις κτλ. Αυτές οι λοιμώξεις επιβαρύνουν την υγεία των ασθενών και τις υγειονομικές μονάδες αλλά και σε ένα ευρύτερο οικονομικό επίπεδο επιφέρουν δυσμενείς συνθήκες, δεδομένης της υψηλής νοσηρότητας, θνησιμότητας, κόστους νοσηλείας καθώς και της απουσίας από την εργασία. Σε αυτό έρχεται να συμφωνήσει και η έκθεση του O'Neill (2014), ο οποίος προειδοποιεί από τότε για κατακόρυφη αύξηση θανάτων αλλά και για τεράστιες οικονομικές απώλειες, εάν δεν ληφθούν μέτρα για το πρόβλημα της αντοχής.

A.1.2 Τα στελέχη κοινότητας (Community acquired – CA MRSA)

Τα στελέχη της κοινότητας κάνουν την εμφάνιση τους, περίπου 20 χρόνια πριν, οπότε και φαίνεται να προξενούν λοιμώξεις σε νέα, υγιή άτομα αλλά και σε ασθενείς που δεν ανήκουν σε ευάλωτες ομάδες, όπως στην περίπτωση των νοσοκομειακών στελεχών που αφορούσαν πληθυσμό με πρόσφατες νοσηλείες, αιμοκάθαρση, χρόνια προβλήματα υγείας, HIV και ναρκωτικά κ.α. Η πλειονότητα των στελεχών κοινότητας που απομονώθηκαν κλινικά, σχετίζονται με το δέρμα και τους μαλακούς ιστούς. Κύριες εκδηλώσεις τους, αποτελούν τα αποστήματα και η δοθιήνωση, ωστόσο έχουν συσχετιστεί με νεκρωτική πνευμονία, καταπλήξια, νεκρωτική απονευρωσίτιδα, σηψαιμία και εν τέλει θανάτους. Τα νέα αυτά MRSA στελέχη κοινότητας συχνά είναι ανθεκτικά στις β-λακτάμες, αλλά παράλληλα είναι ευαίσθητα σε διάφορες άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών και φέρουν κυρίως τις σταφυλοκοκκικές χρωμοσωμικές κασέτες (SCC mec) τύπου IV, V ή VII. Είναι αρκετά πιθανό, τα κοινοτικά MRSA στελέχη να διαθέτουν μοναδικούς

συνδυασμούς παραγόντων μολυσματικότητας, ενώ θεωρείται πως υπάρχει γενετική διαφορά από τα νοσοκομειακά ανθεκτικά στελέχη.

Υπάρχει δε η άποψη ότι τα MRSA στελέχη κοινότητας είναι αποτέλεσμα διαφορετικών γενετικών υπόβαθρων και όχι μιας παγκόσμιας εξάπλωσης ενός μόνο κλώνου, καθώς και ότι οι περισσότερες γενεαλογίες του σταφυλόκοκκου *Aureus* έχουν την ικανότητα να μετατραπούν σε MRSA στελέχη κοινότητας. Με βάση τα σημερινά δεδομένα, η διάκριση των MRSA στελεχών κοινότητας και των αντίστοιχων νοσοκομειακών τείνει να εξαληφθεί, καθώς αρκετές αναφορές κατέδειξαν πως τα CA-MRSA είναι ενδημικά σε αρκετές νοσοκομειακές μονάδες. Γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα των προηγούμενων χρόνων, αφού παλαιότερα τα κοινοτικά MRSA στελέχη είχαν σαφή διαφορά φαινοτυπικά και γονοτυπικά από τα νοσοκομειακά, ενώ απομονώνονταν μόνο από λοιμώξεις της κοινότητας. Έτσι σήμερα, τα MRSA στελέχη κοινότητας σταδιακά αντικαθιστούν τα αντίστοιχα νοσοκομειακά στελέχη, ως κύρια αιτία λοιμώξεων σε νοσοκομειακές και υγειονομικές μονάδες, αυξάνοντας παράλληλα το εύρος επικινδυνότητας και σε μη ευπαθή πληθυσμό (Sharif et al., 2024). Ειδικά για το νοσοκομειακό περιβάλλον, ενώ υπήρχε η άποψη πως τα MRSA στελέχη κοινότητας ήταν αδύνατο να επιβιώσουν, λόγω της ευαισθησίας τους σε παράγοντες διαφορετικούς από β-λακτάμες, καθίσταται σαφές πως οι CA-MRSA κλώνοι δύνανται να λάβουν νέα χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας με αποτέλεσμα να εξελιχθούν ως ανθεκτικοί σε διαφορετικές κατηγορίες αντιβιοτικών φαρμάκων. Σε ορισμένες χώρες, μεταξύ των οποίων οι ΗΠΑ, τα CA-MRSA στελέχη έχουν καταστεί ενδημικά στην κοινότητα και παράλληλα πολυανθεκτικοί ενδονοσοκομειακοί κλώνοι.

A.1.3 Τα στελέχη ζωικού κεφαλαίου (Livestock Associated – LA MRSA)

Η επαναλαμβανόμενη και καταχρηστική, πολλές φορές, χρησιμοποίηση αντιβιοτικών, αλλά και παραγόντων ανάπτυξης ζώων, δύναται να υποβοηθήσει την ανάπτυξη MRSA στελεχών σε κτηνοτροφικές μονάδες. Επιπρόσθετα, η υπέρμετρη χρησιμοποίηση βαρέων μετάλλων όπως ο χαλκός και ο ψευδάργυρος ως πρόσθετες ουσίες σε ζωοτροφές μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη MRSA στελεχών ζωικού κεφαλαίου μέσω τη συνεπιλογής γονιδίων αντοχής στα βαρέα μέταλλα. Με αυτόν τον τρόπο, έχει σημειωθεί μια εξάπλωση στην ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες σε κτηνοτροφικά περιβάλλοντα, όπου συγκεκριμένοι MRSA κλώνοι (π.χ. ST398) έχουν καταστεί συχνοί αποικιστές τόσο στα

παραγωγικά ζώα, όσο και στα άτομα που έρχονται σε επαφή με αυτά, δεδομένο άκρως επικίνδυνο για την υγεία. Σοβαρός είναι ο κίνδυνος στην Ελλάδα για κτηνιάτρους, αγρότες και ζωοτέχνες, αφού σε αυτούς έχουν απομονωθεί τέτοιου είδους στελέχη (Lozano et al., 2020).

Οι πρώτες αναφορές για τα MRSA στελέχη ζωικού κεφαλαίου συντάσσονται το 2005. Τότε αναγνωρίστηκε ένας νέος MRSA κλώνος της αλληλουχίας ST398 που ομαδοποιήθηκε στο κλωνικό σύμπλεγμα CC3981. Από την ολική αλληλούχιση του γονιδιώματος προέκυψε πως τα στελέχη LA-MRSA προέρχονται πιθανόν από έναν πρόγονο MSSA (Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*) κλώνο με ανθρώπινη προέλευση, γεγονός που ισχυροποιεί την ιδέα πως σχεδόν πάντοτε τα ζωικής προέλευσης στελέχη *Aureus* προέρχονται από στελέχη ανθρώπινα, αφού πρώτα περάσουν από το στάδιο προσαρμογής. Όσον αφορά την γεναλογία του LA-MRSA CC398, που πρωτοσυναντάται σε χοίρους στην Ευρώπη από το 2003 έως και το 2005, από εκείνη την περίοδο και μετά, έχει βρεθεί και σε διαφορετικά είδη παραγωγικών ζώων αλλά και ζώων συντροφιάς σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, αλλά παράλληλα και σε Αμερική, Ασία και Αυστραλία. Χαρακτηριστικό του γνώρισμα είναι πως σπάνια προκαλεί λοιμώξεις, αν και αποικεί στα ζώα.

Ωστόσο, ο ασυμπτωματικός αυτός αποικισμός, στον άνθρωπο δύναται να επιφέρει μια πληθώρα από λοιμώξεις, μέχρι και θάνατο. Βέβαια, συγκριτικά με άλλες γεναλογίες MRSA, οι επιπτώσεις της νόσου από LA-MRSA είναι μικρές, γεγονός που βρίσκει εξήγηση στο ότι οι ασθενείς που προσβάλλονται από το κλωνικό σύμπλεγμα MRSA CC398 παρουσιάζουν διαφορετικά βασικά δημογραφικά στοιχεία όπως η νεαρότερη ηλικία ή ο μικρότερος χρόνος παραμονής στο νοσοκομείο. Άσχετα με τη βαρύτητα της κλινικής του εικόνας στους ανθρώπους, το LA-MRSA CC398 αποτελεί μια αναδυόμενη κατηγορία του *Σταφυλόκοκκου Aureus* σε παγκόσμιο επίπεδο (Silva V et al., 2023) .

Τα MRSA στελέχη ζωικού κεφαλαίου και ειδικά τα προσαρμοσμένα στα ζώα στελέχη, έχουν ερευνηθεί εκτεταμένα, ωστόσο σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, παρατηρείται μια πιθανή αυξανόμενη τάση στη ζωνοτική του μετάδοση σε ευρωπαϊκό επίπεδο, ισχυροποιώντας την άποψη πως άτομα που έρχονται σε άμεση επαφή με ζώα μπορεί να κινδυνεύουν άμεσα να αποικιστούν με στελέχη ζωικού κεφαλαίου MRSA. Σύμφωνα με τα επιστημονικά δεδομένα, ο αποικισμός με LA-MRSA CC398 έχει ανιχνευθεί στο 24-86% των χοίρων, στο 31-37% των βοοειδών και στο 9-37% των κτηνοτρόφων πουλερικών, καθώς και στο 44-45% των κτηνιάτρων χοίρων στην Ευρώπη. Ειδικά για

τους χοίρους, το τελευταίο διάστημα έχει ενταθεί η ευαισθητοποίηση σχετικά με την ενδεχόμενη δεξαμενή των MRSA σε αυτούς, αφού έχει φανεί πως ο μεγάλος επιπολασμός της ρινικής φορέας στελεχών MRSA ανήκει στον τύπο MLST ST398 και ανευρύσκεται σε άτομα που έρχονται σε επαφή με χοίρους. Δεδομένου πως τα ζώα λογίζονται ως παροδικοί και όχι μόνιμοι αποικιστές, ο βαθμός αποικισμού των ανθρώπων σχετίζεται άμεσα με την συχνότητα, την ένταση της επαφής και τη διάρκεια της έκθεσης στα ζώα.

