

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ &  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Συγκριτική αξιολόγηση βιολογικού και συμβατικού αίγιου και  
πρόβειου νωπού(κατεψυγμένου) γάλακτος για τον προσδιορισμό ολικών  
κολοβακτηριοειδών και τη διερεύνηση αντοχής των απομονωθέντων  
στελεχών στα αντιβιοτικά»**

**Μαρία Δ. Μπάρδα**  
**Κτηνίατρος Α.Π.Θ.**

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ &  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ**

**ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Συγκριτική αξιολόγηση βιολογικού και συμβατικού αίγιου και  
πρόβειου νωπού(κατεψυγμένου) γάλακτος για τον προσδιορισμό ολικών  
κολοβακτηριοειδών και τη διερεύνηση αντοχής των απομονωθέντων  
στελεχών στα αντιβιοτικά»**

**Μαρία Δ. Μπάρδα**  
**Κτηνίατρος Α.Π.Θ.**

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **1. Πουρνάρας Σπυρίδων (Επιβλέπων)**

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο  
Αθηνών

### **2. Κρικέλης Βασίλειος**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, Τ.Ε.Ι. Λάρισας

### **3. Μηνάς Αναστάσιος**

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, Τ.Ε.Ι. Λάρισας

*Στους γονείς μου*

## «Συγκριτική αξιολόγηση βιολογικού και συμβατικού αίγειου και πρόβειου νωπού (κατεψυγμένου) γάλακτος για τον προσδιορισμό ολικών κολοβακτηριοειδών και τη διερεύνηση αντοχής των απομονωθέντων στελεχών στα αντιβιοτικά»

**Λέξεις κλειδιά:** βιολογικό, βιολογική εκτροφή, αίγιο γάλα, πρόβιο γάλα, αντιμικροβιακή αντοχή, κολοβακτηριοειδή

### Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια οι βιολογικές εκτροφές βρίσκονται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος τόσο των καταναλωτών, όσο και της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας λόγω της αυξανόμενης ζήτησης των βιολογικών προϊόντων. Σε σχέση με τις συμβατικές παρουσιάζονται αυστηρότερες σε ότι αφορά τις απαιτήσεις σχετικά με τη διατροφή, τους χώρους και τις μεθόδους εκτροφής και τη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών για την πρόληψη και αντιμετώπιση ασθενειών και ευνοικότερες σε ότι αφορά τη διαβίωση των ζώων και τη διαχείριση του περιβάλλοντος. Ωστόσο δεν έχει αποδειχθεί επιστημονικά η υπεροχή των βιολογικών προϊόντων που παράγονται σε αυτές, σε σχέση με τα συμβατικά, σε ότι αφορά την ποιότητα και υγιεινή τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εξέταση της μικροβιολογικής ποιότητας βιολογικού και συμβατικού αιγοπρόβειου νωπού (κατεψυγμένου) γάλακτος ως προς τον προσδιορισμό των ολικών κολοβακτηριοειδών και τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής αντοχής των στελεχών των απομονωθέντων στελεχών αυτών. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 17 δείγματα συμβατικού και 17 δείγματα βιολογικού αίγειου και πρόβειου γάλακτος νωπού (κατεψυγμένου) από 34 συμβατικές και βιολογικές εκτροφές της περιοχής της Θεσσαλίας. Στα δείγματα αυτά έγινε προσδιορισμός των ολικών κολοβακτηριοειδών ως προς τον αριθμό και στη συνέχεια τα απομονωθέντα στελέχη ταυτοποιήθηκαν (Api 20E, Biomerieux) και διερευνήθηκε η αντιβιοαντοχή τους σε 8 αντιμικροβιακούς παράγοντες. Από τα 64 συνολικά στελέχη που απομονώθηκαν, 7 (11%) παρουσίασαν αντοχή σε έναν ή περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Από αυτά, 6 ήταν στελέχη *E. coli* με αντοχή στην αμπικιλίνη τα οποία ανιχνεύθηκαν σε βιολογικό γάλα και 1 ήταν στέλεχος *K. pneumoniae* ανθεκτικό στην αμπικιλίνη, αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό και κεφοξιδίνη σε συμβατικό γάλα. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p$ -value=0.015) ως προς το είδος γάλακτος –βιολογικό-και την παρουσία ανθεκτικών στελεχών. Άλλοι παράγοντες που αφορούσαν την εκτροφή όπως η υγιεινή των μαστών, η διάρκεια παραμονής του γάλακτος σε παγολεκάνες και ο τρόπος καθαρισμού του εξοπλισμού βρέθηκε ότι επίσης παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών ( $p$ -value=0.002,  $p$ -value=0.002,  $p$ -value=0.013)

**Key words:** organic, organic farm, goat's milk, ewe's milk, antimicrobial susceptibility, coliforms

## **Abstract**

Nowadays organic farms are very popular as consumers prefer the organic products considering them as healthier and safer. In comparison to conventional farms they have stricter regulations concerning feeding, establishments, breeding methods and usage of veterinary antimicrobial treatment. In addition, they guarantee animal welfare and less environmental burden. Nevertheless, it hasn't been proven that the organic products are actually healthier and safer than the conventional ones. The objective of this study was to assess the microbiological quality of organic and conventional raw (frozen) goat and ewe's milk obtained from organic and conventional farms from the region of Thessaly, Greece. In particular, the total coliform count and the antimicrobial susceptibility of the isolated strains in eight antimicrobial agents was compared both in organic and conventional milk. In this study 34 farms participated (17 organic and 17 conventional ones) from the region of Thessaly and 34 samples of organic and conventional milk were obtained and examined for the presence and counts of total coliform bacteria. In addition, the isolated strains were identified (Api 20E, Biomerieux) and their antimicrobial susceptibility was tested against 8 antimicrobial agents. Out of 64 isolates analysed, 7 of them were resistant (11%) in one or more antimicrobial agents. Out of 7 resistant isolates, 6 were *E.coli* strains with resistance in ampicillin in organic milk and one was *K. pneumoniae* with resistance in ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid and cefoxitin. The presence of resistant isolates was associated with the type of milk as more resistant bacteria were found in organic milk (statistically significant difference, p-value=0.015). Among several potential risk factors investigated for the presence of resistant bacteria were udder hygiene, duration of storage in bulk tanks of milk and the cleaning system of milk utensils that were identified as statistically significant (p-value=0.002, p-value=0.002, p-value=0.013 accordingly).

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ .....	i
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	<a href="#">ii</a>
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	iii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ .....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ .....	3
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ .....	3
2.1 ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΕΚΤΡΟΦΗ.....	3
2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΚΤΡΟΦΗ.....	4
2.2.1 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΦΩΝ .....	5
2.2.2 Η ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ .....	7
2.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ ΓΑΛΑ.....	8
2.4 ΟΛΙΚΑ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ (TOTAL COLIFORMS) .....	9
2.5 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ.....	14
2.5.1 ΟΡΙΣΜΟΙ.....	14
2.5.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	15
2.5.3 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ .....	16
2.5.4 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ .....	19
2.5.5 ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΟΡΓΑΝΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΗΣ ANTIBIOANTOXΗΣ .....	20
2.5.6 Η ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.....	21
2.6 ΣΚΟΠΟΣ .....	22
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>23</b>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ .....	24
3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24

3.1.1 ΔΕΙΓΜΑ .....	24
3.1.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	24
3.1.3 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ.....	25
3.1.4 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ .....	27
3.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....	28
Α) Ανίχνευση και καταμέτρηση Ολικών Κολοβακτηριοειδών (Total Coliforms) .....	28
Β) Ταυτοποίηση και απομόνωση των στελεχών .....	34
Γ) Διερεύνηση αντιβιοαντοχής των απομονωθέντων στελεχών .....	36
3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ .....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ .....	44
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	44
Α) Ανίχνευση και καταμέτρηση ολικών κολοβακτηριοειδών .....	44
Β) Απομόνωση και ταυτοποίηση των στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών .....	47
Γ) Διερεύνηση αντιβιοαντοχής των ολικών κολοβακτηριοειδών .....	49
Α) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Hafnia alvei</i> .....	52
Β) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>E.coli</i> .....	52
Γ) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Klebsiella spp</i> .....	53
Δ) Αντιμικροβιακή αντοχή του <i>Enterobacter spp</i> .....	55
Ε) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Pantoea spp</i> .....	58
ΣΤ) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Serratia spp</i> .....	59
Δ) Παράγοντες εκτροφής που σχετίζονται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών.....	61
4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	63
Α. Προσδιορισμός των ολικών κολοβακτηριοειδών .....	63
Β. Ταυτοποίηση στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών .....	64
Γ. Αντιμικροβιακή αντοχή των στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών .....	65
α) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Hafnia alvei</i> .....	65
β) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>E.coli</i> .....	66
γ) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Klebsiella spp</i> .....	67
δ) Αντιμικροβιακή αντοχή του <i>Enterobacter spp</i> .....	67



ε) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Pantoea spp</i> .....	68
στ) Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Serratia spp</i> .....	68
Δ. Παράγοντες εκτροφής που σχετίζονται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών .....	69
4.3 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ .....	70
4.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	71
4.5 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	73
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	73
Νομοθεσία .....	74
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	75
Ηλεκτρονικές πηγές .....	81

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος “Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή” του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής κ. Πουρνάρα Σπυρίδων, για την πολύτιμη βοήθεια του στην σωστή διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μελέτης τόσο σε επίπεδο διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και στο επίπεδο συγγραφής της και θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Κρικέλη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μηνά. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Λένα Μαλισσιόβα, κτηνίατρο και διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία πραγματοποίησε τη δειγματοληψία και η βοήθεια της οποίας κατά την πραγματοποίηση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν ανεκτίμητη. Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την άψογη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας και συγκεκριμένα την Άννα Κατσιαφλάκα, τη Μαρία Κυρίτση, τη Φωτεινή, την Αγγελική, τον Πέτρο, τον Δημήτρη, την Πόλυ, τη Μαρίνα και τον Αντώνη Κατσιούλη και φυσικά τον διευθυντή

του Εργαστηρίου και πρόεδρο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδερφή μου, όσο και τους φίλους μου, την Άννα, τη Νατάσσα και το Γιάννη που είναι μακριά, την Αγγελική και το Στάθη, το Νίκο και τη Βασούλα, τους φίλους μου εντός και εκτός μεταπτυχιακού για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη τους μέχρι την ολοκλήρωση αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος και τέλος το Γιάννη για την απίστευτη υποστήριξη και κατανόηση.

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<b>Διάγραμμα 1:</b> Αριθμός των ολικών κολοβακτηριοειδών ανα είδος γάλακτος .....	46
<b>Διάγραμμα 2:</b> Κατανομή των γενών των ολικών κολοβακτηριοειδών στο γάλα .....	47
<b>Διάγραμμα 3:</b> Είδη ολικών κολοβακτηριοειδών στο βιολογικό γάλα .....	48
<b>Διάγραμμα 4:</b> Είδη ολικών κολοβακτηριοειδών στο συμβατικό γάλα .....	49
<b>Διάγραμμα 5:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή των στελεχών των κολοβακτηριοειδών .....	51
<b>Διάγραμμα 6:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή στελεχών της <i>Hafnia alvei</i> .....	52
<b>Διάγραμμα 7:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή στελεχών της <i>E.coli</i> .....	53
<b>Διάγραμμα 8:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Klebsiella ozanae</i> .....	54
<b>Διάγραμμα 9:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	54
<b>Διάγραμμα 10:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	55
<b>Διάγραμμα 11:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή του <i>Enterobacter amnigenus</i> .....	56
<b>Διάγραμμα 12:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή του <i>Enterobacter cloacae</i> .....	56
<b>Διάγραμμα 13:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή του <i>Enterobacter gergoviae</i> .....	57
<b>Διάγραμμα 14:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή του <i>Enterobacter hormaechei</i> .....	57
<b>Διάγραμμα 15:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Pantoea spp</i> .....	58
<b>Διάγραμμα 16:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>P.agglomerans</i> .....	59
<b>Διάγραμμα 17:</b> Αντιμικροβιακή αντοχή της <i>Serratia rubidae</i> .....	59

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1:</b> Γένη και είδη κολοβακτηριοειδών και διάκρισή τους ανάλογα με το αν σχετίζονται με ασθένειες στον άνθρωπο ή όχι .....	11
<b>Πίνακας 2 :</b> Αντιβιοτικά κρίσιμης σημασίας για ανθρώπινη χρήση .....	17
<b>Πίνακας 3 :</b> Αντιβιοτικά εξαιρετικής σημασίας για ανθρώπινη χρήση.....	18
<b>Πίνακας 4 :</b> Σημαντικά αντιβιοτικά για ανθρώπινη χρήση .....	19
<b>Πίνακας 5:</b> Είδη θρεπτικών υποστρωμάτων .....	26
<b>Πίνακας 6:</b> Μηχανισμός δράσης αντιβιοτικών της μελέτης.....	37
<b>Πίνακας 7:</b> Περιεκτικότητα δραστικής ουσίας αντιβιοτικού σε μg/δίσκο .....	38
<b>Πίνακας 8:</b> Κρίσιμα όρια για χαρακτηρισμό στελεχών κατά EUKAST .....	42
<b>Πίνακας 9:</b> Αριθμός κολοβακτηριοειδών στα δείγματα συμβατικού γάλακτος .....	44
<b>Πίνακας 10:</b> Αριθμός κολοβακτηριοειδών στα δείγματα βιολογικού γάλακτος .....	45
<b>Πίνακας 11:</b> Αριθμός ολικών κολοβακτηριοειδών σε βιολογικό και συμβατικό γάλα.....	45
<b>Πίνακας 12:</b> Αριθμός ολικών κολοβακτηριοειδών με βάση το είδος ζώου .....	46
<b>Πίνακας 13:</b> Ταξινόμηση των στελεχών κολοβακτηριοειδών που απομονώθηκαν .....	48
<b>Πίνακας 14:</b> Αριθμός στελεχών που παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες .....	50
<b>Πίνακας 15:</b> Στελέχη κολοβακτηριοειδών με ενδογενή και επίκτητη αντοχή.....	51
<b>Πίνακας 16:</b> Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων .....	60
<b>Πίνακας 17:</b> Παράγοντες εκτροφής που σχετίζονται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών ....	62

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1:</b> Μέτρηση αποικιών στον μετρητή αποικιών.....	29
<b>Εικόνα 2:</b> Τυπικές αποικίες ολικών κολοβακτηριοειδών .....	30
<b>Εικόνα 3 :</b> Τρυβλίο MacConkey πριν την επώαση.....	31
<b>Εικόνα 4 :</b> Τρυβλίο MacConkey μετά την επώαση.....	32
<b>Εικόνα 5:</b> Αντιδραστήριο και διηθητικό χαρτί .....	33
<b>Εικόνα 6:</b> Εκτέλεση της δοκιμής της οξειδάσης.....	33
<b>Εικόνα 7:</b> Δοκιμή της ινδόλης.....	34
<b>Εικόνα 8:</b> API 20E μετά από την προσθήκη αντιδραστηρίων .....	35
<b>Εικόνα 9:</b> Φύλλο καταγραφής των αποτελεσμάτων του API 20E .....	36
<b>Εικόνα 10:</b> Μέθοδος διάχυσης δίσκων (Kirby-Bauer) .....	39
<b>Εικόνα 11:</b> Δράση(+) και μη (-) αντιβιοτικού.....	39
<b>Εικόνα 12:</b> Επίστρωση τρυβλίου .....	40
<b>Εικόνα 13:</b> Τοποθέτηση δίσκων αντιβιοτικών.....	40
<b>Εικόνα 14 :</b> Μέτρηση διαμέτρου κύκλου αναστολής (παχύμετρο) .....	41
<b>Εικόνα 15:</b> Μέτρηση διαμέτρου κύκλου αναστολής (χάρακας) .....	41

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γάλα αποτελεί ένα τρόφιμο υψηλής θρεπτικής αξίας που απευθύνεται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, θεωρείται κυρίαρχος αντιπρόσωπος των ζωικών προϊόντων και αποτελεί την πρώτη ύλη για την παρασκευή πλήθους γαλακτοκομικών προϊόντων, τυριών, γιαουρτιών.