Παράλληλα, οι μόλυνση ατόμων από σφάγια ζώων ή προϊόντα κρέατος σε εγκαταστάσεις σφαγείων ή επεξεργασίας κρέατος είναι πιθανή, ενώ είναι εφικτό να γίνει πηγή MRSA στελεχών που δεν έχουν σχέση με την κτηνοτροφία. Αν και το CC389 αποτελεί την κύρια γενεαλογία που σχετίζεται με τα MRSA στελέχη ζωικού κεφαλαίου που ανιχνεύονται στα ζώα και άλλα κλωνικά σύμπλοκα και τύποι αλληλουχιών έχουν επίσης συσχετιστεί με ζώα και ζωικά προϊόντα. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση ο έλεγχος και η επιτήρηση των στελεχών MRSA ζωικού κεφαλαίου σε τρόφιμα και ζώα δεν είναι υποχρεωτική. Παρόλο που η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων προτείνει την τακτική παρακολούθηση των στελεχών αυτών σε κρεοπαραγωγή ορνίθια, παχυνόμενους χοίρους και βοοειδή γαλακτοπαραγωγής, δεν συμμετέχει σε αυτή το σύνολο των Κρατών Μελών.

A.2. MRSA ΣΕ ΛΥΜΑΤΑ

Ταυτόχρονα με τα νοσοκομεία και τις κτηνοτροφικές μονάδες, τεράστια σημασία σχετικά με την ανάπτυξη και τη διάδοση της αντιβιοαντοχής αποκτούν άλλου είδους περιβάλλοντα, όπως τα λύματα. Ένα μεγάλο ποσοστό των αντιμικροβιακών ουσιών που εφαρμόζονται, αδυνατεί να απορροφηθεί από τον οργανισμό – στόχο, με αποτέλεσμα να μπορεί να διασπαρθεί στα λύματα. Με τον τρόπο αυτό, οι αντιβιώσεις που περιέχουν β - λακτάμες έχουν ανιχνευτεί σε λύματα αλλά και επιφανειακά νερά, παρά το γεγονός πως τέτοιου είδους υδάτινα περιβάλλοντα, τους είναι «αφιλόξενα», λόγω της υδρόλυσης του β-λακταμικού δακτυλίου.

Σύμφωνα με αναφορές, ως μέσο διασποράς αντιμικροβιακών ουσιών και αντιβιοανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον, πρέπει να θεωρούνται και οι βιολογικοί

καθαρισμοί, μέσω των υδάτων εκροής και της ιλύος, όπου απομονώθηκαν αρκετά αυξημένοι αριθμοί ανθεκτικών στελεχών σε συνάρτηση με το φυσικό περιβάλλον.

Η πλειονότητα των μελετών για τον καθορισμό των ανθεκτικών στελεχών στις δομές επεξεργασίας λυμάτων εστιάζουν σε βακτηριακούς δείκτες κοπρανώδους επιμόλυνσης, όμως κάποιες αναφορές έχουν γίνει σχετικά με την παρουσία στελεχών σταφυλόκοκκου aureus, MRSA, CoNS καθώς και με την παρουσία γονιδίων αντιβιοαντοχής σε βιολογικούς καθαρισμούς. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, η ύπαρξη του Σταφυλόκοκκου aureus μετά την επεξεργασία, μοιάζει μειωμένη. Αντίθετα, τα στελέχη MRSA λογίζονται ως ραγδαία αναπτυσσόμενοι μολυντές στα υδάτινα περιβάλλοντα, ενώ τα στελέχη που ανιχνεύονται στα λύματα αυτά εμφανίζονται περισσότερο πολυανθεκτικά αλλά και μολυσματικά.

Τα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων, πρέπει αποδεδειγμένα να θεωρούνται ως σημαντικές δεξαμενές για διάφορα γονίδια αντιβιοαντοχής, συμπεριλαμβανομένων των προερχόμενων από νοσοκομειακά στελέχη MRSA. Καθίσταται σαφές πως το γονίδιο ανθεκτικότητας *mecA* κωδικοποιεί την αντίσταση στη μεθικιλίνη, ενώ τα στελέχη MRSA είναι την ίδια στιγμή ανιχνεύσιμα λύματα νοσοκομείων αλλά και σε αστικά, γεγονός που φανερώνει πως οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων αποτελούν μέρη διασποράς γονιδίου ανθεκτικότητας *mecA* και των ανθεκτικών στελεχών MRSA. Παράλληλα, σύμφωνα με σχετικές μελέτες, τα στελέχη MRSA που απομονώνονται σε αστικά λύματα, έχουν «κοντινή» γενετική σχέση με κλινικά απομονωθέντα στελέχη, αντικατοπτρίζοντας πιθανόν τη διάδοση αυτών των στελεχών μεταξύ των ανθρώπων. Συμπερασματικά, θα μπορούσε να εδραιωθεί η άποψη πως η διαδικασία επεξεργασίας λυμάτων, αδυνατεί να ελαττώσει το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών κατά την απομάκρυνσή τους από τις μονάδες επεξεργασίας.

Αντίστοιχα, τα λύματα από τους χώρους των σφαγείων ζώων, λογίζονται ως πιθανή δεξαμενή ανθεκτικών στελεχών μείζονος κλινικής σημασίας, παίζοντας βασικό ρόλο στη διάδοση αυτών των βακτηρίων στο περιβάλλον (de Paula Dias et al., 2024). Ο αυξημένος όγκος εισερχόμενων ζώων προς σφαγή καθώς και τα νερά απ' το κάθε στάδιο παραγωγής στα σφαγεία, αποτελούν σοβαρές πηγές για τα MRSA βακτήρια. Εκτός αυτού, η ημιτελής και λανθασμένη επεξεργασία λυμάτων στις εσωτερικές μονάδες των σφαγείων, μπορεί να θεωρηθεί ως «δρόμος διαφυγής» κλινικά σημαντικών ή και ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον και την κοινότητα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που έρχεται να ενισχύσει την τελευταία άποψη αποτελεί η εύρεση του γονιδίου *mecA* σε αυξημένες συγκεντρώσεις

σε λύματα από μονάδες επεξεργασίας σφαγείων χοίρων, συγκριτικά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε απόβλητα από μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων.

Ουσιαστικά, η συνεχιζόμενη απόθεση λυμάτων από σφαγεία δύναται να διασκορπίσει το γονίδιο ανθεκτικότητας *mecA* στη φύση, ιδίως σε υδάτινα περιβάλλοντα, με φυσική απόρριψη την μεταβολή του «εκεί» περιβαλλοντικού σταφυλόκοκκου *aureus* σε ανθεκτικό MRSA, μέσω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Με αυτόν τον τρόπο, τα λύματα από σφαγεία χοίρων λειτουργούν ως πιθανές δεξαμενές του ανθεκτικού σταφυλόκοκκου *Aureus*. Παρεμφερή στοιχεία ελήφθησαν και από λύματα πτηνοσφαγείου, στα οποία οι τύπου *sra* που προσδιορίστηκαν, αποτελούσαν τα πιο συνήθη στελέχη LA-MRSA που απομονώθηκαν από νοσοκομειακούς και περιπατητικούς ασθενείς στη Γερμανία σε κτηνοτροφικά μέρη που βρίσκονται σε ένα ανεπτυγμένο επίπεδο.

Το νερό, λοιπόν, που πέρασε το στάδιο επεξεργασίας από τη σφαγή, αποτελεί μια σημαντική δεξαμενή πολυανθεκτικών βακτηρίων αναφορικά με το ζωικό κεφάλαιο. Έτσι, τα ανθεκτικά και παθογόνα στελέχη Σταφυλόκοκκου αποκτούν τη δυνατότητα να φτάσουν στα επιφανειακά ύδατα και τον αέρα μέσω των λυμάτων τα οποία διασείρονται στο περιβάλλον, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της περιβαλλοντικής δεξαμενής των υπεύθυνων γενετικών καθοριστών για την μολυσματικότητα και την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Αυτό αποτελεί σοβαρό κίνδυνο τόσο για τα άτομα που εργάζονται σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων και που έρχονται σε συνεχή επαφή με τα βιοαερολύματα, όσο και για ένας κατοίκους των τοπικών περιοχών, αφού διασπείρονται στον αέρα ένας το στάδιο ένας ανάδευσης και του αερίσιμου των λυμάτων. Για το λόγο αυτό, κρίνεται μείζονος σημασίας η χρήση εξελιγμένων τεχνολογιών για την επεξεργασία αυτών των λυμάτων, την απολύμανσή τους. Ως απαραίτητη κρίνεται η συνδυαστική χρήση των οξειδωτικών και προσροφητικών τεχνολογιών, καθώς και των διηθητικών μεμβρανών, ώστε να αποτραπεί η διασπορά στο περιβάλλον προαιρετικών παθογόνων στελεχών καθώς και καθοριστικών παραγόντων ανθεκτικότητας.

Είναι κοινώς αποδεκτό, πως η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, σε συνδυασμό με την έλλειψη πόρων αλλά και το ευρύτερο πρόβλημα της κλιματικής αλλαγής ωθούν, μεταξύ άλλων, στην αυξημένη επαναχρησιμοποίηση του νερού, και ειδικά των επεξεργασμένων λυμάτων σε δραστηριότητες όπως η γεωργία, η βιομηχανία κ.α. (Tzanakakis et al., 2023). Αυτό από μόνο του, αποτελεί έναν σημαντικό τρόπο διασποράς ανθεκτικών και μολυσματικών βακτηρίων στο περιβάλλον, με άμεσο αντίκτυπο στη δημόσια υγεία. Όσο

πραγματοποιούνται τέτοιες δραστηριότητες, τα άτομα που ασχολούνται με αυτές, είναι επικίνδυνο να έρθουν σε επαφή με τέτοιοι είδους λύματα και στη συνέχεια να εκτεθούν στα προαναφερθέντα βακτήρια. Ως εκ τούτου, αποτελούν κρίσιμα σημεία η εξυγίανση των λυμάτων, ώστε να μειωθεί η διασπορά στελεχών, η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας, που απορρέει από την καταγραφή συμβατικών παραμέτρων ποιότητας του νερού, καθώς και οι στοχευμένες παρεμβάσεις ενάντια στη διάδοση αυτών των παραγόντων κινδύνων. Αναντίρρητα, είναι απαραίτητη η συνεχής έρευνα σχετικά με τα MRSA στελέχη στα λύματα και την επίδραση των διαδικασιών επεξεργασίας λυμάτων στα στελέχη αυτά.