Η υγιεινή του και η ποιότητά του εξαρτώνται άμεσα από την υγεία του ζώου, την διατροφή του, την φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνει και τις συνθήκες που επικρατούν στην εκτροφή. Το γάλα υψηλής ποιότητας πρέπει να περιέχει χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων, χαμηλό μικροβιακό φορτίο και να είναι απαλλαγμένο από παθογόνα και υπολείμματα αντιβιοτικών (Oliver *et al*, 2009)

Στις μέρες μας η πληθώρα διατροφικών σκανδάλων έχει προβληματίσει ιδιαίτερα το καταναλωτικό κοινό σε ότι αφορά την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων που προέρχονται από συμβατικές εκτροφές. Επιπλέον, θέματα που αφορούν την ευζωία των παραγωγικών ζώων, την διατροφή τους και την ορθολογική χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων αρχίζουν να αφορούν πλέον και την κοινή γνώμη η οποία αναζητά εναλλακτικές μορφές εκτροφών που να συνδιάζουν όλα τα παραπάνω καθώς και ποιοτικά και ασφαλή τρόφιμα. (Κράσσοσ και συν., 2005)

Η βιολογική εκτροφή με τις εναλλακτικές προτάσεις της σε θέματα διατροφής, ενσταυλισμού, φαρμακευτικής αγωγής, ευζωίας και περιβαλλοντικής διαχείρισης, υπόσχεται την παραγωγή προϊόντων που υπερέχουν ποιοτικά και θεωρητικά είναι ασφαλέστερα σε σχέση με τα παραγόμενα από συμβατικές εκτροφές (ICAP, 2005). Στα πλαίσια αυτά, τα τελευταία χρόνια η κατανάλωση βιολογικού γάλακτος και γαλακτοκομικών έχει αυξηθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια (Liu *et al.*, 2013).

Ωστόσο οι μελέτες που υπάρχουν μέχρι στιγμής, δεν παρουσιάζουν επαρκή δεδομένα που να αποδεικνύουν την υπεροχή του βιολογικού γάλακτος σε σχέση με το συμβατικό σε ότι αφορά την μικροβιολογική του ποιότητα και κατ'επέκταση την υγιεινή του.



Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι πιθανό να φέρουν σημαντικό αριθμό παθογόνων μικροβίων και να αποτελέσουν σημαντικές πηγές τροφιμογενών λοιμώξεων (Oliver *et al.*, 2005).

Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο γάλα μπορεί να οφείλεται είτε στην έκκρισή τους μέσω του γάλακτος από το μαστικό αδένες των ζώων που πάσχουν από μαστίτιδα είτε στη μόλυνσή τους από άλλες πηγές κυρίως από το περιβάλλον της εκτροφής (Φώτου *και συν.*, 2003). Τα ολικά κολοβακτηριοειδή, αποικίζουν το λεπτό έντερο των θηλαστικών και η ύπαρξή τους στο γάλα ή σε γαλακτοκομικά προϊόντα γενικότερα, είναι ενδεικτική κακών συνθηκών υγιεινής είτε κατά την παραγωγή, επεξεργασία και αποθήκευση του γάλακτος. Κατά συνέπεια, χρησιμοποιούνται ως δείκτης υγιεινής των εκτροφών και της παραγωγικής διαδικασίας.

Σε ότι αφορά το βιολογικό γάλα, δεν υπάρχουν μελέτες που να αποδεικνύουν την μικροβιολογική του υπεροχή έναντι του συμβατικού. Ωστόσο, διαθέτει θεωρητικά ένα σημαντικό πλεονέκτημα έναντι του συμβατικού καθώς στις βιολογικές εκτροφές απαγόρευεται αυστηρά η χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων (Καν. 834/2007; 889/2008)

Η χρήση των αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα είχε ευεργετικά αποτελέσματα για την κτηνοτροφία καθώς είχε ως αποτέλεσμα υγιέστερα και αποδοτικότερα ζώα και μεγαλύτερη παραγωγή των ζωοκομικών προϊόντων. Ωστόσο η αλόγιστη χρήση τους τις τελευταίες δεκαετίες έχει δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα, όπως την εμφάνιση καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στο γάλα και την αύξηση της μικροβιακής αντοχής στελεχών βακτηρίων, τα οποία μπορούν, μέσω της τροφικής αλυσίδας, να μεταδοθούν και στον άνθρωπο.

Παράλληλα, υπάρχει μεγάλη μερίδα καταναλωτών που στρέφεται στο αίγιο γάλα αντί του αγελαδινού και ειδικότερα στο βιολογικό αίγιο, το οποίο βλέπουμε να εδραιώνει την παρουσία του στα ράφια μας. Αυτό σε συνδυασμό με την ευρεία κατανάλωση τυριών και γιαουρτιών από αιγοπρόβειο γάλα στη χώρα μας και στην Ευρώπη γενικότερα υποδεικνύει την αναγκαιότητα ύπαρξης μελετών που αφορούν το συγκεκριμένο προϊόν.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 2.1 ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΕΚΤΡΟΦΗ

Οι βασικότερες μορφές της συμβατικής εκτροφής που εμφανίζονται στη χώρα μας είναι α) η οικόσιτη εκτροφή β) η εκτατική εκτροφή και γ) η εντατική εκτροφή.

Η **οικόσιτη** εκτροφή, αποσκοπούσε στην κάλυψη των διατροφικών αναγκών της οικογένειας σε ζωικά προϊόντα. Η μορφή αυτής της εκτροφής ήταν ιδιαίτερα αναπτυγμένη στην Ελλάδα μέχρι τη δεκαετία του 1970 λόγω έλλειψης επαρκούς δικτύου διανομής γαλακτοκομικών προϊόντων (Κοτρώτσιος, 2009). Στις μέρες μας έχει περιοριστεί αρκετά και αφορά την εκτροφή μικρού αριθμού ζώων που διατρέφονται με δημητριακούς καρπούς και συγκομιζόμενη χλωρή νομή. Χαρακτηριστικά της οικόσιτης εκτροφής αποτελούν η πανσπερμία του γενετικού υλικού, η χρήση συμπληρωματικών ζωοτροφών και η ιδιοτυπία των προϊόντων που παράγονται από αυτήν ( Ζωϊόπουλος και Παπαθεοδώρου, 2000).

Η **εκτατική** εκτροφή στηρίζεται στην εκτροφή εγχώριων φυλών, στη βόσκηση των ζώων σε φυσικούς βοσκότοπους, στη διαβίωσή τους υπό φυσικές συνθήκες για το μεγαλύτερο διάστημα ενώ κατά τους χειμερινούς μήνες περιορίζονται σε κλειστές εγκαταστάσεις για την προστασία τους από τις αντίξοες καιρικές συνθήκες. Στις εκτροφές αυτού του τύπου, χρησιμοποιούνται ζώα εγχώριων φυλών, άριστα προσαρμοσμένων στις ιδιαίτερες εδαφοκλιματικές συνθήκες της χώρας μας. Χαρακτηρίζονται ωστόσο τα ζώα αυτά, από χαμηλές αποδόσεις ενώ τα προϊόντα που παράγονται από αυτής της μορφής την εκτροφή διακρίνονται για τη γευστικότητά τους

Με το σύστημα αυτό εκτρέφεται στη χώρα μας το 85% των προβάτων και των αιγών και οι αγελάδες ελευθέρης εκτροφής για κρεοπαραγωγή (Ζωϊόπουλος & Παπαθεοδώρου, 2000).

Η **εντατική** εκτροφή των ζώων χαρακτηρίζεται από την εντατικοποίηση όλων των συντελεστών της εκτροφής και συγκεκριμένα το ζωικό κεφάλαιο, τη διατροφή, τις

εγκαταστάσεις, με κύριο στόχο την αύξηση της παραγωγής. Ειδικότερα, περιλαμβάνει ζώα υψηλών αποδόσεων, χορήγηση υπιενεργειακού σιτηρεσίου, που περιλαμβάνει συνδυασμό χονδροειδών και συμπυκνωμένων ζωοτροφών, χρήση ορμονικών σκευασμάτων (π.χ για συγχρονισμό οίστρου) κτηνιατρικών φαρμάκων και εμβολίων, σταβλισμό των ζώων σε κλειστές εγκαταστάσεις όπου διαβιούν εφόρου ζωής και υψηλή πυκνότητα αυτών στις σταβλικές εγκαταστάσεις. Η υψηλή πυκνότητα των ζώων που διαβιούν στις εκτροφές αυτές, μπορεί να προδιαθέσει την εμφάνιση και εξάπλωση μεταδοτικών ασθενειών (αφθώδης πυρετός, γρίπη των πτηνών και των χοίρων)( Ζέρβας, 1999).

## 2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΚΤΡΟΦΗ

Βιολογική εκτροφή ορίζεται η εκτροφή των ζώων που βασίζεται στη φυσική διαβίωσή τους, στην κάλυψη των διατροφικών αναγκών τους με ζωοτροφές κυρίως βιολογικής γεωργίας, στην περιορισμένη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων (μόνο για κατασταλτικούς και όχι για προληπτικούς λόγους) και στην εξασφάλιση των συνθηκών σταβλισμού των ζώων σύμφωνα με τις βιολογικές ηθολογικές ανάγκες τους ενώ αντιτίθεται προς τη γενετική τροποποίηση. Διακρίνεται για την ποιοτική υπεροχή και την ασφάλεια των προϊόντων που παράγει. Για να χαρακτηριστεί ένα κτηνοτροφικό προϊόν ως βιολογικό θα πρέπει να ελέγχεται και να πιστοποιείται η μονάδα εκτροφής των ζώων, η μεταποιητική μονάδα όπου παρασκευάζεται το μεταποιημένο προϊόν και η επιχείρηση που διακινεί το προϊόν αυτό (Καλιάνη, 2007)

Οι βασικές αρχές που διέπουν τη βιολογική εκτροφή είναι οι εξής (Καν.834/2007)

- Διατροφή με αποκλειστικά βιολογικά παραγόμενες ζωοτροφές
- Φυσική διαβίωση των ζώων
  - Υποχρεωτική πρόσβαση των ζώων σε βοσκότοπο
  - Μεγαλύτεροι χώροι σταβλισμού και προαύλιοι χώροι για να εξασφαλίζεται μεγαλύτερη άσκηση των ζώων

- Τα ζώα που εκτρέφονται με βιολογικό τρόπο αποκλειστικά πρέπει να βρίσκονται σε ξεχωριστές εγκαταστάσεις όταν στην εκμετάλλευση υπάρχουν και «συμβατικά» ζώα
- Η διατήρηση και προώθηση της βιοποικιλότητας με την αξιοποίηση εγχώριων φυλών και τύπων ζώων
- Εφαρμογή ομοιοπαθητικών και φυτοθεραπευτικών αγωγών πρόληψης και θεραπείας στα ζώα
- Απαγόρευση χρήσης αλλοπαθητικών κτηνιατρικών φαρμάκων και σε περίπτωση που είναι απολύτως απαραίτητη η χορήγησή τους, ο χρόνος αναμονής που εφαρμόζεται είναι διπλάσιος από αυτόν που ορίζει η νομοθεσία.
- Απαγόρευση χρήσης γενετικά τροποποιημένων οργανισμών και προϊόντων που προέρχονται από αυτούς
- Απαγόρευση χρήσης φυτοφαρμάκων
- Απαγόρευση χρήσης ουσιών για την προώθηση της ανάπτυξης ή της αναπαραγωγής καθώς και η χρήση ορμονών ή παρόμοιων ουσιών για τον έλεγχο της αναπαραγωγής ή άλλους σκοπούς

### 2.2.1 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΦΩΝ

Η νομοθεσία που προβλέπει τους κανονισμούς που αφορούν τη σύσταση και λειτουργία των βιολογικών εκτροφών τροποποιείται συνεχώς τα τελευταία χρόνια προκειμένου να συμβαδίσει με τη συνεχή εξέλιξη των τελευταίων (IFOAM, 2007) Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι σχετικοί κανονισμοί:

**Κανονισμός της Επιτροπής αριθ. 1804/1999** της Επιτροπής της 19ης Ιουλίου 1999: καθορίζει τις απαιτήσεις για τη βιολογική ζωική παραγωγή και για πρώτη φορά θεσπίζει κοινούς κανόνες για τη βιολογική κτηνοτροφία.

**Κανονισμός του Συμβουλίου (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91** της 24ης Ιουνίου 1991 περί του βιολογικού τρόπου παραγωγής γεωργικών προϊόντων και των σχετικών ενδείξεων στα

γεωργικά προϊόντα και στα είδη διατροφής.(Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L198 (22.7.1991) και μεταγενέστερες τροποποιήσεις του)

**Κανονισμός της Επιτροπής (ΕΚ) αριθ. 882/2004**

της 29ης Απριλίου 2004 σχετικά με τους επίσημους ελέγχους τροφίμων και ζωοτροφών προκειμένου να επαληθευτεί η τήρηση του νόμου περί τροφίμων και ζωοτροφών και τους κανονισμούς για την υγεία και την καλή μεταχείριση των ζώων. (Αναφέρεται και ως Κανονισμός OFFC)

**Κανονισμός του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 834/2007** της 28ης Ιουνίου 2007 για τη βιολογική παραγωγή, την επισήμανση βιολογικών προϊόντων και την κατάργηση του Κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91. (Επίσημη Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L189/1 (20.7.2007), 1-23.)

**Κανονισμός της Επιτροπής (ΕΚ) αριθ. 404/2008** της 6ης Μαΐου 2008: τροποποιεί το Παράρτημα ΙΙ του Κανονισμού του Συμβουλίου (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91 περί βιολογικής παραγωγής αγροτικών προϊόντων με την έγκριση των ουσιών pinosad, όξινο ανθρακικό κάλιο και οκτανικό χαλκό καθώς και της χρήσης αιθυλένιου. (Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L120/8 (7.5.2008), 8-10.)

**Κανονισμός της Επιτροπής (ΕΚ) αριθ. 889/2008** της 5ης Σεπτεμβρίου 2008: διατυπώνει λεπτομερείς κανόνες εφαρμογής του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 834/2007 του Συμβουλίου για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων όσον αφορά το βιολογικό τρόπο παραγωγής, την επισήμανση και τον έλεγχο των προϊόντων. (Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L250/1(18.9.2008), 1-84)

Ο Κανονισμός 889/2008 συχνά αναφέρεται ως "NIROF" (Νέοι κανόνες εφαρμογής για τη βιολογική παραγωγή).

**Κανονισμός της Επιτροπής αριθ. 1235/2008** της 8ης Δεκεμβρίου 2008: ορίζει το πλαίσιο των κανόνων εφαρμογής για τις εισαγωγές από τρίτες χώρες βάσει του Κανονισμού 834/2007.

**Κανονισμός της Επιτροπής αριθ. 1254/2008** της 15ης Δεκεμβρίου 2008: πρώτη τροποποίηση του Κανονισμού 889/2008 που επιτρέπει τη χρήση σε ποσοστό 100% ζωοτροφών σε μετατροπή που προέρχονται από μονάδα η οποία ανήκει στην ίδια εκμετάλλευση, τη διακοσμητική βαφή των αυγών που διατίθενται στην αγορά και θέτει πρότυπα για τη μαγιά.

### **ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΟΣ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 505/2012 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

της 14ης Ιουνίου 2012 για την τροποποίηση και διόρθωση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 889/2008 σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 834/2007 του Συμβουλίου για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων όσον αφορά τον βιολογικό τρόπο παραγωγής, την επισήμανση και τον έλεγχο των προϊόντων

Ο Κανονισμός 834/2007 τέθηκε σε ισχύ την 1η Ιανουαρίου 2009, μαζί με τους κανόνες εφαρμογής, τους κανονισμούς 889/2008 και 1235/2008.

## **2.2.2 Η ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

Στην Ελλάδα παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση της βιολογικής αιγοπροβατοτροφίας την περίοδο 2002-2006. Σε αυτό συνετέλεσαν σε μεγάλο βαθμό οι οικονομικές ενισχύσεις που θεσπίστηκαν με το πρόγραμμα «Βιολογικής Κτηνοτροφίας» στο πλαίσιο εφαρμογής του κανονισμού της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τους κλάδους της αιγοπροβατοτροφίας και χοιροτροφίας.

Σε ότι αφορά τη βιολογική κτηνοτροφία, η Ελλάδα παρουσιάζει συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με άλλες χώρες λόγω των ευνοϊκών κλιματολογικών συνθηκών, το ιδιόμορφο ανάγλυφο του εδάφους, των πλούσιων φυσικών πόρων, των ορεινών και ημιορεινών

περιοχών και της εφαρμογής της εκτατικής κτηνοτροφίας η οποία μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε βιολογική.

Επιπλέον το γεγονός ότι η Ελλάδα δεν έχει αναπτυγμένη βαριά βιομηχανία και τα επίπεδα της περιβαλλοντικής ρύπανσης είναι αρκετά χαμηλότερα συγκρινόμενη με άλλες χώρες συνηγορούν υπέρ αυτής της μετατροπής και ευνοούν την παραγωγή βιολογικών ζωοκομικών προϊόντων υψηλής ποιότητας (Κράσσοι και συν. 2005)

Το μεγαλύτερο ποσοστό ζώων που εκτρέφονται βιολογικά στην Ελλάδα είναι τα πρόβατα και οι αίγες όπως προκύπτει από τα στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων ( ΥΠ.Α.Α.Τ., 2013). Ειδικότερα, ο αριθμός των ενταγμένων ζώων στη βιολογική κτηνοτροφία για το 2013 ήταν :

- Πρόβατα: 610.489 (από 593.609 το 2012)
- Αίγες: 356.002 (από 349.789 το 2012)
- Βοοειδή: 71.034 (από 66.846 το 2012)
- Χοίροι: 4.797 (από 6292 το 2012)

### 2.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ ΓΑΛΑ

Με τον όρο **γάλα**, σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία, ορίζουμε το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν που παίρνουμε από τους μαστούς γαλακτοφόρου ζώου μετά από ένα πλήρες, ολοκληρωτικό και χωρίς διακοπή άρμεγμα από ζώα υγιή, τα οποία διατηρούνται και διατρέφονται καλά και δεν καταπονούνται (Κεχαγιάς, 1997).

Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων ορίζει ως: *«γάλα είναι το απηλλαγμένο πρωτογάλακτος προϊόν της ολοσχερούς άνευ διακοπής αμέλξεως υγιώς έχοντος γαλακτοφόρου ζώου διαβιούντος και διατρεφόμενου υπό υγιεινούς όρους και μη ευρισκομένου εις κατάσταση υπερκοπώσεως»*, ενώ κατά τους διεθνείς οργανισμούς FAO/ WHO ορίζεται ως *«γάλα είναι αποκλειστικά η κανονική έκκριση του μαστού που λαμβάνεται από ένα η περισσότερα αρμέγματα χωρίς οποιαδήποτε προσθήκη ή αφαίρεση»*.

Ως **βιολογικό γάλα** ορίζεται ως το γάλα που παράγεται από βιολογική εκτροφή αγελάδων και αιγοπροβάτων αφού παρέλθει χρονικό διάστημα 6 μηνών βιολογικής εκτροφής των ζώων για να μπορέσει να πιστοποιηθεί ως βιολογικό (Καν.834/2007)

#### Το βιολογικό γάλα

- είναι απαλλαγμένο από υπολείμματα φυτοφαρμάκων (τα οποία είναι συνήθως λιποδιαλυτά και περνούν σε μεγάλο ποσοστό στο γάλα) καθώς η διατροφή των ζώων που προέρχονται από βιολογική εκτροφή δεν περιέχει ζωοτροφές στις οποίες εφαρμόζονται φυτοφάρμακα.
- Είναι απαλλαγμένο από κατάλοιπα αντιβιοτικών, αντιπαρασιτικών κτηνιατρικών φαρμάκων (αλλοπαθητικών) καθώς απαγορεύεται οποιαδήποτε προληπτική χορήγηση και σε περίπτωση που αυτή κρίνεται απαραίτητη ο χρόνος αναμονής είναι διπλάσιος από αυτόν που προβλέπει η νομοθεσία για τις συμβατικές εκτροφές.
- Έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνη E, λιπαρά οξέα ω-3 και αντιοξειδωτικές ουσίες (λουτεΐνη και ζεαξανθίνη).

Σημαντικά μειονεκτήματά του είναι

- Το υψηλό κόστος (μεγάλο κόστος παραγωγής ζωοτροφών, κόστος δημιουργίας εγκαταστάσεων)
- Περιορισμένο δίκτυο διανομής

## **2.4 ΟΛΙΚΑ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ (TOTAL COLIFORMS)**

### **Ορισμός**

Ως ολικά κολοβακτηριοειδή χαρακτηρίζονται τα αερόβια και δυνητικά αναερόβια, Gram – αρνητικά, μη σπορογόνα βακτηρίδια που δύνανται να ζυμώσουν τη λακτόζη με παραγωγή οξέος και αερίου στους 35°C, εντός 24-48 ωρών.(ISO 4832:2006)



## **Κατάταξη**

Ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των *Enterobacteriaceae* και κυριότεροι εκπρόσωποι είναι τα γένη *Edwardsiella*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* (CDC)

## **Επιδημιολογία**

Κύρια πηγή τους είναι το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων καθώς η πλειοψηφία αυτών (*E.coli*) αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Ωστόσο μπορούν να βρεθούν στο έδαφος, στο νερό, στα φυτά (Bailey & Scott, 2002).

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει γένη και είδη που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου ή είδη που σχετίζονται με την πρόκληση λοιμώξεων στον άνθρωπο.

Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από γένη που δύνανται να αποικίσουν τον άνθρωπο αλλά σπανίως προκαλούν νόσο σε αυτόν. Συνηθέστερα χαρακτηρίζονται ως αποικιστές του περιβάλλοντος και των ζώων (Bailey et al, 2007)(Πίνακας 1).

**Πίνακας 1:** Γένη και είδη κολοβακτηριοειδών και διάκρισή τους ανάλογα με το αν σχετίζονται με ασθένειες στον άνθρωπο ή όχι

<b>Γένος</b>	<b>Είδη που σχετίζονται με ασθένειες στον άνθρωπο</b>	<b>Είδη που δεν σχετίζονται με ασθένειες στον άνθρωπο</b>
<b><i>Citrobacter spp</i></b>	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter(diversus) koseri</i> <i>Citrobacter amanolaticus</i>	<i>Citrobacter braaki</i> <i>Citrobacter farmeri</i> <i>Citrobacter gilleni</i> <i>Citrobacter murliniaei</i> <i>Citrobacter sedlakii</i> <i>Citrobacter werkmanii</i> <i>Citrobacter youngae</i>
<b><i>Escherichia spp</i></b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia fergusonii</i> <i>Escherichia hermannii</i> <i>Escherichia vulneris</i>
<b><i>Klebsiella spp</i></b>	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella ozanae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella ornitholytica</i> <i>Klebsiella planticola</i> <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>
<b><i>Pantoea spp</i></b>	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Pantoea</i>	
<b><i>Enterobacter spp</i></b>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter gergoviae</i> <i>Enterobacter sakazaki</i> <i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Enterobacter(cancerogenus)</i> <i>taylorae</i>	<i>Enterobacter absuriae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Enterobacter intermedium</i> <i>Enterobacter kobei</i>
<b><i>Hafnia spp</i></b>	<i>Hafnia alvei</i>	
<b><i>Serratia spp</i></b>	<i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia liquefaciens group</i>	<i>Serratia rubidae</i> <i>Serratia odorifera</i> <i>Serratia plymuthica</i> <i>Serratia ficaria</i>

## Παθογένεια Κολοβακτηριοειδών

Τα ολικά κολοβακτηριοειδή δεν θεωρούνται στο σύνολό τους παθογόνα για τον άνθρωπο, ωστόσο κάποια στελέχη που ανήκουν στα γένη *Citrobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp* και φυσικά η *E.coli* είναι δυνητικά παθογόνα και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή νόσο κυρίως σε ανοσοκατασταλμένους οργανισμούς και σε ευπαθείς ηλικιακές ομάδες.

Μπορεί να προκαλέσουν γαστρεντερικές και εξωγαστρεντερικές λοιμώξεις όπως πνευμονία, αποστήματα, λοιμώξεις του ουροποιητικού, διαπυήσεις τραυμάτων ακόμα και σηψαιμία (Farmer *et al.*, 2003)

Σε περίπτωση κατανάλωσης νωπού μη παστεριωμένου γάλακτος ή σε περίπτωση αστοχίας κατά την παστερίωση, τα κολοβακτηριοειδή στο γάλα μπορεί να προκαλέσουν σοβαρή νόσο. Η *E. coli O157:H7* αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα η οποία έχει απομονωθεί από νωπό γάλα (Karns *et al.*, 2007) και μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αιμορραγική διάρροια. Επίσης αρκετά είδη κολοβακτηριοειδών ενέχονται σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις με αποτέλεσμα να απομονώνονται από το 50% των σηψαιμιών, από το 70% λοιμώξεων του ουροποιητικού και το 30% γαστρεντερικών λοιμώξεων (Farmer *et al.*, 2003)

Ειδικότερα η *E.coli* αν και αποτελεί μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου αποτελεί το πιο συχνό βακτηρίδιο που απομονώνεται από κλινικά δείγματα και αποτελεί το συχνότερο αίτιο ουρολοιμώξεων (Αρσένη, 1994)

Ανάλογα με τους μηχανισμούς παθογένεσης τα στελέχη της *E.coli* διακρίνονται σε

- α) Εντεροτοξινογόνα ( Enterotoxigenic)(ETEC)
- β) Εντεροπαθογόνα (Enteropathogenic) (EPEC)
- γ) Εντεροδιδεισδυτικά (Enteroinvasive) (EIEC)
- δ) Εντεροαιμορραγικά ( Enterohemorrhagic) (EHEC) ή Shiga-Toxin producing *E.coli* (STEC)
- ε) Αυτοσυγκολλούμενα κυτταροπροσκολλητικά (Enteraggregative) (EAggEC)

## **Κολοβακτηριοειδή και παρουσία τους στο γάλα**

Τα κολοβακτηριοειδή ανιχνεύονται στο νωπό γάλα σχεδόν πάντα αλλά με την εφαρμογή ορθών υγιεινής πρακτικής κατά την παραγωγική διαδικασία είναι εφικτό να παραμείνει το μικροβιακό φορτίο τους χαμηλό (Boor *et al.*, 1998).

Είναι ευαίσθητα στην θερμική επεξεργασία και δεν επιβιώνουν κατά την παστερίωση. Επίσης είναι ευαίσθητα και σε χαμηλό pH (μέχρι 5,5 θεωρείται ότι μπορούν να αναπτυχθούν).

Η *E.coli* είναι ο μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη συχνότητα απομόνωσης στα κλινικά εργαστήρια (Baron, 1996).

Η παρουσία των ολικών κολοβακτηριοειδών στο γάλα και στα γαλακτοκομικά είναι δείκτης κακών συνθηκών υγιεινής της παραγωγής και του εξοπλισμού και λανθασμένων χειρισμών του γάλακτος (El-zubeir and Ahmed, 2007). Επίσης η άμελξη κατά την ύπαρξη υποκλινικής μαστίτιδας σε συνδυασμό με αυξημένες συνθήκες υγρασίας έχει ως αποτέλεσμα τη μόλυνση των δεξαμενών του νωπού γάλακτος και κατά συνέπεια την αύξηση του αριθμού των κολοβακτηριοειδών στο τελικό προϊόν (FAO, 2008, Zadoks *et al.*, 2007). Σύμφωνα με τους Kagki και συν. (2007) η παρουσία των κολοβακτηριοειδών στο γάλα εκτός από ένδειξη κοπρανώδους μόλυνσης, μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες, όπως η αυξημένη υγρασία και η μόλυνση των θηλών. Σε ότι αφορά τον αριθμό των κολοβακτηριοειδών, λιγότερα από 100 κύτταρα/ml θεωρείται αποδεκτό ωστόσο ακόμα μικρότεροι αριθμοί -λιγότερα από 10 κύτταρα /ml- μπορούν και είναι επιθυμητό να επιτευχθούν (Boor *et al.*, 1998).

Αντίθετα αριθμοί μεγαλύτεροι από 500 κύτταρα/ml είναι ενδεικτικά κακής υγιεινής είτε λόγω ανεπαρκούς καθαρισμού του εξοπλισμού είτε λόγω μόλυνσης κατά την διάρκεια της άμελξης με κόπρανα και χόμα (Murphy and Boor, 2003 )

## **Νομοθεσία για κολοβακτηριοειδή και νωπό γάλα**

Σε ότι αφορά το νωπό γάλα αιγοπροβάτων δεν υπάρχει θεσμοθετημένο όριο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Σύμφωνα με τους Jayarao *et al.* (2004) αν ο αριθμός των

κολοβακτηριοειδών είναι μικρότερος από 50 cfu/mL στο νωπό γάλα, τότε αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί «καλής ποιότητας». Ομοίως οι Shojaei και Yadollahi (2008) και οι Boor *et al.* (1998) συμφωνούν ότι τα αποδεκτά όρια θα έπρεπε να είναι λιγότερα από 100 κύτταρα /ml ωστόσο στις περισσότερες μελέτες που αφορούν το νωπό γάλα αναφέρονται μεγαλύτεροι αριθμοί, όπως οι Shojaei και Yadollahi (2008) αναφέρουν αριθμούς μεταξύ 1000-1300 κύτταρα/ml καθώς και οι Foschino *et al.*(2003)  $10^2$ - $10^3$  ml σε νωπό γάλα αιγοπροβάτων.

## 2.5 ANTIMIKROBIAKH ANTOXH

Η χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών αποτέλεσε σταθμό στην πρόοδο των επιστημών υγείας φέρνοντας την επανάσταση στη μάχη με τα λοιμώδη νοσήματα και βελτιώνοντας θεαματικά την βιωσιμότητα τόσο του ανθρώπου όσο και των ζωικών πληθυσμών. Ωστόσο η τεράστια αυτή επιτυχία επισκιάστηκε γρήγορα με την συνειδητοποίηση ότι οι βακτηριακοί πληθυσμοί διέθεταν την ικανότητα να προσαρμοστούν στα αντιμικροβιακά, να γίνουν ανθεκτικά και να μεταδώσουν τα χαρακτηριστικά της ανθεκτικότητας και σε άλλους μικροοργανισμούς.

Το φαινόμενο της αντιμικροβιακής αντοχής δεν είναι πρωτοεμφανιζόμενο, όμως ο ραγδαίος ρυθμός αναπτυξής του τα τελευταία χρόνια αποτελεί παγκόσμια ανησυχία.

### 2.5.1 ΟΡΙΣΜΟΙ

**Αντιμικροβιακή αντοχή** ορίζεται ως η ικανότητα του μικροοργανισμού να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται κατά την παρουσία ενός αντιμικροβιακού παράγοντα που φυσιολογικά θα έπρεπε να αναστείλει την ανάπτυξή του ή να τον σκοτώσει. Η αντιμικροβιακή αντοχή είναι ένας από τους πολλούς τρόπους προσαρμογής που διαθέτουν ή αποκτούν οι βακτηριακοί πληθυσμοί προκειμένου να ανταγωνιστούν και να επιβιώσουν έναντι άλλων μικροβιακών πληθυσμών ή των ξενιστών τους.

Με τον όρο **ενδογενή αντοχή** αναφερόμαστε στο είδος της αντοχής που είναι εγγενής και κωδικοποιείται και εκφράζεται από όλα (ή τουλάχιστον από την πλειοψηφία) τα στελέχη ενός συγκεκριμένου βακτηριακού είδους.

**Επίκτητη αντοχή** προκύπτει όταν εμφανιστούν αλλαγές στο βακτηριακό γενετικό υλικό είτε μέσω μετάλλαξης γονιδίων που προϋπάρχουν είτε μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγή της έκφρασης των πρωτεϊνών και αυτό με τη σειρά του σε δομικές και λειτουργικές αλλαγές του συγκεκριμένου βακτηρίου, το οποίο μπορεί να αλλάξει την συμπεριφορά του και να το καθιστήσει ανθεκτικό σε κάποιον αντιμικροβιακό παράγοντα. Αυτού του είδους η αντοχή καλείται επίκτητη και συναντάται σε επιλεγμένα στελέχη του συγκεκριμένου είδους του μικροοργανισμού.

Σε ότι αφορά την οριζόντια μεταφορά γονιδίων που φέρουν ανθεκτικότητα αυτή μπορεί να συμβεί τόσο μεταξύ στελεχών τόσο του ίδιου όσο και διαφορετικού είδους γεγονός που την καθιστά τον κυρίαρχο τρόπο εξάπλωσης της επίκτητης αντοχής (Χατζηδημητρίου, 2006).

### 2.5.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί με τους οποίους ένας μικροοργανισμός καθίσταται ανθεκτικός στη δράση μιας αντιμικροβιακής ουσίας. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι

- **Αναστολή δράσης του αντιμικροβιακού παράγοντα με παραγωγή αδρανοποιητικών ενζύμων** ( π.χ υδρολυτική εξουδετέρωση του β-λακταμικού δακτυλίου των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών από τις β-λακταμάσες)
- **Τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού στον μικροοργανισμό** (π.χ οι μεταλλαγές της γυράσης/ τοποϊσομεράσης, οι οποίες καθιστούν τον μικροοργανισμό ανθεκτικό στις κινολόνες)
- **Αποτυχία του αντιβιοτικού να φτάσει στο στόχο του με**
  - Μειωμένη πρόσληψη ή συσσώρευση του αντιβιοτικού
  - Μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου- απώλεια των πορινών

- **Ενεργοποίηση της αντλίας εξώθησης του αντιμικροβιακού με αντλίες εκροής (efflux pump)**

### 2.5.3 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ

Η υπερβολική και μη ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών στον τομέα της ιατρικής και της κτηνιατρικής τις τελευταίες δεκαετίες έχει συμβάλλει καθοριστικά στην εμφάνιση στελεχών μικροβίων με αντοχή στα αντιβιοτικά. Ειδικότερα η χρήση τους στην κτηνοτροφία ενοχοποιείται ως η πρωταρχική αιτία της αυξανόμενης αντιβιοαντοχής εντερικών παθογόνων για τα οποία οι ζωικοί πληθυσμοί λειτουργούν ως δεξαμενή. Ειδικότερα σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) και τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) η εμφάνιση των ανθεκτικών στελεχών των τριών κυριότερων παθογόνων - *Salmonella*, *Campylobacter* and *E. coli* – συνδέονται με τη χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία (FDA, 2009). Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί αποτελούν τους τρεις πρώτους που ευθύνονταν για το 90% των θανάτων που σε τροφιμογενείς λοιμώξεις στις Η.Π.Α. (Mead et al, 1999).