Η κύριες πηγές προέλευσης των ανθεκτικών στελεχών MRSA που συναντώνται στις δομές επεξεργασίας λυμάτων είναι τα απόβλητα από νοσοκομειακές και κτηνοτροφικές μονάδες. Σύμφωνα με αναφορές, είναι υπαρκτός ο κίνδυνος έκθεσης του οικιστικού περιβάλλοντος και των δημόσιων χώρων στον αερομεταφερόμενο Σταφυλόκοκκο Aureus. Παράλληλα, έχει φανεί πως ο MRSA διοχετεύεται στο περιβάλλον από τα λύματα σφαγείων, καθιστώντας ευάλωτη σε αυτόν την Ενιαία υγεία. Πιο συγκεκριμένα, αναγνωρίστηκαν αυξημένα επίπεδα στο γονιδίου ανθεκτικότητας *mecA* στα λύματα σφαγείων χοίρων, γεγονός που φανερώνει πως τα λύματα αυτά προάγουν την διασπορά του γονιδίου *mecA*, λειτουργώντας ως ενδεχόμενος μηχανισμός για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων και βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο στην εξάπλωση επιβλαβών γενετικών προσδιοριστικών στο φυσικό περιβάλλον. Η πολυεπίπεδη κατανομή του MRSA με ανθεκτικότητες σε μια ποικιλία από αντιβιοτικά, κατα την επεξεργασία του νερού και των λυμάτων σφαγείων είναι ανησυχητική, αφού υπάρχει ο κίνδυνος να αποικιστούν οι εργαζόμενοι στο σφαγείο και να μεταδοθούν στη τροφική αλυσίδα μέσω διασταυρούμενης επιμόλυνσης κατα την επεξεργασία του σφάγιου. Ως εκ τούτου, κρίνεται επιτακτική η αποτροπή, κατα το δυνατό, της εισαγωγής ανθεκτικών στελεχών στα σφαγεία και κατ' επέκταση της διασπορά τους στα επεξεργασμένα λύματα. Επίσης απαραίτητα είναι τα μέτρα για τη βελτίωση της κατάστασης των υδάτων που απορρίπτονται καθώς και για την επεξεργασία τους.

Σήμερα, τα αντιβιοτικά που βρίσκονται στην πρώτη γραμμή για τη θεραπεία σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων φαίνεται όλο και πιο συχνά να μη λειτουργούν. Ως βασική αιτία παρουσιάζεται η μεσολαβούμενη *mecA* αντίστασης στη μεθικιλίνη που εξασφαλίζει ανθεκτικότητα σε β-λακτάμες ευρέως φάσματος και εδραιώνεται παγκοσμίως στους σταφυλόκοκκους, μεταξύ των οποίων και στους νοσοκομειακούς,

στους κτηνοτροφικών εκτροφών και των κοινοτικών περιβαλλόντων. Αρκετά γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ανιχνεύονται σε κινητά γενετικά στοιχεία (π.χ. πλασμίδια και τρανσποζόνια), γεγονός που ενισχύει την ταχεία διάδοση αυτών των γονιδίων αντίστασης σε στελέχη, είδη αλλά και σε συγγενικά γένη του σταφυλόκοκκου. Ως εκ τούτου, ο σταφυλόκοκκος δύναται να δράσει ως δότης και αποδέκτης αυτών των γονιδίων, συμμετέχοντας καίρια στη διάδοσή τους εντός της θετικής κατά Gram δεξαμενής της γονιδιακής ανθεκτικότητας.

Σε αυτό το σημείο, αξίζει να καταγραφεί πως αρκετά πλασμίδια ανθεκτικότητας του σταφυλόκοκκου *Aureus* αποτελούνται από περισσότερα από ένα γονίδια ανθεκτικότητας. Αυτό ευνοεί την επιλογή και την επιμονή των προαναφερθέντων γονιδίων ακόμη και απουσία άμεσης πίεσης επιλογής. Λόγω του ότι η πίεση επιλογής αποτελεί μια βασική κινητήρια δύναμη όσον αφορά τη ανάπτυξη και την εξάπλωση των ιδιοτήτων της ανθεκτικότητας, κατ'αρχήν είναι απαραίτητο οι αρμόδιοι να εστιάσουν στον περιορισμό της αντιμικροβιακής χρήσης στην ιατρική πράξη, ανθρώπων και ζώων, στο βαθμό του απαραίτητου δυνατού, με την παράλληλη ενεργοποίηση της πρόληψης και του εναλλακτικού ελέγχου των βακτηριακών λοιμώξεων. Ως αρωγοί σε αυτήν την προσπάθεια μπορούν να σταθούν οι τεχνικές μοριακής γονοτυπίας με την αξιολόγηση πιθανών κρουσμάτων, την κατανόηση της εξέλιξης των mRNA στελεχών αλλά και στα προγράμματα επιτήρησης των τελευταίων.

Τα πλασμίδια ανθεκτικότητας του *Staphylococcus aureus* είναι εξωχρωμοσωμικά μόρια DNA που φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Αυτά τα πλασμίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διάδοση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μεταξύ των πληθυσμών του *S. aureus*, συμβάλλοντας στις προκλήσεις στη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτό το βακτήριο. Τα πλασμίδια αντοχής του *S. aureus* ποικίλλουν σε μέγεθος και δομή, από μικρά, αυτοαναπαραγόμενα κυκλικά μόρια έως μεγαλύτερα, συζευκτικά πλασμίδια ικανά για οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Αυτά τα πλασμίδια φέρουν συχνά γονίδια που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα σε πολλαπλές κατηγορίες αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων των β-λακταμών (π.χ. πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες), των μακρολιδίων, των τετρακυκλινών, των αμινογλυκοσιδών και άλλων. Συχνά, φιλοξενούν γονίδια που κωδικοποιούν β-λακταμάσες, ένζυμα που υδρολύουν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης, καθιστώντας τα αναποτελεσματικά έναντι του βακτηρίου. Παραδείγματα

περιλαμβάνουν την παραγωγή πενικιλινάσων και β-λακταμασών εκτεταμένου φάσματος (ESBLs). Ορισμένα πλασμίδια φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν αντλίες εκροής που εξωθούν ενεργά τα αντιβιοτικά από τα βακτηριακά κύτταρα, μειώνοντας τις ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις φαρμάκων και προσδίδοντας αντοχή σε πολλαπλές κατηγορίες αντιβιοτικών. Τα πλασμίδια ανθεκτικότητας είναι πιθανό να φέρουν γονίδια που τροποποιούν τις θέσεις-στόχους των αντιβιοτικών, όπως το ριβοσωμικό RNA ή τα ένζυμα σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, μειώνοντας τη συγγένεια πρόσδεσης των αντιβιοτικών και αποτρέποντας την ανασταλτική τους δράση.

Εκτός από τα επίκτητα γονίδια ανθεκτικότητας, μεταλλάξεις σε χρωμοσωμικά γονίδια μπορούν επίσης να συμβάλουν στην ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά σε στελέχη *S. aureus* που φέρουν πλασμίδια ανθεκτικότητας. Τα στελέχη *S. aureus* που φέρουν πλασμίδια αντοχής αποτελούν σημαντικές προκλήσεις σε κλινικό επίπεδο, περιορίζοντας τις θεραπευτικές επιλογές και αυξάνοντας τον κίνδυνο αποτυχίας της θεραπείας και υποτροπής της νόσου, ενώ παράλληλα προάγουν την εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών και τελικά συμβάλλουν στην εξάπλωση νοσοκομειακών λοιμώξεων. Επίσης, σε γεωργικά περιβάλλοντα, τα πλασμίδια ανθεκτικότητας του *S. aureus* μπορεί να μεταφερθούν μεταξύ στελεχών που σχετίζονται με ζώα και στελεχών προσαρμοσμένων στον άνθρωπο, οδηγώντας ενδεχομένως σε ζωνοσογόνο μετάδοση και ανθρώπινες λοιμώξεις με βακτήρια ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά.

B. ΣΚΟΠΟΣ

Ως πηγή ανθεκτικών σε αντιμικροβιακές ουσίες βακτηρίων, με κλινική σημασία μάλιστα, πρέπει να θεωρούνται τα λύματα από σφαγεία. Αυτό τα καθιστά ένα σημαντικό εργαλείο μεταφοράς αυτών των μικροοργανισμών στο περιβάλλον. Με βάση τα σημερινά δεδομένα, υπάρχουν μεγάλα περιθώρια έρευνας σχετικά με το γονίδιο *mecC* και του MRSA και την παρουσία τους σε λύματα από σφαγεία χοίρων. Η παρούσα διπλωματική μελέτη έχει ως κύριο σκοπό την έρευνα της ύπαρξης και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των MRSA στελεχών σε λύματα σφαγείων χοίρων στην ευρύτερη περιοχή της Λάρισας. Για τη μελέτη αυτή θα πραγματοποιηθεί εξέταση του φαινοτύπου των MRNA στελεχών και ποσοτικοποίηση του γονιδίου *mecC* ανθεκτικότητας με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου RT-PCR.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τη μελέτη αυτή, θα πραγματοποιηθεί λήψη δειγμάτων των 500ml πριν και μετά το στάδιο της επεξεργασίας τους από σφαγείο της ΠΕ Λάρισας. Τα λύματα θα παρακολουθούνται τρεις φορές την εβδομάδα για διάστημα ενός μήνα. Αφού συλλεχθούν, τα δείγματα θα εξετάζονται στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

.

Γ.1. Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών

Η επεξεργασία κάθε δείγματος έγινε σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται από την Ευαγγελοπούλου (2022).