Η ταυτόχρονη χρήση ενός μεγάλου αριθμού αντιβιοτικών στην ιατρική και την κτηνιατρική πράξη θεωρείται ότι έχει αρνητική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία καθώς θεωρείται ότι συμβάλλει καθοριστικά στην αύξηση της αντιμικροβιακής αντοχής. Στα πλαίσια της αναγκαιότητας της διατήρησης της αποτελεσματικότητας κάποιων αντιβιοτικών ιδιαίτερα σημαντικών στην ιατρική πράξη, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει κατατάξει τα αντιβιοτικά με βάση τη σπουδαιότητά τους στις εξής κατηγορίες (Πίνακας 2, 3, 4)

- A) Κρίσιμης σημασίας για ανθρώπινη χρήση
- B) Εξαιρετικής σημασίας για τον άνθρωπο
- Γ) Σημαντικά για τους ανθρώπους

**Πίνακας 2 :** Αντιβιοτικά κρίσιμης σημασίας για ανθρώπινη χρήση

Κατηγορίες αντιμικροβιακών	ΖΩΑ				Ανθρώπινη χρήση
	Είδος ζώου	Αντιμετώπιση ασθενειών	Πρόληψη ασθενειών	Αυξητικοί παράγοντες	
<b>Αμινογλυκοσίδες</b> (γενταμικίνη, Νεομικίνη, Στεπτομικίνη)	Βοοειδή, Αιγοπρόβατα, Χοίροι,Πτηνά	Ναι	Ναι		Ναι
<b>Πενικιλίνες</b> (αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη)	Βοοειδή, Αιγοπρόβατα, Χοίροι, Πτηνά	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
<b>Κεφαλοσπορίνες γ' γενιάς</b> (κεφτιοφούρη)	Βοοειδή, πρόβατα, Χοίροι, Πτηνά	Ναι	Ναι		Ναι
<b>Γλυκοπεπίδια</b> (Αβοπαρσίνη,βανκομικίνη )	Χοίροι, Πτηνά			Ναι	Ναι
<b>Μακρολίδια</b> (Ερυθρομικίνη, τιλμικοσίνη, τυλοζίνη)	Βοοειδή, Χοίροι, Πτηνά	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
<b>Κινολόνες</b> (φλουροκινολόνες) Ενροφλοξασίνη Σαραφλοξασίνη	Βοοειδή, Πτηνά	Ναι	Ναι		Ναι
<b>Στρεπτογραμίνες</b> (Βιργινιαμικίνη Κινουπριστίνη - δαλφοπριστίνη)	Βοοειδή, Χοίροι,, Πτηνά	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Καρβαπενέμες Λιποπεπίδια Οξαζολιδινόνες ς Κυκλοσερίνη Ισονιαζίδη Αιθιοναμίδη Πυραζιναμίδη					Ναι



**Πίνακας 3 :** Αντιβιοτικά εξαιρετικής σημασίας για ανθρώπινη χρήση

Κατηγορίες αντιμικροβιακών	ΖΩΑ				Ανθρώπινη χρήση
	Είδος ζώου	Αντιμετώπιση ασθενειών	Πρόληψη ασθενειών	Αυξητικοί παράγοντες	
Κεφαλοσπορίνες α' γενιάς (κεφαδροξίλη)					Ναι
Κεφαλοσπορίνες β' γενιάς (κεφουροξίμη)					Ναι
Σπεκτινομυκίνη	Χοίροι Πτηνά		Ναι		Ναι
Σουλφοναμίδες	Βοοειδή, Χοίροι, Πτηνά, σολωμός,σαρδέλα	Ναι		Ναι	Ναι
Τετρακυκλίνες (Χλωρο τετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη)	Βοοειδή, Χοίροι, Πτηνά, πρόβατα, σολωμός, σαρδέλα, αστακός, μέλισσες	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Κεφαμυκίνες, Δοφαζιμίνη Μονοπακτά μες Αμινοπενικιλίνες Αντιψευδομοναδικ ές πενικιλίνες Σουλφόνες					Ναι

Πίνακας 4 : Σημαντικά αντιβιοτικά για ανθρώπινη χρήση

Κατηγορίες αντιμικροβιακών	ΖΩΑ				Ανθρώπινη χρηση
	Είδος ζώου	Αντιμετώπιση ασθενειών	Πρόληψη ασθενειών	Αυξητικοί παράγοντες	
Πολυπεπίδιο (βακτριρακίνη)			Ναι	Ναι	
Λινκοζαμίδες  Λινκομυκίνη			Ναι	Ναι	

#### 2.5.4 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Η παρουσία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών αποτελεί αναγνωρισμένο σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας Υγείας παγκοσμίως (ΚΕΕΛΠΙΝΟ, 2012)

- Είναι πλέον ένα πολύ διαδεδομένο φαινόμενο παγκοσμίως, ενώ παρουσιάζει συνεχή διαχρονική αύξηση.
- Ελαττώνει τις επιλογές για θεραπεία των αντίστοιχων λοιμώξεων, ενώ τα εναπομείναντα αντιβιοτικά είναι πολύ συχνά τοξικά ή μπορεί να εμφανίζουν μειονεκτική φαρμακοκινητική.

Δημιουργεί δηλαδή σημαντικά κλινικά προβλήματα, κυρίως στα νοσοκομεία, όπου πλέον από τα δεκάδες είδη αντιβιοτικών που κυκλοφορούν, λίγα έως ελάχιστα είναι δραστικά έναντι των πολυανθεκτικών νοσοκομειακών μικροβίων.

- Αυξάνει το κόστος είτε άμεσα, καθότι τα νεότερα αντιβιοτικά είναι ακριβότερα, είτε έμμεσα, λόγω της παράτασης του χρόνου νοσηλείας που οι δυσίατες αυτές λοιμώξεις συχνά προκαλούν. Επίσης, οι λοιμώξεις από ανθεκτικούς στα αντιβιοτικά μικροοργανισμούς απαιτούν συχνά νοσηλεία σε νοσοκομείο, σε αντίθεση από τις αντίστοιχες λοιμώξεις από ευαίσθητους μικροοργανισμούς.

- Αυξάνει τον ανθρώπινο πόνο, προκαλώντας συνήθως δυσίατες λοιμώξεις με υψηλή θνητότητα, αυξάνοντας έτσι το άμεσο και έμμεσο οικονομικό και κοινωνικό κόστος.

### **2.5.5 ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΟΡΓΑΝΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΗΣ ANTIBIOANTOXΗΣ**

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί συντονισμένα και αποτελεσματικά το εξαιρετικά ανησυχητικό φαινόμενο της αντιμικροβιακής αντοχής, αρκετοί κρατικοί και διεθνείς οργανισμοί έχουν αναλάβει δράση ώστε να περιοριστεί η εξάπλωση των αντιβιοανθεκτικών στελεχών με στόχο τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας των διαθέσιμων αντιβιοτικών και τη διασφάλιση της υγείας τόσο του ανθρώπινου όσο και των ζωικών πληθυσμών.

Ένα εξαιρετικό παραδειγμα αποτελεί η Δανία με την ίδρυση του DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program) μέσω του οποίου παρακολουθείται ετησίως η κατανάλωση ανθρώπινων και κτηνιατρικών αντιβιοτικών και καταγράφεται το ποσοστό της αντιβιοαντοχής βακτηρίων που απομονώνονται από τα παραγωγικά ζώα, τα τρόφιμα και τους ανθρώπους. (Stege *et al.*, 2003). Παράλληλα εθνικούς οργανισμούς για την καταγραφή και επιτήρηση της αντιμικροβιακής αντοχής συναντούμε και σε άλλες χώρες όπως στις Η.Π.Α. (National Antimicrobial Resistance Monitoring System -NARMS), στον Καναδά (Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance -CIPARS), στη Γαλλία (Observatoire National de Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques -ONERBA) και στην Ιαπωνία (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System). Τέλος υπάρχουν διεθνείς συνεργασίες στα πλαίσια της καταπολέμησης της αντιμικροβιακής αντοχής συγκεκριμένων παθογόνων όπως της σαλμονέλλας το Παγκόσμιο πρόγραμμα επιτήρησης της σαλμονέλλας από τον Π.Ο.Υ.(WHO Global Salm-Surv.) (WHO, 2003)

## 2.5.6 Η ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Στην Ελλάδα υπάρχει στα πλαίσια του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων βάση δεδομένων, η οποία δημιουργήθηκε το 1993 με βάση τους κανόνες και ορισμούς της Π.Ο.Υ. Στη βάση εισέρχονται ηλεκτρονικά και σε μηνιαία βάση τα δεδομένα πώλησης φαρμακευτικών ουσιών από τις φαρμακευτικές εταιρίες και τις φαρμακαποθήκες, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα αντιβιοτικά. Τα δεδομένα διακρίνονται σε πωλήσεις προς τα φαρμακεία τα ιδιωτικά και τα φαρμακεία των νοσοκομείων.

Δεν υπάρχει δυνατότητα κατανομής ανά γεωγραφική περιοχή. Τα δεδομένα κατανάλωσης έχουν το πλεονέκτημα ότι περιλαμβάνουν τις πωλήσεις OTC, αλλά δε διακρίνουν τον ακριβή προορισμό των πωλήσεων με δεδομένα συνταγών. Επιπλέον, η κατανάλωση των ιδιωτικών νοσοκομείων και κλινικών περιλαμβάνεται στις πωλήσεις στην κοινότητα, αφού αυτά δε διαθέτουν φαρμακεία και η διακίνηση των φαρμάκων τους γίνεται μέσω ιδιωτικών φαρμακείων (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012)

- Από το 2004, ο Ε.Ο.Φ. διαθέτει και τα δεδομένα των παράλληλων εξαγωγών, όπως αυτά του διατίθενται από τις φαρμακευτικές εταιρίες.
- Από το 2001, η χώρα μας συμμετέχει στο ευρωπαϊκό δίκτυο ESAC για την κατανάλωση αντιβιοτικών στην Ευρώπη, με δεδομένα κατανάλωσης που προέρχονται από τη βάση δεδομένων του Ε.Ο.Φ., και τα οποία αυτή τη στιγμή καλύπτουν το διάστημα 1997 - 2006. Από το 2004, η Ελλάδα είναι η πρώτη χώρα στην Ευρώπη σε συνολική κατανάλωση αντιβιοτικών, αφού η Γαλλία, που κατείχε τα πρωτεία, κατάφερε με εκστρατείες να μειώσει την κατανάλωσή της. Ιδιαίτερα υψηλή είναι η κατανάλωση στην κοινότητα, με έξαρση τους χειμερινούς μήνες και με κυρίαρχες ομάδες τις μακρολίδες, τις κεφαλοσπορίνες και τους αναστολείς (αμοξικιλίνη/ κλαβουλανικό). Όσον αφορά στη νοσοκομειακή κατανάλωση, η χώρα μας παρουσιάζει την υψηλότερη κατανάλωση σε προωθημένα αντιβιοτικά
- Καταβάλλεται προσπάθεια όπως ο Ε.Ο.Φ. βελτιώσει την ποιότητα των δεδομένων, τα οποία να παρέχει σε τριμηνιαία βάση στη Διατομεακή Επιτροπή για την Αντιμετώπιση της Μικροβιακής Αντοχής.

## 2.6 ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τίτλο «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή-Ποιότητα, Ασφάλεια Τροφίμων και Υδάτων και Δημόσια Υγεία».

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να γίνει συγκριτική αξιολογήση σε βιολογικό και συμβατικό πρόβειο και αίγιο νωπό (κατεψυγμένο) γάλα, ως προς τον αριθμό των ολικών κολοβακτηριοειδών και στη συνέχεια να γίνει διερεύνηση της αντιμικροβιακής αντοχής των στελεχών που απομονώθηκαν σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Τα ολικά κολοβακτηριοειδή επιλέχθηκαν αφενός μεν λόγω της κοινής αποδοχής τους ως δείκτες υγιεινής αφετέρου λόγω του γεγονότος ότι σε αυτά συγκαταλέγονται μικροοργανισμοί όπως η *E.coli* η οποία βρίσκεται συνεχώς στο προσκήνιο όχι μόνο λόγω της ευρύτατης διάδοσής της στο περιβάλλον όσο και της παθογονικότητας της *E.coli* O157 ιδιαίτερα σε ανοσοκατασταλμένα άτομα. Στο συγκεκριμένο μικροοργανισμό μας απασχολεί ιδιαίτερα η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών όχι μόνο της συχνής παρουσίας του αλλά και της παρουσίας πλασμιδίων στο γονιδίωμα του και κατ'έκταση της δυνατότητας δημιουργίας μεταλλάξεων και εμφάνισης νέων στελεχών.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

### 3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1.1 ΔΕΙΓΜΑ

Το δείγμα της έρευνας αποτέλεσαν 34 δείγματα (17 συμβατικά και 17 βιολογικά) νωπού (κατεψυγμένου) γάλακτος αιγών και προβάτων (22 αίγεια και 12 πρόβεια) που συλλέχθηκαν από συνολικά 34 βιολογικές και συμβατικές εκτροφές της Θεσσαλίας και συγκεκριμένα από το νομό Λάρισας (Συκούριο, Ελασσόνα, Μεσοχώρι) και από το νομό Μαγνησίας (Κανάλια, Σέσκλο, Πορταριά).

#### 3.1.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα συλλέχθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες σε αποστειρωμένα φιαλίδια των 50 ml, από την παγολεκάνη ή το γαλακτοδοχείο της κάθε εκτροφής, μετά το άρμεγμα και πριν την παστερίωση ή οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία του γάλακτος. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν υπό ψύξη στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε θερμοκρασία που δεν ξεπερνούσε τους 4<sup>0</sup>C, με μέγιστη ώρα μεταφοράς τις δύο ώρες. Στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -80<sup>0</sup>C μέχρι και την επεξεργασία τους.

#### ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΩΝ

Παράλληλα με τη δειγματοληψία έγινε και συμπλήρωση ερωτηματολογίων που περιείχαν πληροφορίες για την εκτροφή και τις διαχειριστικές πρακτικές που ακολουθούνταν.

Οι ερωτήσεις αφορούσαν πρωτίστως στοιχεία του ζωικού κεφαλαίου της εκτροφής (το είδος, τη φυλή, τον αριθμό εκτρεφόμενων ζώων) τις σταβλικές εγκαταστάσεις, τη διατροφή των ζώων, το νοσολογικό παρελθόν (με έμφαση στις κυριότερες αιτίες απωλειών), την κτηνιατρική παρακολούθηση της μονάδας, τη χορηγούμενη φαρμακευτική αγωγή (εμβολιακό πρόγραμμα, αποπαρασιτώσεις, αντιμικροβιακά- ουσίες και σκευάσματα) τη γαλακτοπαραγωγική διαδικασία (διάρκεια γαλακτικής περιόδου, αριθμός αρμεγόμενων ζώων, διαδικασία άμελξης, την υγιεινή των χώρων άμελξης και τον τρόπο καθαρισμού, την υγιεινή των μαστών και τον καθαρισμό ή μη πριν την άμελξη, την ποσότητα παραγόμενου γάλακτος, την διάθεση του γάλακτος μετά τη συλλογή (ύπαρξη παγολεκάνης ή γαλακτοδοχείων) τη διάρκεια παραμονής του γάλακτος μετά τη συλλογή (σε ώρες) καθώς και την πραγματοποίηση ή μη ελέγχων του γάλακτος στην εκτροφή ( χημική σύσταση, μικροβιακό φορτίο, ύπαρξη καταλοίπων αντιβιοτικών).

Οι πληροφορίες συλλέχθηκαν και συνεκτιμήθηκαν κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ούτως ώστε να γίνει σύνδεση των αποτεσμάτων με τις συνθήκες εκτροφής και εξαγωγή συμπερασμάτων.

### 3.1.3 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

#### A) Θρεπτικά υποστρώματα

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη περιγράφονται αναλυτικά με βάση το είδος και τη λειτουργία τους ( Πίνακας 5).