Γ.2. Μέθοδος Ελέγχου Αντοχής στα Αντιβιοτικά

Με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων εμποτισμένων με αντιβιοτικά σε άγαρ (Kirby Bauer) θα γίνει ο έλεγχος της μικροβιακής αντοχής

Ειδικότερα, θα συσταθεί ένα κατάλληλο μικροβιακό εναιώρημα με θολερότητα ίση με 0.5 της κλίμακας Mc Farland (περίπου $1-2 \times 10^8$ CFU/ml για E. Coli ATCC® 25922) με τη λήψη 4-5 μεμονωμένων και ομοιόμορφων αποικιών από καθαρή καλλιέργεια οι οποίες θα περνούν από αραιώση σε 4-5 ml στείρο φυσιολογικό ορό (ισότονο διάλυμα NaCl)

Το μικροβιακό εναιώρημα θα ενοφθαλμίζεται σε τρυβλίο Mueller-Hinton εντός 15 λεπτών από την παρασκευή του και στη συνέχεια εντός 5-15 λεπτών από την επίστρωση του MHA θα τοποθετούνται τα προς έρευνα αντιβιοτικά στην επιφάνεια του τρυβλίου με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας, σε απόσταση τουλάχιστον 24 mm μεταξύ τους κέντρο με κέντρο. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση στους 37°C σε αερόβιες συνθήκες για 18 ώρες, θα ακολουθήσει η ανάγνωση των αποτελεσμάτων με τη μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης του κάθε στελέχους Σταφυλόκοκκου Aureus και η κατηγοριοποίηση του ως Ευαίσθητο

(διάμετρος της ζώνης αναστολής ίση ή μεγαλύτερη από αυτή του πρότυπου στελέχους), Μετρίως Ευαίσθητο (διάμετρος ζώνης αναστολής μικρότερη κατά 2 mm τουλάχιστον σε σύγκριση με το πρότυπο στέλεχος), και Ανθεκτικό (δεν υπάρχει ζώνη αναστολής ή είναι πολύ μικρή) σύμφωνα με τους ερμηνευτικούς πίνακες που προτείνονται από το CLSI.

Τα αντιβιοτικά που θα ελεγχθούν είναι τα παρακάτω:

B-λακταμικά: πενικιλίνη G (10U), οξακιλλίνη (1μg)
Κεφαμυκίνες: κεφοξιτίνη (30 μg)
Γλυκοπεπτίδια: βανκομυκίνη (30 μg)
Τετρακυκλίνη (30 μg)
Μακρολίδες:ερυθρομυκίνη (15 μg)
Λινκοσαμίδες: κλινδαμυκίνη (2 μg)
Χλωραμφαινικόλη (30 μg)
Κινολόνες: σιπροφλοξασίνη (5 μg)
Οξαζολιδόνες: λινεζολίδα (30 μg)
Σουλφοναμίδες: σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (23.75/1.25 μg)

Γ.3. Εξαγωγή ολικού DNA

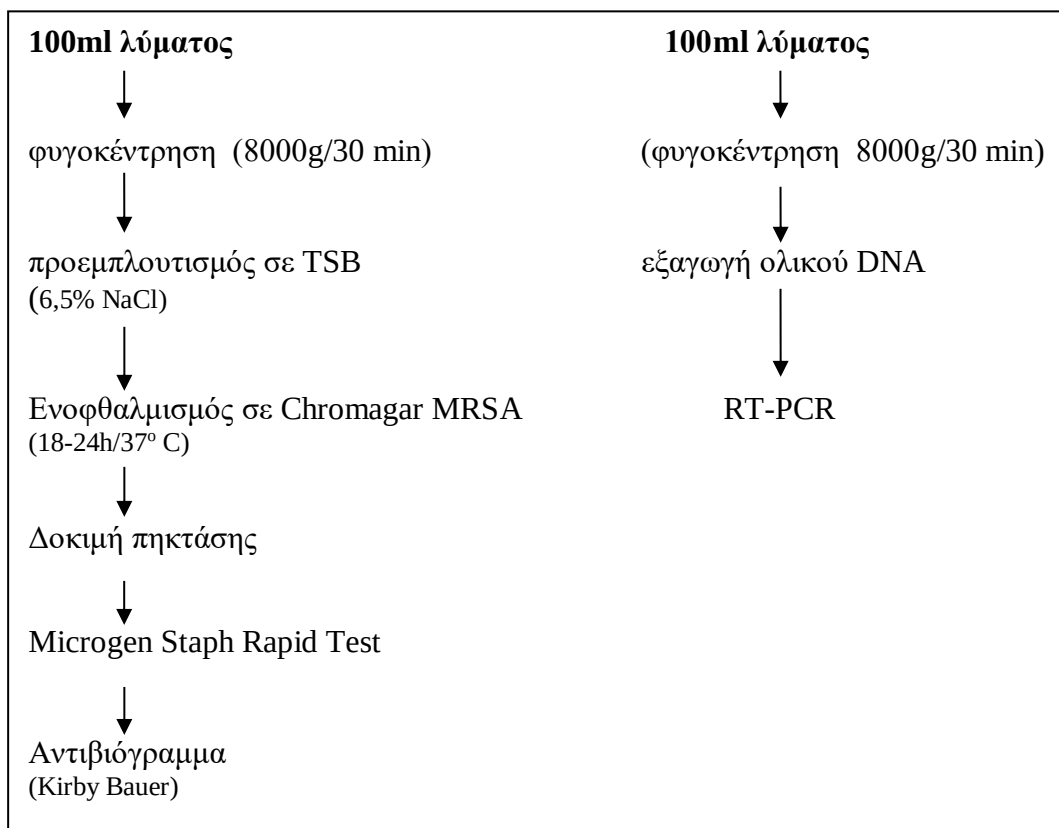
Η επεξεργασία κάθε δείγματος έγινε σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται από την Ευαγγελοπούλου (2022).

Γ.4. Έλεγχος της παρουσίας του γονιδίου *mecC* στα δείγματα λυμάτων

Η ποσοτικοποίηση του *mecC* γονιδίου έγινε σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται από την Ευαγγελοπούλου (2022). Συνοπτικά δείγματα ολικού DNA αναλύθηκαν με τη χρήση του Kapa-SYBR green και στην συσκευή Roche LightCycler 2.0. Τα στάδια των θερμικών κύκλων ήταν: 1. Αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 10 min. 2. 40 κύκλοι στους 95°C για 20 sec (αποδιάταξη), 60°C για 60 sec (προσαρμογή) και 60°C για 60 sec (επιμήκυνση). 3. Τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min. Το μήκος των εκκινητών για το *mecA* γονίδιο είναι μήκους 25 νουκλεοτιδίων με θερμοκρασία προσαρμογής τους 60°C. Μετά το τέλος της αντίδρασης έγινε ανάλυση των παραγόμενων τμημάτων DNA με θερμική αποδιάταξη, με τήξη από 65°C μέχρι 95°C. Με

βάση την παραγόμενη καμπύλη εξαγόταν το συμπέρασμα ότι η παρουσία μίας κορυφής στο αναμενόμενο σημείο τήξης σήμαινε την ύπαρξη ενός (επιθυμητού) προϊόντος DNA της PCR. Για την ενίσχυση του γονιδίου *mecA* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες και οι συνθήκες, όπως περιγράφηκαν στην έρευνα των McClure et al. (2006).

Στο Διάγραμμα 1 απεικονίζονται συνοπτικά τα στάδια επεξεργασίας των δειγμάτων.



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής επεξεργασίας των δειγμάτων (Ευαγγελοπούλου 2022).

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ.1. Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών

Συνολικά εξετάστηκαν 26 δείγματα λυμάτων. Από τα παραπάνω δείγματα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δεκαεννιά (19) στελέχη MRSA, από τα οποία 12 προ της επεξεργασίας τους (12/13) σε ποσοστό 92,31% και 7 μετά την επεξεργασία τους (7/13) σε ποσοστό 53,85% . Η αρχική απομόνωση και ταυτοποίηση των στελεχών ως *S. aureus* βασίστηκε σε μεθόδους κλασικής μικροβιολογίας (Εικόνες 1,2,3).

Πίνακας Δ.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα θετικότητας σε MRSA σε δείγματα λυμάτων σε σφαγείο χοίρων.

Αριθμός θετικών δειγμάτων σε MRSA	Ποσοστό (%) θετικών δειγμάτων σε MRSA	Προέλευση δείγματος	Σύνολο
12	92,31% (12/13)	Προ επεξεργασίας	19/26 (73,08%)
7	53,85% (7/13)	Μετά της επεξεργασίας	

Δ.2 Διενέργεια δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακές ουσίες

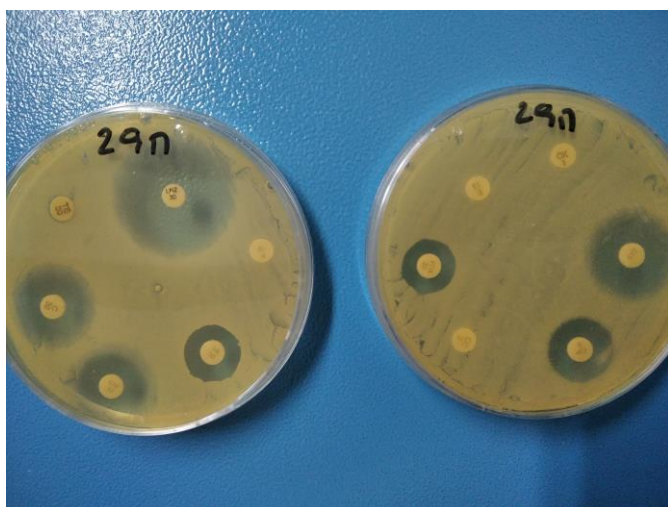
Τα δεκαεννιά (19) στελέχη που καταγράφηκαν ως MRSA εξετάστηκαν με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων ως προς την ευαισθησία τους σε 10 αντιβιοτικά.

Η πλειοψηφία (12/19, 63,16%) των στελεχών που απομονώθηκαν ήταν πολυανθεκτικά, δηλαδή παρουσίασαν αντοχή έναντι τουλάχιστον 5 εκ των 10 αντιμικροβιακών ουσιών.

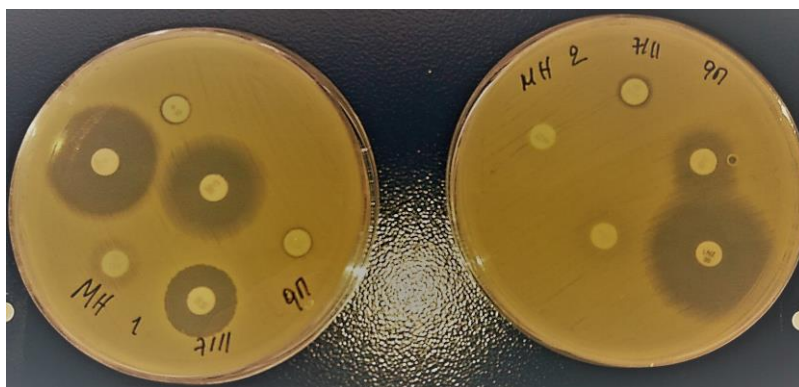
Τα ευρήματα έδειξαν μεγάλα ποσοστά αντοχής στις ουσίες: κεφοξιτίνη (30 µg) (100%), πενικιλίνη G (10 µg) (100%), τετρακυκλίνη (30 µg) (100%), κλινταμυκίνη (2 µg) (73,68%) και σιπροφλοξασίνη (5 µg) (68,42%) και μικρότερα στα ερυθρομυκίνη (15µg) (52,63%), χλωραμφαινικόλη (30 µg) (21,05%) και σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (23.75/1.25 µg) (15,79%) (Πίνακες 3.2, 3.3), (Εικόνες 6,7).

Η λινεζολίδη, η σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη και η κλινταμυκίνη κατατάσσονται μεταξύ των αντιβιοτικών με την αποτελεσματικότερη δραστηριότητα έναντι του σταφυλόκοκκου aureus (Liu et al., 2011). Τα στελέχη που ελέγχθηκαν φάνηκαν ευαίσθητα στα παραπάνω αντιβιοτικά σε ποσοστό 100%, 84,21% και 26,32%, αντίστοιχα. Η συχνότητα καταγραφής ανθεκτικών MRSA στελεχών σε σχέση με το κάθε αντιβιοτικό, παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2. Η εξέταση της ανθεκτικότητας των MRSA στελεχών συγκριτικά με τις αντιβιοτικές ουσίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, κατέγραψε την παρουσία οκτώ (8) διακριτών προφίλ, που συνίσταντο από τρεις έως οκτώ αντιβιοτικές ουσίες (Πίνακας 3.3).

Σε κλίμακα κλάσης αντιβιοτικών, το 36,84% των MRSA στελεχών εμφάνισε αντοχή σε 6 κλάσεις, το 21,05% σε 3 κλάσεις, το 15,79% σε 4 κλάσεις, το 10,53% σε 8 κλάσεις και το ίδιο ποσοστό σε 8 κλάσεις και το 5,26% φανέρωσε αντοχή σε 5 κλάσεις (Πίνακας 3.3). Τα ανθεκτικά MRSA στελέχη που απομονώθηκαν κατά την εξέταση, καταγράφηκαν ανθεκτικά σε ποσοστό 100%, έναντι των πενικιλινών, τετρακυκλινών και κεφαμυκινών, ενώ παράλληλα σημειώθηκαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας και έναντι των λινκοζαμινών (73,68%), των μακρολίδων (52,63%) και των κινολόνων (68,42%). Αντιθέτως, οι κατηγορίες αντιβιοτικών με μηδενική ανθεκτικότητα που καταγράφηκαν, είναι οι αμινογλυκοσίδες και οι οξαζολιδόνες με ποσοστό 0% (Πίνακας 3.2).



Εικόνα 1: Πολυανθεκτικό MRSA στέλεχος σε 7 αντιμικροβιακές ουσίες



Εικόνα 2: Πολυανθεκτικό MRSA στέλεχος σε 7 αντιμικροβιακές ουσίες

Πίνακας Δ.2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες MRSA στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα λυμάτων σε σφαγείο χοίρων

	FOX	C	CIP	E	P	SXT	TE	LZD	CC	GM
Αριθμός ανθεκτικών στελεχών	19	4	13	10	19	3	19	0	14	0
Ποσοστό (%) ανθεκτικότητας σε σύνολο 19 στελεχών	100	21,05	68,42	52,63	100	15,79	100	0	73,68	0

FOX κεφοξιτίνη (30 µg), C χλωραμφαινικόλη (30 µg), CIP σιπροφλοξασίνη (5 µg), E ερυθρομυκίνη (15µg), P πενικιλίνη G (10 µg), SXT σουλφομεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (23.75/1.25 µg), TE τετρακυκλίνη (30 µg), LZD λινεζολίδη (30 µg), CC κλινταμυκίνη (2 µg), GM γενταμυκίνη (10 µg).

Πίνακας Δ.3: Προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής των απομονωθέντων MRSA στελεχών

Αριθμός αντιβιοτικών/ κλάσεων αντιβιοτικών	Αντιβιοτικά	Αριθμός στελεχών MRSA (%)	Προέλευση δείγματος λύματος	Αρίθμηση αντιμικροβιακών προφίλ
3	FOX, P, TE	2 (10,53)	Προ της επεξεργασίας	A
3	FOX, P, TE	2 (10,53)	Μετά της επεξεργασίας	A
4	FOX, P, TE, CIP	1 (5,26)	Προ της επεξεργασίας	B
4	FOX, P, TE, CC	1 (5,26)	Προ της επεξεργασίας	C
4	FOX, P, TE, CC	1 (5,26)	Μετά της επεξεργασίας	C
5	FOX, P, TE, CIP, CC	1 (5,26)	Προ της επεξεργασίας	D
6	FOX, P, TE, CIP, CC, E	4 (21,05)	Προ της επεξεργασίας	E
6	FOX, P, TE, CIP, CC, E	3 (15,79)	Μετά της επεξεργασίας	E
7	FOX, P, TE, CIP, CC, E, C	1 (5,26)	Προ της επεξεργασίας	F
7	FOX, P, TE, CIP, CC, SXT, C	1 (5,26)	Προ της επεξεργασίας	G
8	FOX, P, TE, CIP, CC, SXT, C, E	1 (5,26)	Προ της επεξεργασίας	H
8	FOX, P, TE, CIP, CC, SXT, C, E	1 (5,26)	Μετά της επεξεργασίας	H

FOX κεφοξιτίνη (30 μg), VA βανκομυκίνη (30 μg), C χλωραμφαινικόλη (30 μg), CIP σιπροφλοξασίνη (5 μg), E ερυθρομυκίνη (15μg), P πενικιλίνη G (10 μg), SXT σουλφομεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (23.75/1.25 μg), TE τετρακυκλίνη (30 μg), LZD λινεζολίδα (30 μg), CC κλινταμυκίνη (2 μg) - (I)= Intermediate (ενδιάμεσης ευαισθησίας)

Α.3 Παρουσία του γονιδίου *mecC* στα δείγματα λυμάτων που εξετάστηκαν

Η επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα CLUSTALW. Οι ληφθείσες αλληλουχίες που απομονώθηκαν με PCR από το πολυανθεκτικό στέλεχος σταφυλόκοκκος aureus, συγκρίθηκαν με το γονίδιο *mecC* από την τράπεζα πληροφοριών του NCBI (NIH, ΗΠΑ). Η ομοιότητα του γονιδίου που απομονώθηκε (και είναι ευανάγνωστο από την αλληλούχιση) και του γονιδίου *mecC* ήταν ολοκληρωτική με ποσοστό 100%.

Πίνακας Α.4: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρουσίας του γονιδίου *mecC* σε δείγματα λυμάτων σε σφαγείο χοίρων.

Αριθμός θετικών δειγμάτων στο γονίδιο <i>mecC</i>	Ποσοστό (%) θετικών δειγμάτων στο γονίδιο <i>mecC</i>	Προέλευση δείγματος	Σύνολο
12	12/13 (92,31%)	Προ επεξεργασίας	19/26 (73,08%)
7	7/13 (53,85%)	Μετά της επεξεργασίας	

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας μελετήθηκε η παρουσία του MRSA και του γονιδίου *mecC* σε λύματα από σφαγείο χοίρου στην περιοχή της Θεσσαλίας. Τα δείγματα που εξετάστηκαν προέρχονταν από δύο διαφορετικά σημεία, πριν και μετά από την επεξεργασία τους. Αρχικά τα δείγματα λήφθηκαν από το πρώτο σημείο που τα λύματα προέρχονται από το σφαγείο, αλλά και μετά από την επεξεργασία τους από τον βιολογικό καθαρισμό σφαγείου χοίρων ώστε να διερευνηθεί η πιθανότητα διάδοσής τους στο περιβάλλον. Ουσιαστικά εξετάστηκε ο επιπολασμός και τα χαρακτηριστικά των ανθεκτικών MRSA στελεχών, προερχόμενων από προς σφαγή χοίρους, τα οποία έχουν ως τελικό προορισμό το περιβάλλον.

Τα συμπεράσματα της μελέτης ήταν τα εξής:

1. Το γονίδιο ανθεκτικότητας *mecC* φάνηκε πως διασπείρεται ευρέως στα λύματα σφαγείων χοίρων.
2. Τα αυξημένα επίπεδα παρουσίας του γονιδίου *mecC* ανιχνεύθηκαν στα λύματα τόσο πριν όσο και μετά τον βιολογικό καθαρισμό του σφαγείου.
3. Το σύνολο των στελεχών MRSA που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσίασαν πολυανθεκτικότητα στις αντιμικροβιακές ουσίες που εξετάστηκαν.