#### **Violet Red Bile lactose gar (VRBL)**(Oxoid, Hampshire, England)

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και καταμέτρηση των μικροοργανισμών που ζυμώνουν τη λακτόζη και τη διαφοροποίηση των κολοβακτηριοειδών από τα εντεροβακτηριακά που δεν τη ζυμώνουν στα γαλακτοκομικά, τρόφιμα και νερά. Περιέχει κρυσταλλικό ιώδες και χολικά οξέα που αναστέλλουν την ανάπτυξη των Gram + μικροοργανισμών, ουδέτερο ερυθρό που είναι δείκτης pH και λακτόζη την οποία ζυμώνουν, δημιουργούν σκούρες κόκκινες /μωβ αποικίες με άλω ίδιου χρώματος



### **MacConkey Agar (Merck & Co., INC., USA)**

Το MacConkey agar είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό που επιτρέπει την ανάπτυξη ορισμένων μόνο μικροοργανισμών, αναστέλλοντας την ανάπτυξη κάποιων άλλων. Περιέχει κρυσταλλικό ιώδες, χολικά οξέα, δείκτη pH neutral red (ουδέτερο ερυθρό) και λακτόζη. Συγκεκριμένα, το κρυσταλλικό ιώδες που περιέχει αναστέλλει τα Gram + ενώ τα χολικά οξέα ευνοούν την ανάπτυξη των εντεροβακτηριακών. Ωστόσο είναι και διαφοροποιητικό καθώς περιέχει τη λακτόζη την οποία δεν ζυμώνουν όλα τα εντεροβακτηριακά παρά μόνο τα κολοβακτηριοειδή

### **Nutrient Agar (NA)**

Κατάλληλο για μικροοργανισμούς που δεν έχουν αυξημένες θρεπτικές απαιτήσεις

### **Tryptone water (TW)**

Περιέχει τρυπτόνη. Χρησιμοποιείται για τη δοκιμή διάσπασης της ινδόλης. Διαφοροποιεί την *E.coli* από τα υπόλοιπα κολοβακτηριοειδή

### **Maximum Recovery Diluent (MRD)**

Είναι ισότονο διάλυμα κάτι που εξασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή ανάκτηση των μικροοργανισμών. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε πεπτόνη αναστέλλει τον πολ/σμο κατά την αραίωση χωρίς να επηρεάζεται η ζωτικότητα του μικροοργανισμού.

**Πίνακας 5:** Είδη θρεπτικών υποστρωμάτων

Θρεπτικό Υπόστρωμα	Είδος/χρήση
<b>Violet Red Bile lactose gar (VRBL)</b> (Oxoid, Hampshire, England)	Θρεπτικό Εκλεκτικό Διαφοροποιητικό
<b>MacConkey Agar</b> (Merck & Co., INC., USA)	Εκλεκτικό Διαφοροποιητικό
<b>Nutrient Agar (NA)</b>	Θρεπτικό
<b>Tryptone water (TW)</b>	Διαφοροποιητικό
<b>Maximum Recovery Diluent (MRD)</b>	Αραιωτικό Μέσο

## **Β)Χημικά Αντιδραστήρια**

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το αντιδραστήριο της οξειδάσης (τετραμεθυλ-π-φαινυλενοδιαμίνη σε διάλυμα 1%), το αντιδραστήριο Kovacs, παραφινέλαιο, διάλυμα γλυκερόλης, αμπούλες φυσιολογικού ορού.

## **Γ)Χρησιμοποιούμενα αναλώσιμα**

Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα τρυβλία, βαμβακοφόροι στελλεοί, δοκιμαστικοί σωλήνες, πλαστικοί περιέκτες Falcon (χωρητικότητας 15ml), πιπέτες μιας χρήσης των 10ml, 20 ml, ρύγχη (tips) των 100μl(=0,1ml), 1000μl(=1ml) για τις πιπέτες μεταβλητού όγκου, στατό δοκιμαστικών σωλήνων, αντικειμενοφόρες πλάκες, μικροβιολογικοί κρίκοι μικρού και μεσαίου μεγέθους μιας χρήσης, πλαστικά φιαλίδια Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml, λαβίδες, διηθητικό χαρτί.

### **3.1.4 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ**

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω:

- Αναλυτικός ζυγός (Shimadzu)
- Υδατόλουτρο (WBT 22, Medingen)
- Επωαστικός κλίβανος (Incubig, P selecta)
- Μετρητής αποικιών (Digital S, P selecta)
- Φλόγα μηχανής (IBS, Integra Biosciences)
- Καταψύκτης (Form-86 ULT Freezer, Thermo Electron Corporation)
- Θερμαινόμενος Μαγνητικός Αναδευτήρας (ADE, Velp Scientifica)
- Νεφελόμετρο
- Λύχνος Bunsen

## 3.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### A) Ανίχνευση και καταμέτρηση Ολικών Κολοβακτηριοειδών (Total Coliforms)

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση των ολικών κολοβακτηριοειδών είναι η μέθοδος καταμέτρησης των ολικών κολοβακτηριοειδών με ενσωμάτωση σε γάλα κατά ISO 4832:2006.

Σύμφωνα με το πρότυπο, ως κολοβακτηριοειδή θεωρούνται οι μικροοργανισμοί οι οποίοι έπειτα από επώαση 24 ωρών στους 30°C, σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Lactose agar (VRBL) σχηματίζουν τυπικές αποικίες κόκκινου χρώματος.

Κατά την επιβεβαιωτική δοκιμή, προκαλούν ζύμωση της λακτόζης με ταυτόχρονη παραγωγή αερίου (όπως θα περιγραφεί με λεπτομέρεια παρακάτω)

#### ➤ Προετοιμασία του δείγματος

Τα δείγματα του γάλακτος που βρισκόταν σε κατάψυξη στους -80°C, τοποθετήθηκαν στο ψυγείο, όπου και παρέμειναν για 24 ώρες προκειμένου η απόψυξη τους να γίνει πιο ομαλά.

#### ➤ Εκτέλεση διαδοχικών αραιώσεων

Ακολούθησε η δημιουργία δεκαδικών αραιώσεων (9 ml MRD και 1 ml δείγματος). Χρησιμοποιήθηκε ως αραιωτικό μέσο το Maximum Recovery Diluent το οποίο είναι ισότονο διάλυμα και διασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή ανάκτηση των μικροοργανισμών ελαχιστοποιώντας το φυσιολογικό σοκ που δημιουργείται στους μικροοργανισμούς κατά τον ενοφθαλμισμό. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν της τάξης του  $10^4$

#### ➤ Ενοφθαλμισμός σε θρεπτικό υλικό

Ο ενοφθαλμισμός του δείγματος στο θρεπτικό υλικό έγινε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης (η οποία πλεονεκτεί έναντι της επιφανειακής επίστρωσης καθώς μας δίνει πληροφορίες για το αν ο οργανισμός είναι αερόβιος, ανερόβιος ή προαιρετικά αναερόβιος).

Έγινε μεταφορά 1 ml από το αναρραϊωτο δείγμα και 1 ml από κάθε αραιώση σε αντίστοιχο αριθμό τρυβλίων *petri*. Στη συνέχεια προστέθηκαν 15 ml του θρεπτικού υποστρώματος VRBL (Violet Red Bile Lactose Agar) το οποίο ήταν ρευστοποιημένο στους 45°C σε κάθε τρυβλίο, έγινε ανάδευση με ήπιες κινήσεις και αφέθηκε σε ηρεμία προκειμένου να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια προστέθηκαν επιφανειακά 3-4 ml επιπλέον θρεπτικού υλικού και το αφήσαμε να στερεοποιηθεί.

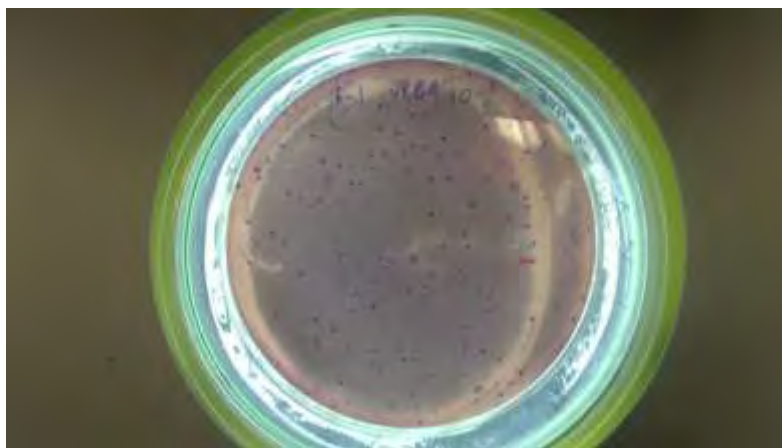
Παράλληλα, προστέθηκαν 15 ml από το άγαρ σε ένα μη εμβολιασμένο τρυβλίο για έλεγχο αποστείρωσης του θρεπτικού υλικού.

#### ➤ Επώαση

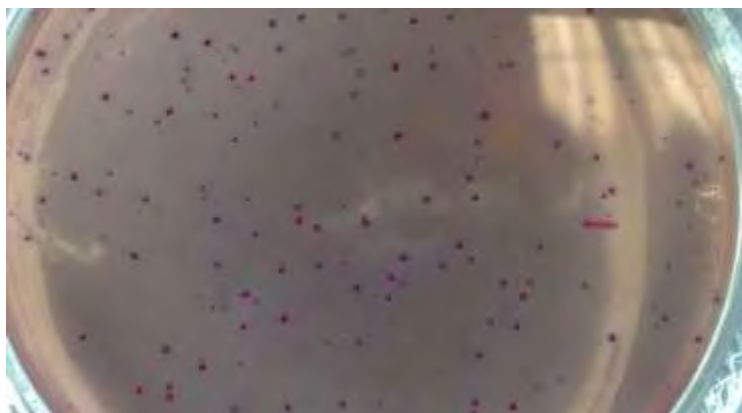
Αναστράφηκαν τα τρυβλία και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης στους 30°C για 24 ώρες.

#### ➤ Καταμέτρηση

Μετά από επώαση 24 ωρών πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (κόκκινου/μωβ χρώματος οι οποίες μπορεί να περιβάλλονται από διαυγή ζώνη ίδιου χρώματος) διαμέτρου μέχρι και 0.5 mm. Επιπλέον έγινε καταμέτρηση και των άτυπων αποικιών και στη συνέχεια έγινε επιβεβαίωση αυτών με τις δοκιμές που περιγράφονται παρακάτω. Η αρίθμηση των αποικιών γίνεται στο μετρητή αποικιών (εικόνα 1, 2)



**Εικόνα 1:** Μέτρηση αποικιών στον μετρητή αποικιών



**Εικόνα 2:** Τυπικές αποικίες ολικών κολοβακτηριοειδών

Μετρήσιμα θεωρήθηκαν τα τρυβλία με 15-150 αποικίες. Η καταμέτρηση γίνεται είτε χειροκίνητα είτε με τη χρήση αυτόματου μετρητή αποικιών. Ο αριθμός των cfu/ml των κολοβακτηριοειδών προκύπτει από τον τύπο:

$$N = \frac{\Sigma \alpha}{V (n_1 + 0.1 n_2) d}$$

Όπου

$\Sigma \alpha$  = άθροισμα αποικιών από όλα τα τρυβλία ενός δείγματος (όλων των αραιώσεων)

$n_1$  = αριθμός τρυβλίων στην πρώτη αραιώση που καταμετρήθηκε

$n_2$  = αριθμός τρυβλίων στην δεύτερη αραιώση που καταμετρήθηκε

$V$  = ο όγκος του δείγματος

$d$  = αραιώση από την οποία ελήφθησαν οι πρώτες μετρήσεις

- Σε περίπτωση που έχουμε <15 cfu/τρυβλίο χρησιμοποιούμε τον παρακάτω τύπο:

$$N = Y/d \times V$$

Όπου

$Y$  = ο αριθμητικός μέσος των αποικιών που μετρήθηκαν σε όλα τα τρυβλία

$d$  = ο συντελεστής αραιώσης της αρχικής αραιώσης

$V$  = ο όγκος του ενοφθαλμισμένου δείγματος σε κάθε τρυβλίο

## Επιβεβαιωτικές δοκιμές

### Α) Δοκιμή ζύμωσης της λακτόζης

Σε περίπτωση που έχουμε άτυπες αποικίες στο VRBA, εμβολιάζουμε πέντε ύποπτες αποικίες σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες με Lactose Broth ή Brilliant Green Bile Broth 2% στο οποίο έχουμε προσθέσει ανεστραμμένο σωληνάκι Durham. Επωάζουμε για 48 ώρες στους 35<sup>0</sup>C και εφόσον έχουμε ζύμωση της λακτόζης έχουμε αλλαγή χρώματος και παραγωγή αερίου και εμφάνιση φυσαλίδας στο ανεστραμμένο σωληνάκι.

## Επιπρόσθετες επιβεβαιωτικές δοκιμές

### α) Καλλιέργεια σε MacConkey Agar

Προκειμένου να εξετάσουμε τη ζύμωση της λακτόζης μπορούμε εναλλακτικά να κάνουμε ανακαλλιέργεια των ύποπτων αποικιών σε τρυβλίο με MacConkey agar. Μεταφέρουμε 5 από κάθε ύποπτη αποικία σε τρυβλίο με MacConkey Agar και επωάζουμε στους 37<sup>0</sup>C για 24 ώρες. Οι αποικίες που θα παρουσιαστούν αποτελούν επιβεβαιωμένο αριθμό κολοβακτηριοειδών. Εκτός από τη ζύμωση της λακτόζης με τη συγκεκριμένη δοκιμή δίνεται η δυνατότητα αξιολόγησης της μορφολογίας και καθαρότητας των εξεταζόμενων αποικιών (Εικόνες 3, 4)



**Εικόνα 3 :** Τρυβλίο MacConkey πριν την επώαση



**Εικόνα 4** : Τρυβλίο MacConkey μετά την επώαση

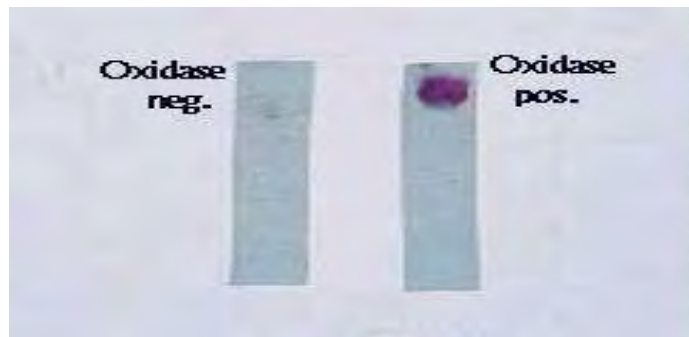
#### β) Δοκιμή της οξειδάσης

Για την εκτέλεση της δοκιμής της οξειδάσης, έγινε ανακαλλιέργεια σε Nutrient agar των ύποπτων αποικιών και στη συνέχεια ακολούθησε η δοκιμή της οξειδάσης η οποία είναι αρνητική για τα ολικά κολοβακτηριοειδή (Εικόνα 5,6). Συγκεκριμένα έγινε μεταφορά γραμμωτά των ύποπτων αποικιών στο τρυβλίο με Nutrient Agar και κατόπιν ακολούθησε επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 18-48 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, έγινε έλεγχος της μορφολογίας των αποικιών και λήψη υλικού για την εκτέλεση της δοκιμής της οξειδάσης η οποία πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Εμβάπτιση ταινίας από διηθητικό χαρτί με το αντιδραστήριο της οξειδάσης (τετραμεθυλ-π-φαινυλενοδιαμίνη σε διάλυμα 1% )
- Λήψη υλικού από φρέσκια αποικία με πλαστικό μικροβιολογικό κρίκο
- Απλώνεται το υλικό με τον κρίκο στην εμποτισμένη ταινία
- Παρατηρείται τυχόν αλλαγή χρώματος μέσα σε 10''



**Εικόνα 5:** Αντιδραστήριο και διηθητικό χαρτί



**Εικόνα 6:** Εκτέλεση της δοκιμής της οξειδάσης

### γ) Δοκιμή της ινδόλης

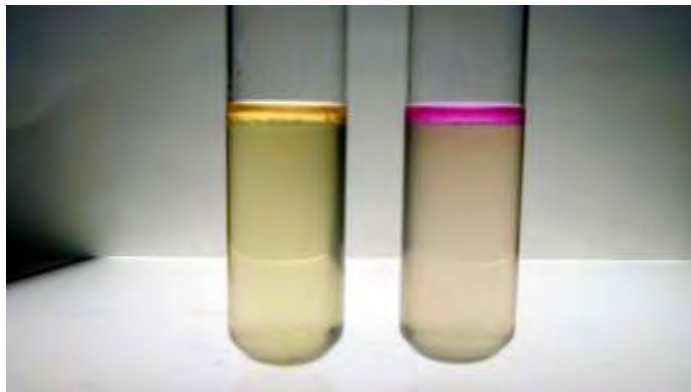
Ήδη από το 1889 η δοκιμή της ινδόλης χρησιμοποιούνταν για τη διαφοροποίηση της *E.coli* και του *Enterobacter aerogenes* (MacFaddin, 2000). Σήμερα εξακολουθεί να παραμένει από τις κλασικές πλέον βιοχημικές δοκιμές προκειμένου να διαφοροποιηθεί η ινδόλη-θετική *E.coli* από τα περισσότερα ινδόλη-αρνητικά είδη των κολοβακτηριοειδών όπως *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Pantoea spp*, *Hafnia spp*.