E.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση των MRSA στελεχών

Η διάδοση του MRSA από τα παραγωγικά ζώα (Livestock-Associated MRSA) εγείρει ανησυχία και προβληματισμό σε παγκόσμιο επίπεδο, λόγω της πιθανής μετάδοσής του από τα ζώα στους ανθρώπους που έρχονται σε άμεση επαφή με αυτά. Η συχνότητα μάλιστα απομόνωσης του LA-MRSA από τους χοίρους σε μια σειρά από ευρωπαϊκές χώρες είναι πολύ μεγάλη, με επιπολασμό, ο οποίος κυμαίνεται από 0,1% έως 100,0% (EFSA & ECDC, 2021), κάτι που αδιαμφισβήτητα τους ανάγει ως σημαντική πηγή διασποράς του παθογόνου (Ευαγγελοπούλου 2022).

Μέχρι σήμερα οι διαθέσιμες αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία για την ύπαρξη των στελεχών MRSA σε λύματα σφαγείων χοίρων είναι πολύ περιορισμένες (Wan & Chou, 2014). Για τα αστικά λύματα υπάρχουν επιστημονικές εργασίες που επισημαίνουν την

παρουσία MRSA σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα, ειδικά στην περίπτωση πριν από την επεξεργασία τους (Levin-Edens et al., 2012). Οι Wan & Chou (2014) αναφέρουν ότι τα λύματα σφαγείων παρουσίαζαν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του γονιδίου ανθεκτικότητας *mecA* σε σύγκριση με τα αστικά απόβλητα. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης καταδεικνύουν ότι το σφαγείο μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα διασποράς MRSA στο περιβάλλον με ιδιαίτερα επιβαρυντικές επιπτώσεις για την προστασία της δημόσιας υγείας. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας έδειξαν ότι δεκατρία (13) (54,17%) από τα συνολικά 24 δείγματα λυμάτων ήταν θετικά στην παρουσία MRSA. Από το σύνολο των θετικών δειγμάτων στην παρουσία MRSA, τα δώδεκα (12) (63,16%) αφορούσαν δείγματα που συλλέχθηκαν στο στάδιο προ της επεξεργασίας τους, ενώ τα 7 (36,84%), αντιστοιχούσαν σε λύματα που συλλέχθηκαν στο στάδιο μετά την επεξεργασία τους και προ της διάθεσής τους στο περιβάλλον. Πρέπει να τονιστεί σε αυτό το σημείο ότι η πλειοψηφία των απομονωθέντων στελεχών MRSA σε αυτή την εργασία που πραγματοποιήθηκε σε σφαγείο από την περιοχή της Θεσσαλίας προέρχονταν από μη επεξεργασμένα λύματα. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποδοθεί στο ότι ο *S. aureus* ως γνωστό παρουσιάζει χαμηλό μικροβιακό ανταγωνισμό έναντι βακτηρίων που αναπτύσσονται με πολύ ταχύτερο ρυθμό, όπως *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* και *Enterobacteriaceae*. Με τα βακτήρια αυτά όπως αναφέρθηκε προηγουμένως συνήθως συνυπάρχουν στα λύματα. Παρά τον σημαντικό μικροβιακό ανταγωνισμό που δρα περιοριστικά το ποσοστό απομόνωσης MRSA στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία από τα λύματα ήταν ιδιαίτερα υψηλό. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως αρκετά αναμενόμενη λαμβανομένου υπόψη τον υψηλό επιπολασμό του MRSA, όπως αυτός έχει καταγραφεί στους χοίρους (Guerra et al., 2020). Η σημαντική παρουσία του MRSA με ανθεκτικότητα σε πολύ σημαντικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες κατά τη διαδικασία επεξεργασίας των λυμάτων σφαγείων χοίρων είναι σχετικά ανησυχητική, καθώς μπορεί να επανεισαχθούν στην τροφική αλυσίδα, αλλά και λόγω της απελευθέρωσής τους στο περιβάλλον λόγω της ανεπαρκούς επεξεργασίας των αποβλήτων.

E.2 Αντιμικροβιακή αντοχή των MRSA στελεχών

Στην μεταπτυχιακή αυτή μελέτη το σύνολο (100%) των απομονωθέντων MRSA στελεχών, παρουσίασαν αντοχή έναντι τουλάχιστον πέντε εκ των έντεκα αντιβιοτικών

παραγόντων που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω έδειξαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας κυρίως για τους αντιμικροβιακούς παράγοντες χαμηλού κόστους κτήσης, που είναι ιδιαίτερα ενδεικτική της τακτικής των κτηνοτρόφων ως προς την επιλογή των παραγόντων αυτών και των συνεπειών στη δημόσια υγεία, που μπορεί να έχουν τέτοιες τακτικές. Έτσι, παρατηρήθηκαν μεγάλα ποσοστά αντοχής στην πενικιλίνη G (1 µg) (100,0%), κεφοξιτίνη (30 µg), τετρακυκλίνη (30 µg) (100,0%), κλινταμυκίνη (2 µg) (73,6%), σιπροφλοξασίνη (5 µg) (68,4%), ερυθρομυκίνη (15µg) (52,6%) χλωραμφαινικόλη (30 µg) (22%) που θεωρούνται «Κρίσιμης και Υψηλής Σημαντικότητας για την Ανθρώπινη Υγεία Αντιμικροβιακές Ουσίες» από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Critically and Highly Important Antimicrobials for Human Health) (WHO, 2011). Τα αποτελέσματα από τη μία δεν αποτελούν έκπληξη, αφού είναι ευρεία η κυκλοφορία σκευασμάτων με τις περισσότερες εκ των ανωτέρω δραστικές ουσίες, ενώ per os χορήγηση, καθιστά εύκολη και οικεία τη χρήση τους. Παράλληλα, το χαμηλό κόστος και η εύκολη προμήθειά τους, συμβάλλουν προς την προβληματική αυτή κατάσταση. Από την άλλη μεριά, τα παραπάνω αποτελέσματα συμβαδίζουν με διάφορες έρευνες σε Ελλάδα και Ευρώπη, οι οποίες ανασκοπούνται από τον Κομοδρόμο 2021, κατά τις οποίες, αυξημένα ποσοστά ανθεκτικότητας σε MRSA στελέχη από χοίρους καταγράφηκαν για τέσσερις έως επτά κλάσεις αντιμικροβιακών, γεγονός που επιβεβαιώνει την υπέρμετρη χρήση τους στη χοιροτροφία (Burch, 2005), τόσο για θεραπεία και πρόληψη, όσο και για τις ιδιότητές ως αυξητικών παραγόντων. Αυτές οι πρακτικές και κυρίως η εκτεταμένη χρησιμοποίηση πενικιλλινών και τετρακυκλινών, έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο φορέας MRSA στελεχών, τουλάχιστον στους χοίρους, καθιστώντας τον τελικά σημαντικό παράγοντα κινδύνου επιμόλυνσης του χοιρινού κρέατος και του περιβάλλοντος των σφαγείων (Ευαγγελοπούλου 2022).

Η αντοχή στη χλωραμφαινικόλη αποτελεί μία πολύ σημαντική και ανησυχητική καταγραφή, επειδή έχει απαγορευτεί η χορήγησή της στα παραγωγικά ζώα στην ΕΕ ήδη από το 1994 (EMEA, 1994). Ως κυριότερη αιτία γι' αυτό, λογίζεται η μεταφορά γονιδίων αντοχής ανάμεσα σε διαφορετικά είδη βακτηρίων που κωδικοποιούν παρόμοιες κατηγορίες αντιμικροβιακών. Η υπέρμετρη χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων μεταβάλλει τα γονίδια ανθεκτικότητας και αυτές οι μεταβολές μπορούν να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα (Sommer & Dantas, 2011). Έτσι, τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη θα μπορούσαν να παραμείνουν στη μικροβιακή χλωρίδα των ζώων για αρκετό χρονικό διάστημα μετά την απαγόρευσή

της και, ίσως, αυτό είναι αυτό που καταγράφηκε στην παρούσα μελέτη (Ευαγγελοπούλου 2022).

E.3 Ποσοτικοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας *mecA* σε λύματα

Τα αξιοσημείωτα υψηλά ποσοστά απομόνωσης των MRSA στελεχών στα δείγματα από τα λύματα σφαγείων που εξετάστηκαν, η αυξημένη καταγραφή της παρουσίας του γονιδίου ανθεκτικότητας *mecC* τόσο στα λύματα προ της επεξεργασίας τους (91% θετικότητα), όσο και σε εκείνα μετά από την επεξεργασία τους σε βιολογικό καθαρισμό (53% θετικότητα), αποτελεί κατά τη γνώμη μας εξαιρετικά ανησυχητική παρατήρηση. Σε άλλη παρόμοια επιστημονική δημοσίευση αναφέρεται, ότι ο MRSA μπορεί να απελευθερωθεί στο περιβάλλον από τα λύματα σφαγείων, με δυσμενείς συνέπειες για τη δημόσια υγεία. Έτσι βρέθηκαν σημαντικά επίπεδα του γονιδίου ανθεκτικότητας *mecA* στα λύματα των σφαγείων χοίρων, φανερώνοντας ότι τα λύματα του σφαγείου παρέχουν το υπόστρωμα για φιλοξενία και λειτουργούν ως πιθανό μέσο για την οριζόντια μεταφορά του γονιδίου *mecA* και βοηθώντας, έτσι, στην διασπορά επιβλαβών γενετικών προσδιοριστικών στη φύση (Wan & Chou, 2014). Η παρατήρηση ότι τα περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας που ανιχνεύονται στα στελέχη του *S. aureus* βρίσκονται σε κινητά γενετικά στοιχεία, όπως πλασμίδια και τρανσποζόνια, εδραιώνει την εξάπλωση αυτών των γονιδίων αντίστασης. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι ο σταφυλόκοκκος *aureus* έχει τη δυνατότητα να δράσει ως δότης αλλά και ως αποδέκτης των γονιδίων ανθεκτικότητας. Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι η παρουσία του *S. aureus* στα δείγματα μετά το στάδιο της επεξεργασίας μοιάζει να είναι μικρότερη σε σύγκριση με τα δείγματα από τα λύματα πριν την επεξεργασία τους, όμως φαίνεται ότι η αδιάκοπη απόρριψη λυμάτων από τα σφαγεία χοίρων μπορεί να αποτελέσει την αιτία και ένα πιθανό μέσο απελευθέρωσης του γονιδίου ανθεκτικότητας *mecC* σε φυσικά υδατικά περιβάλλοντα, με άμεση συνέπεια την μετατροπή του περιβαλλοντικού σταφυλόκοκκου *aureus* σε ανθεκτικό MRSA στέλεχος, δια μέσου της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (HGT). Έτσι, θεωρούμε πως η διαδικασία εξυγίανσης των λυμάτων είναι εξαιρετικά κρίσιμο σημείο της διαδικασίας με ουσιαστικό στόχο τη μείωση της απελευθέρωσης βακτηριακών στελεχών.

Συνεπώς, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, καταδεικνύουν τα λύματα των σφάγιων χοίρου ως σημαντική δεξαμενή ανθεκτικών στελεχών MRSA, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να διασπαρούν στο ευρύτερο περιβάλλον και τελικά στην ανθρώπινη κοινότητα, καθιστώντας την προσέγγιση «Ενιαίας Υγείας» περισσότερο επιτακτική από ποτέ άλλοτε στο παρελθόν.

ΣΤ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρόλο που το πρόβλημα της δημόσιας υγείας που αφορά τα παθογόνα βακτήρια του είδους σταφυλόκοκκος aureus είναι γνωστό από παλιά, (Duckworth & Jordens, 1990), προοδευτικά με το πέρασμα των ετών, όλο και περισσότεροι επιστημονικοί συναγερμοί και αναφορές σχετικά με τον ανερχόμενο επιδημιολογικό κίνδυνο εμφανίζονται από όλες τις ηπείρους (Agostino et al., 2017; Chang & Lin, 2018), με ιδιαίτερη έμφαση στον σχηματισμό γονιδίων ανθεκτικότητας στην ομάδα των β-λακταμών και κυρίως του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκου aureus (MRSA) (Becker et al., 2014b; Arias & Murray, 2015).

Συνολικά εξετάστηκαν 26 δείγματα λυμάτων, από τα οποία απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δεκαεννιά (19) ανθεκτικά στελέχη MRSA. Από τα 19, τα 12 δείγματα ήταν προ της επεξεργασίας τους (12/13) σε ποσοστό 92,31% και τα 7 μετά την επεξεργασία τους (7/13) σε ποσοστό 53,85% .

Τα δεκαεννιά (19) στελέχη που ανιχνεύτηκαν ως MRSA εξετάστηκαν με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων ως προς την ευαισθησία τους σε 10 αντιβιοτικά. Η πλειοψηφία (12/19, 63,16%) των στελεχών που απομονώθηκαν ήταν πολυανθεκτικά, δηλαδή εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον 5 από τα 10 αντιβιοτικά.

Στην μεταπτυχιακή αυτή εργασία, το σύνολο (100%) MRSA στελεχών που ανιχνεύτηκαν, εμφάνισαν ανθεκτικότητα έναντι τουλάχιστον πέντε εκ των έντεκα αντιμικροβιακών παραγόντων που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω έδειξαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας κυρίως για τους αντιμικροβιακούς παράγοντες χαμηλού κόστους κτήσης, που είναι ιδιαίτερα ενδεικτική της τακτικής των κτηνοτρόφων ως προς την επιλογή των παραγόντων αυτών και των συνεπειών στη δημόσια υγεία, που μπορεί να έχουν τέτοιες τακτικές. Έτσι, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στα πενικιλίνη G (1 μg) (100,0%), κεφοξιτίνη (30 μg), τετρακυκλίνη (30 μg) (100,0%), κλινταμυκίνη (2 μg) (73,6%), σιπροφλοξασίνη (5 μg) (68,4%), ερυθρομυκίνη (15μg) (52,6%) χλωραμφαινικόλη (30 μg) (22%) που θεωρούνται «Κρίσιμης και Υψηλής Σημαντικότητας για την Ανθρώπινη Υγεία Αντιμικροβιακές Ουσίες» από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Συμπερασματικά, με βάση και τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, καθίσταται σαφές πως τα λύματα των σφάγιων χοίρου αποτελούν μια σημαντική δεξαμενή ανθεκτικών στελεχών MRSA, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να διασπαρούν γενικότερα στη φύση και

τελικά στην ανθρώπινη κοινότητα, καθιστώντας την προσέγγιση «Ενιαίας Υγείας» περισσότερο αναγκία από ποτέ στο παρελθόν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- 1. Αθανασιά, Βασιλική Κ.** (2023). Ανασκόπηση της συχνότητας απομόνωσης ειδών βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά την διετία 2021-2022. Μελέτη της αντιβιοαντοχής σε σχέση με τα επιδημιολογικά δεδομένα (Bachelor's thesis).
- 2. Γραμμάτω Δ. Ευαγγελοπούλου** (2022). Διερεύνηση της παρουσίας του γονιδίου ανθεκτικότητας (*mecA*) και των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκων (MRSA) από σφαγεία χοίρων στην περιοχή της Θεσσαλίας. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.
- 3. Κομοδρόμος Δημήτριος.** (2021). Συγκριτική επιδημιολογική μελέτη του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντα Σταφυλόκοκκου, στα παραγωγικά ζώα, στο κρέας τους, στο περιβάλλον και το προσωπικό σφαγείων και εγκαταστάσεων επεξεργασίας κρέατος της Βόρειας Ελλάδας. Διδακτορική Διατριβή.

ΑΓΓΛΟΦΩΝΗ

- 1. Westgeest, A. C., Hanssen, J. L., de Boer, M. G., Schippers, E. F., & Lambregts, M. M.** (2024). Eradication of community-onset MRSA carriage: a narrative review. *Clinical Microbiology and Infection*.
- 2. Morgan Bustamante, B. L., Fejerman, L., May, L., & Martínez-López, B.** (2024). Community-acquired *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infection risk assessment using hotspot analysis and risk maps: the case of California emergency departments. *BMC Public Health*, 24(1), 1-12.
- 3. Kamath, P. R., Imthiaz, N. F., Razak, A. A., Pai, V., & Shenoy, M. M.** (2024). A Study of Community-Acquired Pyodermas with Special Reference to Panton–Valentine Leukocidin (PVL)-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Indian Dermatology Online Journal*, 15(1), 69-72.

- 4. Hala, S., Fallatah, O., Bahaitham, W., Malaikah, M., Alarawi, M., Anasari, H., ... & Moradigaravand, D. (2024).** Concurrent Clonal Expansion of Community-Associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Clones in a Tertiary Hospital.

- 5. Roy, M. C., Chowdhury, T., Hossain, M. T., Hasan, M. M., Zahran, E., Rahman, M. M., ... & Hossain, F. M. A. (2024).** Zoonotic linkage and environmental contamination of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy farms: A one health perspective. *One Health*, 100680.

- 6. Rittscher, A. (2024).** A Comparison of Methods of MRSA Detection in Dutch Pig Farms (Master's thesis).

- 7. Gigot, C., Lowman, A., Ceryes, C. A., Hall, D. J., & Heaney, C. D. (2024).** Industrial Hog Operation Workers' Perspectives on Occupational Exposure to Zoonotic Pathogens: A Qualitative Pilot Study in North Carolina, USA. *NEW SOLUTIONS: A Journal of Environmental and Occupational Health Policy*, 33(4), 209-219.

- 8. Uprety, P., & Kirn, T. J. (2024).** Molecular detection of antimicrobial resistance. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 527-531). Academic Press.

- 9. Wang, S. H., Kebede, S., Abate, E., Amir, A., Calderon, E., Hoet, A. E., ... & Gebreyes, W. A. (2024).** Emergence and dissemination of antimicrobial resistance at the interface of humans, animals, and the environment. In *Modernizing Global Health Security to Prevent, Detect, and Respond* (pp. 113-136). Academic Press.

- 10. Cuny, C., Layer-Nicolaou, F., Werner, G., & Witte, W. (2024).** A look at staphylococci from the ONE HEALTH perspective. *International Journal of Medical Microbiology*, 151604.

- 11. de Paula Dias, C., Pereira, A. R., de Oliveira Paranhos, A. G., Rodrigues, M. V. D., de Lima, W. G., de Aquino, S. F., & de Queiroz Silva, S. (2024).** Spread of Multidrug-Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes in a Swine Wastewater Treatment Plant. *International Journal of Environmental Research*, 18(1), 2.

- 12. Hasmukharay, K., Ngoi, S. T., Saedon, N. I., Tan, K. M., Khor, H. M., Chin, A. V., ... & Ponnampalavanar, S. S. L. S. (2023).** Evaluation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia: Epidemiology, clinical characteristics, and outcomes in the older patients in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *BMC infectious diseases*, 23(1), 241.
- 13. Congdon, S. T., Guaglione, J. A., Ricketts, O. M. A., Murphy, K. V., Anderson, M. G., Trowbridge, D. A., Al-Abduladheem, Y., Phillips, A. M., Beausoleil, A. M., Stanley, A. J., Becker, T. J., & Silver, A. C. (2023).** Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with a college-aged cohort: life-style factors that contribute to nasal carriage. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1195758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1195758>
- 14. Ggetti, P., Giacoboni, G. I., Nievas, H. D., Nievas, V. F., Moredo, F. A., & Corso, A. (2023).** First Isolation of Methicillin-Resistant Livestock-Associated *Staphylococcus aureus* CC398 and CC1 in Intensive Pig Production Farms in Argentina. *Animals*, 13(11), 1796.
- 15. Zheng, L., Jiang, Z., Wang, Z., Li, Y., Jiao, X., Li, Q., & Tang, Y. (2023).** The prevalence of *Staphylococcus aureus* and the emergence of livestock-associated MRSA CC398 in pig production in eastern China. *Frontiers in microbiology*, 14, 1267885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1267885>
- 16. Silva, V., Araújo, S., Monteiro, A., Eira, J., Pereira, J. E., Maltez, L., ... & Poeta, P. (2023).** *Staphylococcus aureus* and MRSA in livestock: antimicrobial resistance and genetic lineages. *Microorganisms*, 11(1), 124.
- 17. Hamza, M., Sivaraman, G. K., & Mothadaka, M. P. (2023).** Evolution, Characteristics, and Clonal Expansion of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA): Global Perspectives. In *Handbook on Antimicrobial Resistance: Current Status, Trends in Detection and Mitigation Measures* (pp. 1-20). Singapore: Springer Nature Singapore.