Η αρχή της δοκιμής στηρίζεται στην ικανότητα του μικροοργανισμού να διασπά το αμινοξύ τρυπτοφάνη - μέσω του ενζύμου τρυπτοφανάση- προς σχηματισμό ινδόλης (Εικόνα 7). Χρησιμοποιείται ως μέρος των βιοχημικών δοκιμών IMViC τις οποίες εκτελούμε προκειμένου να διακρίνουμε τα μέλη της οικογένειας των εντεροβακτηριακών.



Διαδικασία:

- Εμβολιάζεται λίγη ποσότητα φρέσκιας καλλιέργειας σε δοκιμαστικό σωλήνα με Tryptone Water
- Επωάζεται στους 37<sup>0</sup>C για 24 ώρες
- Γίνεται προσθήκη 5 σταγονών από το αντιδραστήριο Kovacs
- Σε ινδόλη-θετικό μικροοργανισμό, σχηματίζεται ροζ δακτύλιος στο επιφανειακό στρώμα του εναιωρήματος μέσα σε δευτερόλεπτα
- Σε ινδόλη-αρνητικό μικροοργανισμό το επιφανειακό στρώμα παραμένει κίτρινο



**Εικόνα 7:** Δοκιμή της ινδόλης

## **B) Ταυτοποίηση και απομόνωση των στελεχών**

Στην παρούσα εργασία η ταυτοποίηση των στελεχών μας πραγματοποιήθηκε με εμπορικό κωδικοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης API 20E της Biomerieux. Ουσιαστικά πρόκειται για ένα αυτόνομο μικροσύστημα των συμβατικών βιοχημικών δοκιμασιών ταυτοποίησης των εντεροβακτηριακών (Biomerieux)

Τα εμπορικά κωδικοποιημένα συστήματα ταυτοποίησης είναι υποστρώματα σε αποξηραμένη μορφή που βρίσκονται σε ειδικούς υποδοχείς πάνω σε ταινίες ή πλάκες και προορίζονται για πολλές κατηγορίες μικροοργανισμών όπως είναι τα Gram (+), τα Gram

(-), τα εντεροβακτηριακά, οι σταφυλόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι, βάκιλλοι, αναερόβια, μύκητες κ.α ( Βρυώνη και Παγκάλη, 2009).

Τα υποστρώματα ανασυστήνονται με την εφαρμογή του μικροβιακού εναιωρήματος, το οποίο πρέπει να είναι ορισμένης πυκνότητας της κλίμακας MacFarland (0.5) και την εφαρμογή αναλόγως αερόβιων ή αναερόβιων συνθηκών. Κατόπιν γίνεται επώαση για 18-24 ώρες και προστίθενται κατά περίπτωση τα διάφορα αντιδραστήρια.

Αναλυτικά στη δική μας μελέτη:

- Παρασκευάστηκε μικροβιακό εναιώρημα 0.5 MacFarland με υλικό φρέσκιας καλλιέργειας (από τρυβλίο MacConkey) το οποίο εμβολιάστηκε σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε φυσιολογικό ορό NaCl 0.85% (τα παρέχει η κατασκευάστρια εταιρία)
- Μετρήθηκε η πυκνότητα του βακτηριακού εναιωρήματος στο νεφελόμετρο έτσι ώστε να είναι 0.5 MacFarland
- Ενοφθαλμίστηκε το βακτηριακό εναιώρημα στο υπόστρωμα και επώαστηκε στους 37<sup>0</sup>C για 24 ώρες.
- Στη συνέχεια έγινε προσθήκη των αντιδραστηρίων και αξιολογήθηκε η χρωματική μεταβολή για την κάθε παράμετρο βάση πινάκων και οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρίας.



**Εικόνα 8:** API 20E μετά από την προσθήκη αντιδραστηρίων

Με βάση τη χρωματική μεταβολή, αξιολογείται το αποτέλεσμα το οποίο είναι χαρακτηρίζεται ως θετικό (+) ή αρνητικό (-) (Εικόνα 8). Αθροίζεται η βαθμολογία ανα τρεις αντιδράσεις και ο τελικός αριθμός που προκύπτει (επταψήφιος) εισάγεται σε πρόγραμμα υπολογιστή της κατασκευάστριας εταιρίας (APIweb) και αυτομάτως μεταφράζεται το είδος του μικροοργανισμού (π.χ. *E.coli*). Η βάση δεδομένων της κατασκευάστριας εταιρίας εκτός από το αποτέλεσμα π.χ. *E.coli* μας δίνει και πληροφορίες για την ποιότητα της ταυτοποίησης επί τοις % (Εικόνα 9). Αν το ποσοστό είναι χαμηλό τότε η ταυτοποίηση δε θεωρείται αποδεκτή και συνιστάται να επαναληφθεί.



Εικόνα 9: Φύλλο καταγραφής των αποτελεσμάτων του API 20E

### Συντήρηση σε γλυκερόλη

Αφού ταυτοποιήθηκαν τα στελέχη συντηρήθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης σε βαθιά κατάψυξη ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) μέχρι το στάδιο διερεύνησης της αντιβιοαντοχής τους.

### Γ) Διερεύνηση αντιβιοαντοχής των απομονωθέντων στελεχών

Για τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας των στελεχών που απομονώθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών κατά Kirby-Bauer.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αμπικιλίνη, η αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ, η αμικασίνη, η σιπροφλοξασίνη, η κεφεπίμη, η κεφοξιτίνη, η κεφοταξίμη και η κεφταζιδίμη (Πίνακες 6, 7). Τα αντιβιοτικά που επιλέχθηκαν ανήκουν στα ευρέως χρησιμοποιούμενα τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική πράξη. Επίσης η χρήση τους έναντι των εντεροβακτηριακών (ευρύτερη οικογένεια μέλη της οποίας αποτελούν τα ολικά κολοβακτηριοειδή) θεωρείται άκρως ενδεδειγμένη για το καλύτερο δυνατό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, μέσω της επιλογής των συγκεκριμένων αντιβιοτικών αντιπροσωπεύονται μερικές από τις κυριότερες κατηγορίες των αντιμικροβιακών ουσιών.

**Πίνακας 6:** Μηχανισμός δράσης αντιβιοτικών της μελέτης

Κατηγορία αντιβιοτικών	Αντιβιοτικό	Μηχανισμός δράσης
<b>Πενικιλίνες</b>	Αμπικιλίνη Αμοξυκιλλίνη- Κλαβουλανικό οξύ	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
<b>Κεφαλοσπορίνες</b>	<b>Β γενιάς</b> Κεφοξιτίνη <b>Γ γενιάς</b> Κεφοταξίμη Κεφταζιδίμη <b>Δ γενιάς</b> Κεφεπίμη	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
<b>Αμινογλυκοσίδες</b>	Αμικασίνη	Αναστολή της σύνθεσης των πρωτεϊνών
<b>Φθοριοκινολόνες</b>	Σιπροφλοξασίνη	Αναστολή σύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων

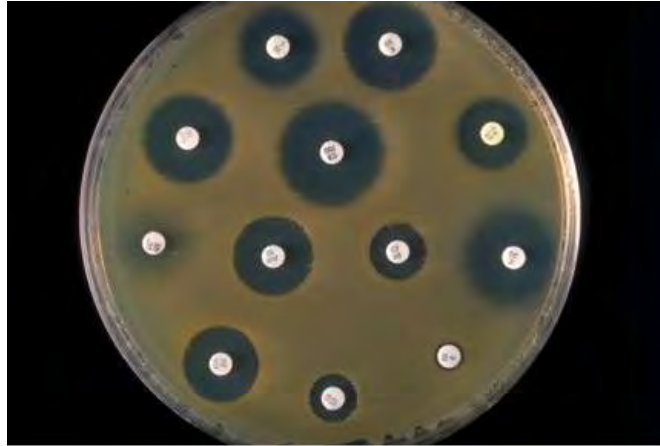
**Πίνακας 7:** Περιεκτικότητα δραστικής ουσίας αντιβιοτικού σε μg/δίσκο

<b>Αντιβιοτικό</b>	<b>Περιεκτικότητα δραστικής ουσίας σε μg/δίσκο</b>
<b>Αμοξυκιλλίνη/Κλαβουλανικό οξύ</b>	20/10
<b>Αμικασίνη</b>	30
<b>Αμπικιλίνη</b>	10
<b>Κεφεπίμη</b>	30
<b>Κεφοταξίμη</b>	30
<b>Κεφοξιτίνη</b>	30
<b>Κεφταζιδίμη</b>	30
<b>Σιπροφλοξασίνη</b>	5

### **Αρχή της μεθόδου**

Σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ κατά Kirby-Bauer, κατάλληλα εναιωρήματα μικροβίων τοποθετούνται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton και στη συνέχεια τοποθετούνται δίσκοι εμποτισμένοι με τα αντιβιοτικά που θέλουμε να μελετήσουμε.

Ουσιαστικά γίνεται διάχυση του αντιβιοτικού στο άγαρ από περιοχή μεγαλύτερης σε περιοχή μικρότερης πυκνότητας ώστε σε περίπτωση που αυτό είναι δραστικό να δημιουργηθεί ζώνη αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου (Εικόνες 10, 11)



**Εικόνα 10:** Μέθοδος διάχυσης δίσκων (Kirby-Bauer)



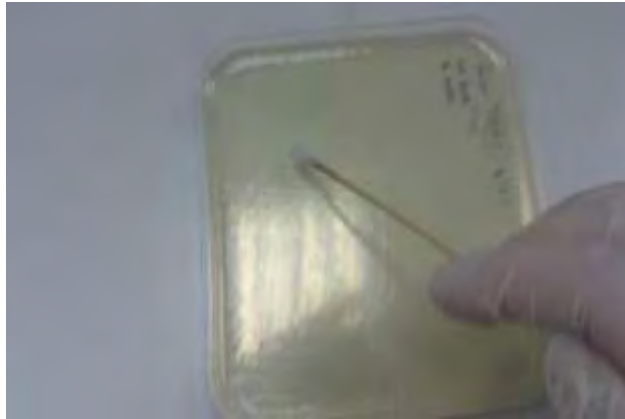
**Εικόνα 11:** Δράση(+) και μη (-) αντιβιοτικού

Με βάση τη ζώνη αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου αυτά κατατάσσονται σε:

- **Ευαίσθητα** ( Ίση ή μεγαλύτερη ζώνη αναστολής με αυτή του πρότυπου στέλεχους)
- **Ενδιάμεσα** (Μικρότερη κατά 2 mm σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος)
- **Ανθεκτικά**( Δεν υπάρχει ζώνη αναστολής ή είναι πολύ μικρή)

## Διαδικασία

- Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας ίσης με 0,5 McFarland (περίπου  $10^8$  κύτταρα/ml) από φρέσκια (24 ώρες) καλλιέργεια
- Ενοφθαλμισμός στο θρεπτικό υλικό (Εικόνα 12)
- Τοποθέτηση των δίσκων των αντιβιοτικών (Εικόνα 13)
- Επάωση στους  $35-37^{\circ}\text{C}$  για 16-18 ώρες
- Ανάγνωση των αποτελεσμάτων



**Εικόνα 12:** Επίστρωση τρυβλίου



**Εικόνα 13:** Τοποθέτηση δίσκων αντιβιοτικών

### Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη μέτρηση της διαμέτρου του κύκλου αναστολής που έχει σχηματιστεί γύρω από τον δίσκο του αντιβιοτικού. Η μέτρηση της διαμέτρου του κύκλου αναστολής μπορεί να γίνει είτε με παχύμετρο (Εικόνα 14) είτε με χάρακα (Εικόνα 15)



**Εικόνα 14** : Μέτρηση διαμέτρου κύκλου αναστολής (παχύμετρο)



**Εικόνα 15**: Μέτρηση διαμέτρου κύκλου αναστολής (χάρακας)



Στη συνέχεια αντιστοιχίζουμε τα αποτελέσματα με τους διεθνείς πίνακες με τα κρίσιμα όρια κατά EUKAST (Πίνακας 8) και αφού ελέγξουμε τους μηχανισμούς αντοχής ανα είδος μικροοργανισμού χαρακτηρίζουμε τα στελέχη μας ως ανθεκτικά ή ευαίσθητα.

**Πίνακας 8:** Κρίσιμα όρια για χαρακτηρισμό στελεχών κατά EUKAST

Αντιβιοτικό	Ευαίσθητο (S)	Ανθεκτικό (R)
<b>Αμπικιλλίνη (AM)</b>	$\geq 14\text{mm}$	$< 14\text{mm}$
<b>Αμοξυκιλλίνη-Κλαβουλανικό (AMC)</b>	$> 17\text{mm}$	$< 17\text{mm}$
<b>Αμικασίνη (AN)</b>	$> 16\text{mm}$	$< 13\text{mm}$
<b>Σιπροφλοξασίνη (CIP)</b>	$\geq 22\text{mm}$	$< 19\text{mm}$
<b>Κεφεπίμη (FEP)</b>	24mm	21mm
<b>Κεφοταξίμη (CTX)</b>	20mm	17mm
<b>Κεφοξιτίνη (FOX)</b>	19mm	19mm
<b>Κεφταζιδίμη (CAZ)</b>	22mm	19mm

### **Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου**

Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος διότι είναι απλή τεχνικά, φθηνή, δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό, δίνει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα και έχει καλή αναπαραγωγιμότητα και μεγάλη επαναληψιμότητα. Επίσης, πέρα από τη δυνατότητα επιλογής αντιβιοτικών αναδεικνύει και μηχανισμούς αντοχής ( π.χ ESBL)

Στους περιορισμούς αυτής είναι ότι πρέπει να τηρούνται αυστηρά οι οδηγίες εφαρμογής της.

### 3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS v.19 (SPSS Inc.,USA). Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή με την τυπική απόκλιση ή ως διάμεσος με το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Interquartile Range –IQR)(25o-75o) και οι ποιοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως απόλυτες συχνότητες με τα αντίστοιχα ποσοστά.

Για τη γραφική απεικόνιση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν ραβδογράμματα.

Το μη παραμετρικό Mann-Whitney test χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση σχέσεων μεταξύ ποιοτικών και ποσοτικών, μη κανονικά κατανομημένων, μεταβλητών. Το Χι-τετράγωνο τεστ (Chi-square test) ή η ακριβής δοκιμασία του Fisher (Fisher's exact test) χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ ποιοτικών μεταβλητών (παράγοντες) και ανθεκτικότητας στελεχών υπολογίζοντας τους σχετικούς κινδύνους (Relative risk - RR) με τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% ΔΕ)( Agresti *et al*, 2002)

Στις περιπτώσεις εκείνες που δεν μπορούσε να υπολογιστεί ο σχετικός κίνδυνος λόγω μηδενικών συχνοτήτων χρησιμοποιήθηκε η διόρθωση Haldane. Σύμφωνα με τη μέθοδο Haldane, προστίθεται 0,5 (1/2) σε κάθε κελί ενός πίνακα 2x2 συνάφειας (Haldane, 1956) Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Χι-τετράγωνο για τάση (Chi-square test for trend) για τη διερεύνηση γραμμικής σχέσης μεταξύ διατάξιμων μεταβλητών και ανθεκτικότητας.

Η ανθεκτικότητα στελεχών χρησιμοποιήθηκε ως εξαρτημένη μεταβλητή και ως πιθανοί παράγοντες (ανεξάρτητες μεταβλητές) χρησιμοποιήθηκαν τα χαρακτηριστικά των μονάδων εκτροφής.

Ένα αποτέλεσμα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό όταν η τιμή του p-value ήταν μικρότερη του 0,05.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

### 4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Α) Ανίχνευση και καταμέτρηση ολικών κολοβακτηριοειδών

Εξετάστηκαν 17 δείγματα συμβατικού και 17 δείγματα βιολογικού γάλακτος εκ των οποίων σε 14 δείγματα συμβατικού και 12 βιολογικού έγινε ανίχνευση και καταμέτρηση των ολικών κολοβακτηριοειδών. Με βάση το είδος του ζώου, από τα 17 δείγματα βιολογικού γάλακτος τα 10 ήταν αίγεια και τα 7 πρόβεια ενώ από τα 17 δείγματα συμβατικού γάλακτος τα 12 ήταν αίγεια και τα 5 πρόβεια.