18. **Khairullah, A. R., Kurniawan, S. C., Effendi, M. H., Sudjarwo, S. A., Ramandinianto, S. C., Widodo, A., Riwu, K. H. P., Silaen, O. S. M., & Rehman, S.** (2023). A review of new emerging livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pig farms. *Veterinary world*, 16(1), 46–58. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.46-58>
19. **Bustamante, B. L. M., May, L., Fejerman, L., & Martínez-López, B.** (2023). A Bayesian multilevel analysis exploring population-level effects mediating the relationship between area-level poverty and community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) infection across California communities. *Health & Place*, 83, 103094.
20. **Rhodes, N. J., Rohani, R., Yarnold, P. R., Pawlowski, A. E., Malczynski, M., Qi, C., ... & Wunderink, R. G.** (2023). Machine Learning To Stratify Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Risk among Hospitalized Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 67(1), e01023-22.
21. **Albert, E., Sipos, R., Perreten, V., Tóth, Á., Ungvári, E., Papp, M., ... & Biksi, I.** (2023). High Prevalence of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hungarian Pig Farms and Genomic Evidence for the Spillover of the Pathogen to Humans. *Transboundary and emerging diseases*, 2023.
22. **Zheng, L., Jiang, Z., Wang, Z., Li, Y., Jiao, X., Li, Q., & Tang, Y.** (2023). The prevalence of *Staphylococcus aureus* and the emergence of livestock-associated MRSA CC398 in pig production in eastern China. *Frontiers in Microbiology*, 14.
23. **Wang, Y., Zhang, P., Wu, J., Chen, S., Jin, Y., Long, J., ... & Yang, H.** (2023). Transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between animals, environment, and humans in the farm. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(37), 86521-86539.
24. **Abdullahi, I. N., Latorre-Fernández, J., Reuben, R. C., Trabelsi, I., González-Azcona, C., Arfaoui, A., ... & Torres, C.** (2023). Beyond the Wild MRSA: Genetic

Features and Phylogenomic Review of *mecC*-Mediated Methicillin Resistance in Non-aureus Staphylococci and Mammaliicocci. *Microorganisms*, 12(1), 66

25. Dierikx, C., Hengeveld, P., Witteveen, S., van Hoek, A., van Santen-Verheuvél, M., Montizaan, M., ... & van Duijkeren, E. (2023). Genomic comparison of *mecC*-carrying methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from hedgehogs and humans in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 78(5), 1168-1174.

26. Lee, G. Y., Lee, H. H., & Yang, S. J. (2023). Antimicrobial resistance profiles and clonal diversity of *Staphylococcus epidermidis* isolates from pig farms, slaughterhouses, and retail pork. *Veterinary Microbiology*, 282, 109753.

27. Martins-Silva, P., Dias, C. D. P., Vilar, L. C., de Queiroz Silva, S., Rossi, C. C., & Giambiagi-deMarval, M. (2023). Dispersion and persistence of antimicrobial resistance genes among *Staphylococcus* spp. and *Mammaliicoccus* spp. isolated along a swine manure treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(12), 34709-34719.

28. Hou, Z., Liu, L., Wei, J., & Xu, B. (2023). Progress in the Prevalence, Classification and Drug Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection and Drug Resistance*, 3271-3292.

29. Tzanakakis, V. A., Capodaglio, A. G., & Angelakis, A. N. (2023). Insights into Global Water Reuse Opportunities. *Sustainability*, 15(17), 13007.

30. Hussain, S., Zeshan, B., Arshad, R., Kabir, S., & Ahmed, N. (2022). MRSA Clinical Isolates Harboring *mecC* Gene Imply Zoonotic Transmission to Humans and Colonization by Biofilm Formation. *Pak. J. Zool*, 55, 999-1002.

31. Krüger-Haker, H., Ji, X., Bartel, A., Feßler, A. T., Hanke, D., Jiang, N., ... & Schwarz, S. (2022). Metabolic Characteristics of Porcine LA-MRSA CC398 and CC9 Isolates from Germany and China via Biolog Phenotype MicroArray™. *Microorganisms*, 10(11), 2116.

32. **Sahin-Tóth, J., Albert, E., Juhász, A., Ghidán, Á., Juhász, J., Horváth, A., ... & Dobay, O.** (2022). Prevalence of *Staphylococcus aureus* in wild hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and first report of *mecC*-MRSA in Hungary. *Science of The Total Environment*, 815, 152858

33. **Uehara, Y.** (2022). Current status of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC *mec*). *Antibiotics*, 11(1), 86.

34. **Hussain, S., Zeshan, B., Arshad, R., Kabir, S., & Ahmed, N.** (2022). MRSA Clinical Isolates Harboring *mecC* Gene Imply Zoonotic Transmission to Humans and Colonization by Biofilm Formation. *Pak. J. Zool*, 55, 999-1002.

35. **Silva, V., Monteiro, A., Pereira, J. E., Maltez, L., Igrejas, G., & Poeta, P.** (2022). MRSA in humans, pets and livestock in Portugal: Where we came from and where we are going. *Pathogens*, 11(10), 1110.

36. **Matuszewska, M., Murray, G. G., Ba, X., Wood, R., Holmes, M. A., & Weinert, L. A.** (2022). Stable antibiotic resistance and rapid human adaptation in livestock-associated MRSA. *Elife*, 11, e74819.

37. **Belhout, C., Elgroud, R., & Butaye, P.** (2022). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Other Methicillin-Resistant *Staphylococci* and *Mammaliicoccus* (MRNaS) Associated with Animals and Food Products in Arab Countries: A Review. *Veterinary Sciences*, 9(7), 317.

38. **Merla, C., Kuka, A., Petazzoni, G., Postiglione, U., Zatelli, M., Gaiarsa, S., ... & Cambieri, P.** (2022). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in inpatients: a snapshot from an Italian hospital. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 30, 10-15.

39. **Yamaguchi, T., Nakamura, I., Sato, T., Ono, D., Sato, A., Sonoda, S., ... & Tateda, K.** (2022). Changes in the genotypic characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* collected in 244 medical facilities in Japan between 2010 and 2018: a nationwide surveillance. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e02272-21.

40. **Li, X., Xie, L., Huang, H., Li, Z., Li, G., Liu, P., ... & Zeng, Z.** (2022). Prevalence of livestock-associated MRSA ST398 in a swine slaughterhouse in Guangzhou, China. *Frontiers in Microbiology*, 13, 914764.
41. **Golob, M., Pate, M., Kušar, D., Zajc, U., Papić, B., Ocepek, M., ... & Avberšek, J.** (2022). Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Two Pig Farms: Longitudinal Study of LA-MRSA. *Antibiotics*, 11(11), 1532.
42. **Bonardi, S., Cabassi, C. S., Manfreda, G., Parisi, A., Fiaccadori, E., Sabatino, A., ... & Pasquali, F.** (2022). Survey on Carbapenem-Resistant Bacteria in Pigs at Slaughter and Comparison with Human Clinical Isolates in Italy. *Antibiotics*, 11(6), 777.
43. **Savin-Hoffmeyer, M.** (2021). Clinically-relevant antibiotic-resistant bacteria in process waters and wastewater from poultry and pig slaughterhouses and assessment of the bacterial dissemination into surface waters (Doctoral dissertation, Universitäts-und Landesbibliothek Bonn).
44. **Silva, V., Gabriel, S. I., Borrego, S. B., Tejedor-Junco, M. T., Manageiro, V., Ferreira, E., ... & Poeta, P.** (2021). Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages of *Staphylococcus aureus* from Wild Rodents: First Report of mec C-Positive Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) in Portugal. *Animals*, 11(6), 1537.
45. **Silva, V., Ferreira, E., Manageiro, V., Reis, L., Tejedor-Junco, M. T., Sampaio, A., ... & Poeta, P.** (2021). Distribution and Clonal Diversity of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococci* in Surface Waters: Detection of ST425-t742 and ST130-t843 mec C-Positive MRSA Strains. *Antibiotics*, 10(11), 1416.
46. **Dube, F., Söderlund, R., Lampinen Salomonsson, M., Troell, K., & Börjesson, S.** (2021). Benzylpenicillin-producing *Trichophyton erinacei* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying the mec C gene on European hedgehogs—A pilot-study. *BMC microbiology*, 21, 1-11.

- 47. Gómez, P., Ruiz-Ripa, L., Fernández-Fernández, R., Gharsa, H., Ben Slama, K., Höfle, U., ... & Torres, C.** (2021). Genomic analysis of *Staphylococcus aureus* of the lineage CC130, including *mecC*-carrying MRSA and MSSA isolates recovered of animal, human, and environmental origins. *Frontiers in Microbiology*, 12, 655994.
- 48. Bonvegna, M., Grego, E., Sona, B., Stella, M. C., Nebbia, P., Mannelli, A., & Tomassone, L.** (2021). Occurrence of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRcons) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from pigs and farm environment in northwestern Italy. *Antibiotics*, 10(6), 676.
- 49. Astrup, L. B., Hansen, J. E., & Pedersen, K.** (2021). Occurrence and survival of livestock-associated MRSA in pig manure and on agriculture fields. *Antibiotics*, 10(4), 448.
- 50. Beier, R. C., Andrews, K., Hume, M. E., Sohail, M. U., Harvey, R. B., Poole, T. L., ... & Anderson, R. C.** (2021). Disinfectant and antimicrobial susceptibility studies of *Staphylococcus aureus* strains and ST398-MRSA and ST5-MRSA strains from swine mandibular lymph node tissue, commercial pork sausage meat and swine feces. *Microorganisms*, 9(11), 2401.
- 51. Galler, H., Luxner, J., Petternel, C., Reinthaler, F. F., Habib, J., Haas, D., ... & Zarfel, G.** (2021). Multiresistant bacteria isolated from intestinal faeces of farm animals in Austria. *Antibiotics*, 10(4), 466.
- 52. Lozano, C., Fernández-Fernández, R., Ruiz-Ripa, L., Gómez, P., Zarazaga, M., & Torres, C.** (2020). Human *mecC*-carrying MRSA: Clinical implications and risk factors. *Microorganisms*, 8(10), 1615.