Ο αριθμός των ολικών κολοβακτηριοειδών στα δείγματα βιολογικού γάλακτος κυμαινόταν από 25 cfu/ml ως  $1 \times 10^5$  ενώ στα δείγματα συμβατικού από 10 cfu/ml ως  $6.3 \times 10^5$  ( Πίνακας 9 και 10 αντίστοιχα.)

**Πίνακας 9:** Αριθμός κολοβακτηριοειδών στα δείγματα συμβατικού γάλακτος

	Κωδικός δείγματος	Είδος γάλακτος	Κολοβακτηριοειδή (Cfu/ml)
<b>1</b>	17	Συμβατικό	10
<b>2</b>	162	Συμβατικό	$2.3 \times 10^2$
<b>3</b>	24	Συμβατικό	$3.6 \times 10^2$
<b>4</b>	5	Συμβατικό	$4.2 \times 10^2$
<b>5</b>	27	Συμβατικό	$6.1 \times 10^2$
<b>6</b>	138	Συμβατικό	$1.8 \times 10^3$
<b>7</b>	13	Συμβατικό	$7.4 \times 10^3$
<b>8</b>	161	Συμβατικό	$1.2 \times 10^4$
<b>9</b>	155	Συμβατικό	$1.5 \times 10^4$
<b>10</b>	149	Συμβατικό	$2.3 \times 10^4$
<b>11</b>	130	Συμβατικό	$2.6 \times 10^4$
<b>12</b>	217	Συμβατικό	$2.8 \times 10^4$
<b>13</b>	3	Συμβατικό	$7.6 \times 10^4$
<b>14</b>	43	Συμβατικό	$6.3 \times 10^5$

**Πίνακας 10:** Αριθμός κολοβακτηριοειδών στα δείγματα βιολογικού γάλακτος

	Κωδικός δείγματος	Είδος γάλακτος	Κολοβακτηριοειδή (Cfu/ml)
1	15	Βιολογικό	25
2	45	Βιολογικό	55
3	233	Βιολογικό	$1 \times 10^2$
4	42	Βιολογικό	$2.3 \times 10^2$
5	44	Βιολογικό	$2.5 \times 10^2$
6	199	Βιολογικό	$6.2 \times 10^2$
7	136	Βιολογικό	$1 \times 10^3$
8	7	Βιολογικό	$3.7 \times 10^3$
9	9	Βιολογικό	$1.6 \times 10^4$
10	40	Βιολογικό	$2.2 \times 10^4$
11	66	Βιολογικό	$2.9 \times 10^4$
12	110	Βιολογικό	$1.1 \times 10^5$

Ο μέσος όρος για τα βιολογικά ήταν  $1.5 \times 10^4$  ενώ για τα συμβατικά  $5.8 \times 10^4$ . Η διάμεσος για το βιολογικό γάλα ήταν  $8.3 \times 10^2$  ενώ αντίστοιχα για το συμβατικό  $9.7 \times 10^3$ , ενώ μόλις το 25% των δειγμάτων στο βιολογικό είναι πάνω από και  $1.9 \times 10^4$  και  $2.6 \times 10^4$  στο συμβατικό (Πίνακας 11)

Συγκρίνοντας τον αριθμό ολικών κολοβακτηριοειδών σε συμβατικό και βιολογικό γάλα δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ( p-value=0,328)

**Πίνακας 11:** Αριθμός ολικών κολοβακτηριοειδών σε βιολογικό και συμβατικό γάλα

Είδος γάλακτος	Μέσος	Διάμεσος	25ο τεταρτημόριο	75ο τεταρτημόριο	p-value*
Βιολογικό	$1.5 \times 10^4$	$8,3 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$1,9 \times 10^4$	0,328
Συμβατικό	$5.8 \times 10^4$	$9,7 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$	$2,6 \times 10^4$	

\*Mann-Whitney test

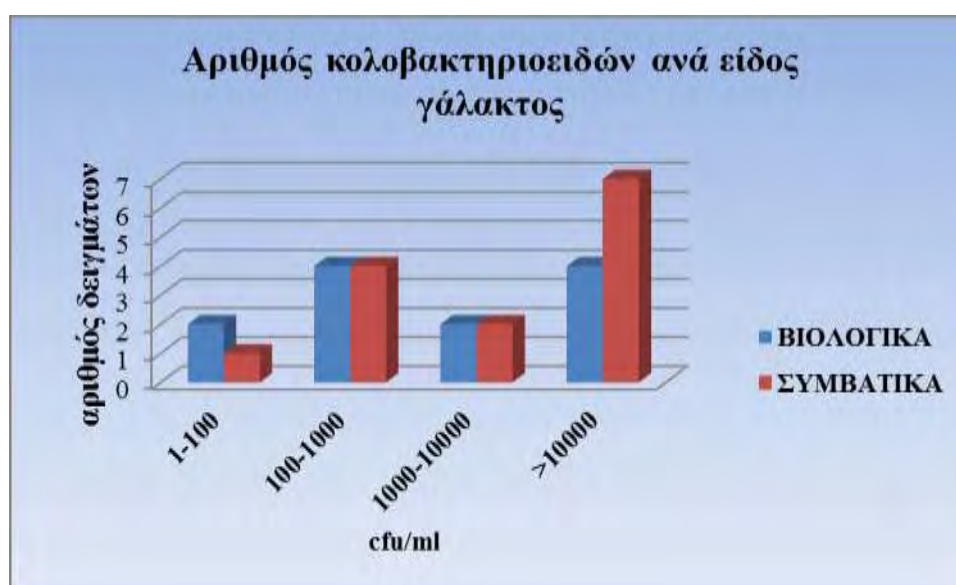
Ομοίως δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον αριθμό των ολικών κολοβακτηριοειδών και το είδος του ζώου, αίγιο και πρόβειο ( $p$ -value=0,330) (Πίνακας 12)

**Πίνακας 12:** Αριθμός ολικών κολοβακτηριοειδών με βάση το είδος ζώου

Είδος γάλακτος	Μέσος	Διάμεσος	25ο τεταρτημόριο	75ο τεταρτημόριο	p-value*
Αίγιο	$1.4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	$2,2 \times 10^4$	0,330
Πρόβειο	$1.2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$4,2 \times 10^2$	$7,6 \times 10^4$	
*Mann-Whitney test					

Συγκριτικά τα δείγματα του βιολογικού γάλακτος εμφανίζουν χαμηλότερο αριθμό ολικών κολοβακτηριοειδών σε σχέση με τα συμβατικά όπως προκύπτει από τους πίνακες 9 και 10.

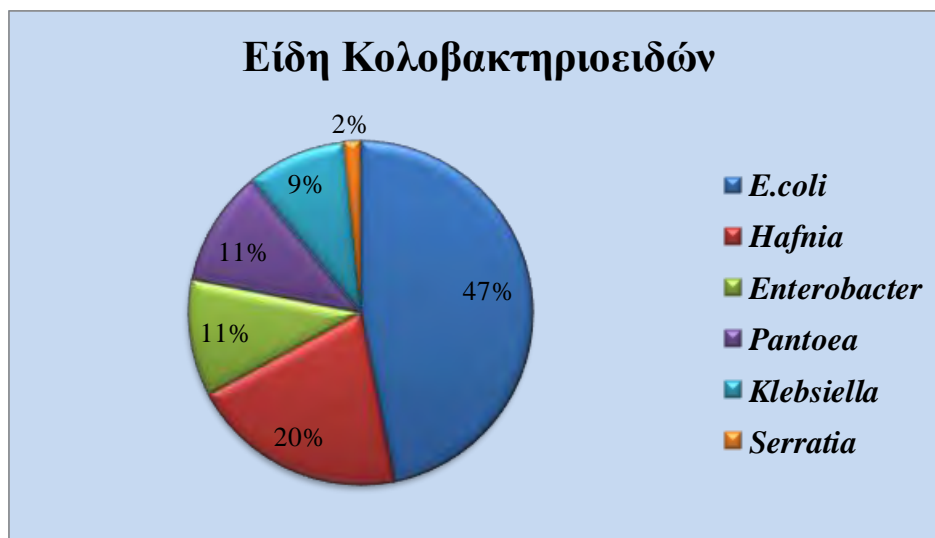
Με βάση τον αριθμό των κολοβακτηριοειδών και πως αυτός κατανέμεται τόσο στα δείγματα συμβατικού όσο και στα δείγματα βιολογικού γάλακτος συγκριτικά προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 1)



**Διάγραμμα 1:** Αριθμός των ολικών κολοβακτηριοειδών ανα είδος γάλακτος

## Β) Απομόνωση και ταυτοποίηση των στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών

Μετά την καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών, ακολούθησε η απομόνωση και ταυτοποίηση των στελεχών. Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 64 συνολικά στελέχη, 26 από βιολογικά και 38 από συμβατικά δείγματα γάλακτος. Το κυρίαρχο είδος ήταν η *E.coli* σε ποσοστό 47%, η *Hafnia alvei* (20%) και τα υπόλοιπα στελέχη ανήκαν στα γένη *Enterobacter spp* (11%), *Pantoea spp* (11%), *Klebsiella spp* (9%) *Serratia spp* (2%) (Διάγραμμα 2)



**Διάγραμμα 2:** Κατανομή των γενών των ολικών κολοβακτηριοειδών στο γάλα

Τα είδη των ολικών κολοβακτηριοειδών και η κατανομή τους σε συμβατικό και βιολογικό γάλα φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 13. Σε ότι αφορά τη σύγκριση σε βιολογικό και συμβατικό γάλα παρουσιάζεται διαφορά στη μικροβιολογική χλωρίδα. Στο βιολογικό γάλα κυριαρχεί η *E.coli* σε συντριπτική πλειοψηφία (80%) ενώ σε μικρό ποσοστό συναντούμε *Pantoea spp*, *Pantoea agglomerans*, *E.gergoniae*, *K.ozanae* (Διάγραμμα 3). Αντίθετα στο συμβατικό γάλα το κυρίαρχο είδος είναι η *Hafnia alvei* (34%) με δεύτερη την *E.coli* (26%) ακολουθεί η *K.oxytoca* (10%) και η μικροβιολογική

χλωρίδα του παρουσιάζεται πλουσιότερη και πολυπληθέστερη σε σχέση με το βιολογικό (Διαγράμματα 4 και 5)

**Πίνακας 13:** Ταξινόμηση των στελεχών κολοβακτηριοειδών που απομονώθηκαν

ΓΕΝΟΣ	ΕΙΔΟΣ	Βιολογικό γάλα	Συμβατικό γάλα	Συνολικός αριθμός στελεχών
<i>Escherichia spp</i>	<i>E. coli</i>	20	10	30
<i>Enterobacter spp</i>	<i>E. amnigenus</i>	0	1	1
	<i>E. cloacae</i>	1	1	2
	<i>E. gergoviae</i>	2	1	3
	<i>E. hormaechei</i>	0	1	1
<i>Hafnia spp</i>	<i>H. alvei</i>	0	13	13
<i>Klebsiella spp</i>	<i>K. oxytoca</i>	0	4	4
	<i>K. ozanae</i>	1	0	1
	<i>K. pneumoniae</i>	0	1	1
<i>Pantoea spp</i>	<i>Pantoea 3</i>	2	2	4
	<i>P. agglomerans</i>	1	1	2
<i>Serratia spp</i>	<i>S. rubidae</i>	0	1	1



**Διάγραμμα 3:** Είδη ολικών κολοβακτηριοειδών στο βιολογικό γάλα



**Διάγραμμα 4:** Είδη ολικών κολοβακτηριοειδών στο συμβατικό γάλα

### Γ) Διερεύνηση αντιβιοαντοχής των ολικών κολοβακτηριοειδών

Τα στελέχη των ολικών κολοβακτηριοειδών που απομονώσαμε τα εξετάσαμε ως προς την ευαισθησία τους σε οχτώ αντιμικροβιακούς παράγοντες. Συγκεκριμένα στην αμπικιλίνη (AM), στην αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ (AMC), αμικασίνη (AN), σιπροφλοξασίνη (CIP), κεφοξιτίνη (FOX), κεφεπίμη(FEP), κεφταζιδίμη(CAZ) και κεφοταξίμη (CTX).

Κατά την διερεύνηση της αντιβιοαντοχής ελήφθη υπόψη η ύπαρξη ενδογενούς αντοχής του κάθε στελέχους στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά. Στην περίπτωση ανίχνευσης ενδογενούς αντοχής το στέλεχος δεν χαρακτηρίστηκε ως ανθεκτικό.

Από τα 64 στελέχη που απομονώθηκαν 41 στελέχη παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, 18 σε βιολογικό και 23 σε συμβατικό γάλα (Πίνακας 14).

Παράλληλα 16 στελέχη παρουσίασαν ενδογενή αντοχή χαρακτηριστική του γένους τους (στα γένη *Enterobacter*, *Klebsiella*, καθώς και *Hafnia alvei* και *P.agglomerans*) και τέλος 6 στελέχη *E.coli* βρέθηκαν ανθεκτικά (επίκτητη αντοχή) στην αμπικιλίνη τα οποία ανιχνεύθηκαν σε βιολογικό γάλα και 1 στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* σε



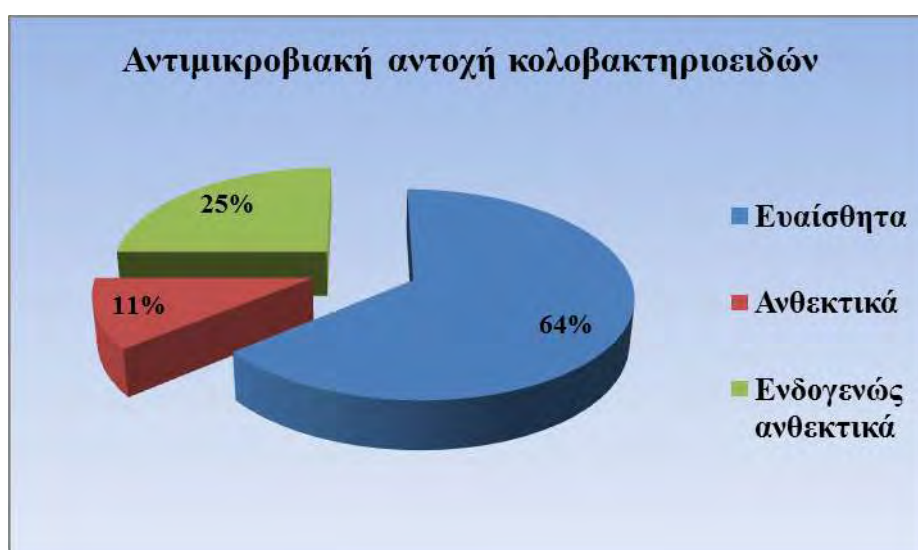
συμβατικό γάλα το οποίο εκτός από την ενδογενή αντοχή στην αμπικιλίνη (χαρακτηριστική του γένους ) παρουσίασε αντοχή στην αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό και στην κεφοξίτινη η οποία είναι επίκτητη.(Πίνακας 15)( Διάγραμμα 5)

**Πίνακας 14:** Αριθμός στελεχών που παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες

Αριθμός ευαίσθητων στελεχών		
ΕΙΔΟΣ ΜΟ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ
<i>E.amnigenus</i>	0	1
<i>E.cloacae</i>	0	1
<i>E.coli</i>	14	10
<i>H.alvei</i>	0	7
<i>K.oxytoca</i>	0	1
<i>Klebsiella ozanae</i>	1	0
<i>P.agglomerans</i>	1	0
<i>Pantoea spp</i>	2	2
<i>Serratia rubidae</i>	0	1
<b>Σύνολο</b>	<b>18</b>	<b>23</b>

**Πίνακας 15:** Στελέχη κολοβακτηριοειδών με ενδογενή και επίκτητη αντοχή

ΕΙΔΟΣ Μ.Ο	ΑΝΤΟΧΗ	ΕΙΔΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	ΕΙΔΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
<i>H.alvei</i> (6)	AM,AMC	Ενδογενής		Συμβατικό
<i>E.coli</i> (6)	AM	Επίκτητη	TEM-1	Βιολογικό
<i>P.agglomerans</i> (1)	AM,AMC,FOX	Ενδογενής		Συμβατικό
<i>P.agglomerans</i> (1)	FOX	Ενδογενής		Συμβατικό
<i>K.pneumoniae</i> (1)	AM	Ενδογενής		Συμβατικό
	AMC,FOX	Επίκτητη	Πλασμιδιακή AmpC β-λακταμάση Πλασμιδιακή AmpC κεφαλοσπορινάση	
<i>K.oxytoca</i> (3)	AM	Ενδογενής		Συμβατικό
<i>E.gergoviae</i> (3)	AM,AMC,FOX	Ενδογενής		Συμβατικό(1) Βιολογικό(2)
<i>E.hormaechei</i> (1)	AM,AMC,FOX	Ενδογενής		Συμβατικό
<i>E.cloacae</i> (1)	AM,AMC,FOX	Ενδογενής		Συμβατικό



**Διάγραμμα 5:** Αντιμικροβιακή αντοχή των στελεχών των κολοβακτηριοειδών

### A) Αντιμικροβιακή αντοχή της *Hafnia alvei*

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν 13 στελέχη του γένους *Hafnia spp* και ταυτοποιήθηκαν όλα ως *Hafnia alvei*. Όλα ανιχνεύθηκαν αποκλειστικά σε δείγματα συμβατικού γάλακτος. Έπειτα από τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής αντοχής τους έναντι τωνοχτώ (8) αντιμικροβιακών, 6 από τα 13 (46%) παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε 2 αντιμικροβιακούς παράγοντες, την αμπικιλίνη και την αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ. Ωστόσο η ανθεκτικότητα είναι ενδογενής, συνεπώς χαρακτηριστική του είδους και δεν αξιολογείται. Παράλληλα 7 από τα 13 στελέχη βρέθηκαν ευαίσθητα σε όλα τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά (54%)(Διάγραμμα 6)



Διάγραμμα 6: Αντιμικροβιακή αντοχή στελεχών της *Hafnia alvei*

### B) Αντιμικροβιακή αντοχή της *E.coli*

Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 30 στελέχη *E.coli*, 20 από δείγματα βιολογικού και 10 από δείγματα συμβατικού γάλακτος. Τα 10 στελέχη που απομονώθηκαν από το συμβατικό γάλα παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Αντίθετα από τα 20 στελέχη που ανιχνεύθηκαν στο βιολογικό γάλα, τα 6 παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη (30%) ενώ τα υπόλοιπα 14 (70%) ήταν ευαίσθητα σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Διάγραμμα 7)



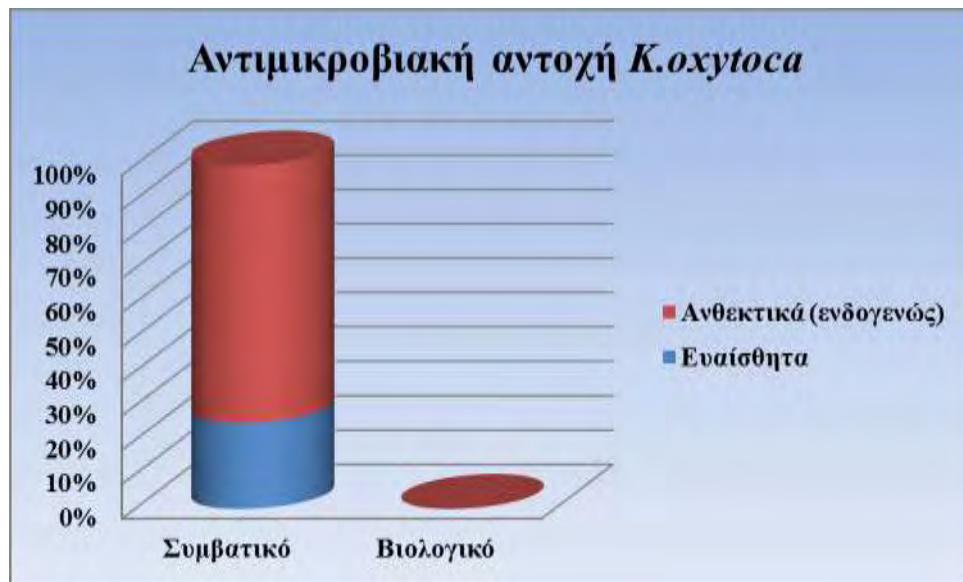
Διάγραμμα 7: Αντιμικροβιακή αντοχή στελεχών της *E.coli*

### Γ) Αντιμικροβιακή αντοχή της *Klebsiella spp*

Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 6 στελέχη συνολικά που ανήκαν στο γένος *Klebsiella spp* και ειδικότερα ένα στέλεχος *K.ozanae*, ένα στέλεχος *K.pneumoniae* και τέσσερα *K.oxytoca*. Η *K.ozanae* που ανιχνεύθηκε στο βιολογικό γάλα παρουσίασε ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Από τα τέσσερα στελέχη *K.oxytoca* που ανιχνεύθηκαν σε συμβατικό γάλα τα 3 στελέχη *K.oxytoca* εμφάνισαν την χαρακτηριστική του είδους αντοχή στην αμπικιλίνη ενώ το ένα παρουσίασε ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Τέλος η *K. pneumoniae* που ανιχνεύθηκε σε συμβατικό γάλα εμφάνισε ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, αμοξυλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και στην κεφοξιτίνη (Διαγράμματα 8, 9, 10)



Διάγραμμα 8: Αντιμικροβιακή αντοχή της *Klebsiella ozanae*



Διάγραμμα 9: Αντιμικροβιακή αντοχή της *Klebsiella oxytoca*



Διάγραμμα 10: Αντιμικροβιακή αντοχή της *Klebsiella pneumoniae*

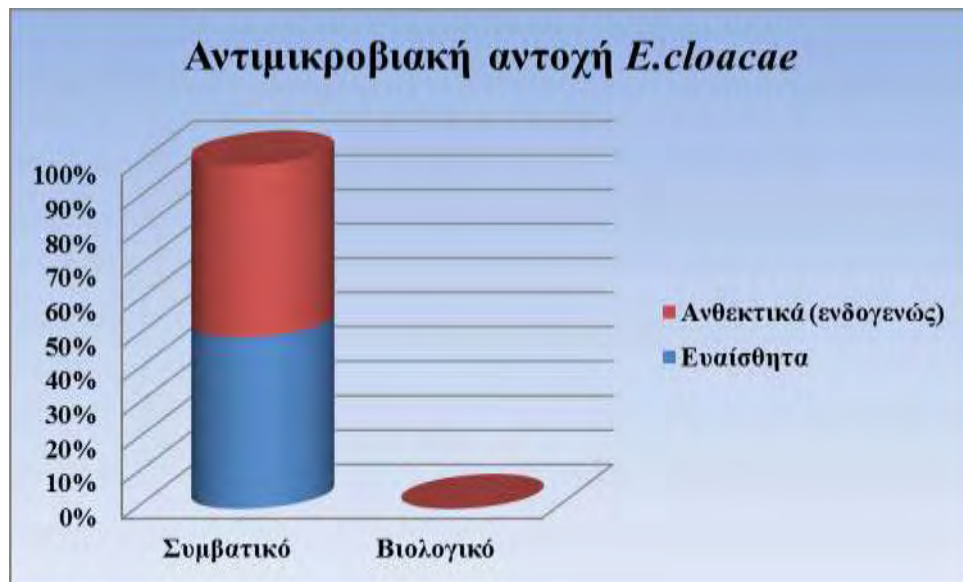
#### Δ) Αντιμικροβιακή αντοχή του *Enterobacter spp*

Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 7 στελέχη του γένους *Enterobacter spp* και πιο συγκεκριμένα 1 στέλεχος *Enterobacter amnigenus*, 2 στελέχη *Enterobacter cloacae*, 3 στελέχη *Enterobacter gergoniae* και ένα στέλεχος *Enterobacter hormaechei*. Σε βιολογικό γάλα ανιχνεύθηκαν 2 από τα 3 στελέχη *Enterobacter gergoniae* και τα υπόλοιπα σε συμβατικό. Έπειτα από τη διερεύνηση αντιβιοαντοχής τα 3 στελέχη *E.gergoniae*, το 1 στέλεχος *Enterobacter hormaechei* και το ένα από τα δύο στελέχη *Enterobacter cloacae* παρουσίασαν αντοχή στην αμικικιλίνη, αμοξυλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και στην κεφοξιτίνη. Ωστόσο πρόκειται για ενδογενή αντοχή η οποία είναι χαρακτηριστική του είδους οπότε τα στελέχη δεν θεωρούνται ανθεκτικά. Αντίθετα το δεύτερο στέλεχος *Enterobacter cloacae* και το στέλεχος *Enterobacter amnigenus* παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (διαγράμματα 11, 12, 13, 14)





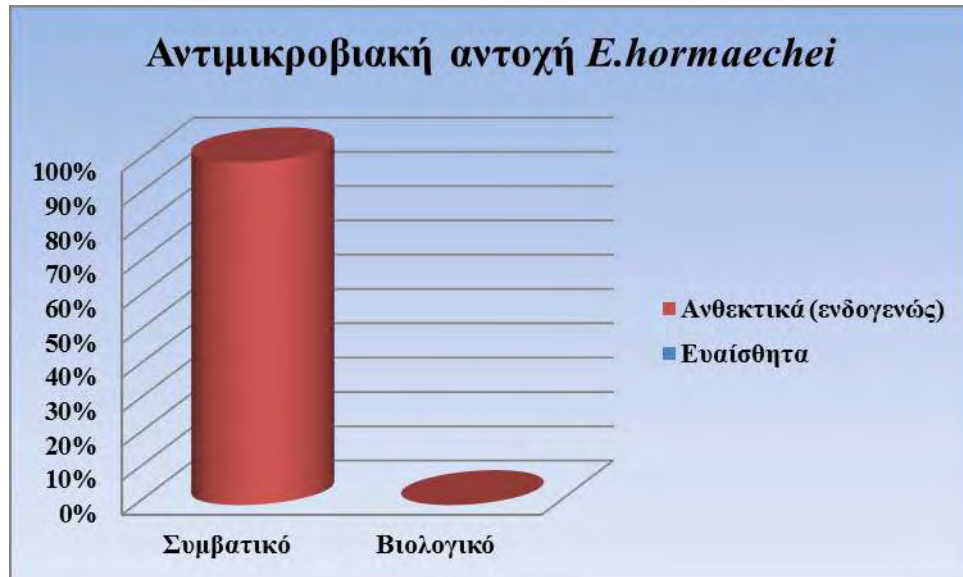
Διάγραμμα 11: Αντιμικροβιακή αντοχή του *Enterobacter amnigenus*



Διάγραμμα 12: Αντιμικροβιακή αντοχή του *Enterobacter cloacae*



Διάγραμμα 13: Αντιμικροβιακή αντοχή του *Enterobacter gergoniae*



Διάγραμμα 14: Αντιμικροβιακή αντοχή του *Enterobacter hormaechei*

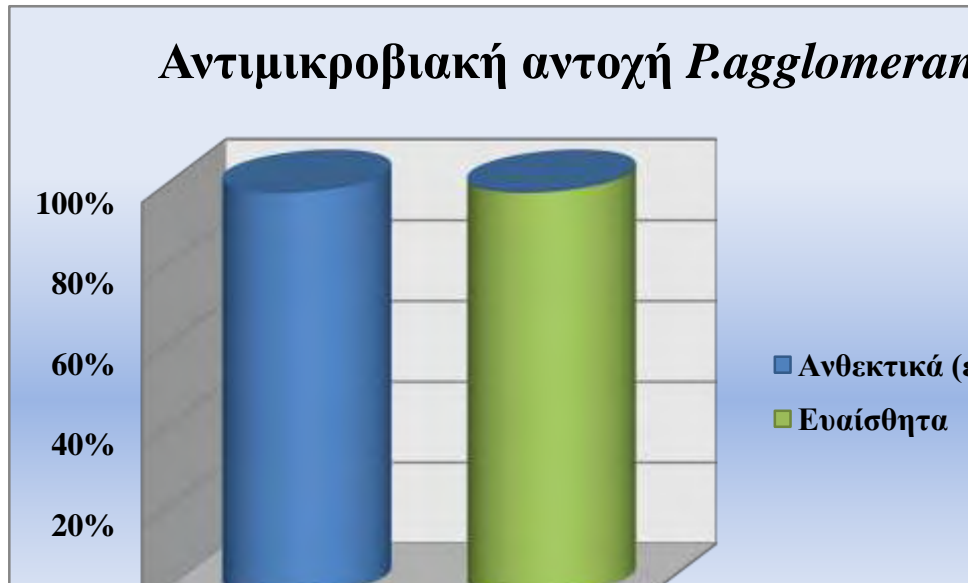


### Ε) Αντιμικροβιακή αντοχή της *Pantoea spp*

Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 4 στελέχη *Pantoea spp*, δύο σε συμβατικό και δύο σε βιολογικό γάλα και 3 στελέχη *Pantoea agglomerans* από τα οποία δύο βρέθηκαν σε συμβατικό και ένα σε βιολογικό γάλα. Τα 4 στελέχη *Pantoea spp* ( τα οποία με βάση το Αρι20Ε κατηγοριοποιήθηκαν ως *Pantoea spp 1* και *Pantoea spp 3* και δεν έγινε δυνατή με το εν λόγω σύστημα ταξινόμηση σε επίπεδο είδους) παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες ενώ από τα στελέχη της *Pantoea agglomerans* στο συμβατικό γάλα, το ένα βρέθηκε ανθεκτικό στην κεφοξιτίνη και το δεύτερο στην αμπικιλίνη, αμοξυλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και στην κεφοξιτίνη. Ωστόσο πρόκειται για ενδογενή αντοχή χαρακτηριστική του είδους και τα στελέχη δεν χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά. Το στέλεχος που βρέθηκε στο βιολογικό γάλα παρουσίασε ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Διαγράμματα 15 και 16)



Διάγραμμα 15: Αντιμικροβιακή αντοχή της *Pantoea spp*



Διάγραμμα 16: Αντιμικροβιακή αντοχή της *P.agglomerans*

#### ΣΤ) Αντιμικροβιακή αντοχή της *Serratia spp*

Απομονώθηκε ένα στέλεχος *Serratia rubidae* από συμβατικό γάλα το οποίο παρουσίασε ευαίσθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Διάγραμμα 17)



Διάγραμμα 17: Αντιμικροβιακή αντοχή της *Serratia rubidae*

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των ολικών κολοβακτηριοειδών, της απομόνωσης και ταυτοποίησης των στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών και της διερεύνησης της αντιμικροβιακής αντοχής τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

**Πίνακας 16:** Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων

	Κωδικός δειγματος	Τυπος	Cfu/ml	Στελέχη μικροοργανισμών	Ανθεκτικότητα	Είδος αντοχής
1	17	Συμβατικό	10	<i>E.coli</i>	S	
2	162	Συμβατικό	$2.3 \times 10^2$	<i>Hafnia alvei</i> (3)	S	
3	24	Συμβατικό	$3.6 \times 10^2$	<i>Hafnia alvei</i> (1) <i>Hafnia alvei</i> (1) <i>Klebsiella oxytoca</i> (2)	R σε AM, AMC S S R σε AM	Ενδογενής  Ενδογενής
4	5	Συμβατικό	$4.2 \times 10^2$	<i>E.coli</i> <i>Pantoea spp 3</i> <i>Pantoea spp 1</i>	S S S	
5	27	Συμβατικό	$6.1 \times 10^2$	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	R σε AM, AMC,FOX R σε AM, AMC,FOX	Ενδογενής  Ενδογενής <b>Επίκτητη</b>
6	138	Συμβατικό	$1.8 \times 10^3$	<i>Enterobacter hormaechei</i>	R σε AM, AMC,FOX	Ενδογενής
7	13	Συμβατικό	$7.4 \times 10^3$	<i>Enterobacter gergoviae</i> (1) <i>Hafnia alvei</i> (2)	R σε AM, AMC,FOX R σε AM, AMC	Ενδογενής Ενδογενής
8	161	Συμβατικό	$1.2 \times 10^4$	<i>Hafnia alvei</i> (3)	S	
9	155	Συμβατικό	$1.5 \times 10^4$	<i>E.coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Serratia rubidae</i>	S S S R σε FOX S	Ενδογενής
10	130	Συμβατικό	$2.6 \times 10^4$	<i>E.coli</i> (4)	S	
11	217	Συμβατικό	$2.8 \times 10^4$	<i>E.coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> (2)	S R σε AM, AMC,FOX S	Ενδογενής

12	3	Συμβατικό	$7.6 \times 10^4$	<i>Hafnia alvei</i> (3)	R σε AM, AMC	Ενδογενής
13	43	Συμβατικό	$6.3 \times 10^5$	<i>E.coli</i> (2)	S	
16	15	Βιολογικό	25	<i>Pantoea spp</i> 3(2)	S	
20	45	Βιολογικό	55	<i>E. coli</i> (3)	S	
24	233	Βιολογικό	$1 \times 10^2$	<i>E.coli</i>	S	
18	42	Βιολογικό	$2.3 \times 10^2$	<i>E.coli</i> (2) (1)	S R σε AM	<b>Επίκτητη</b>
19	44	Βιολογικό	$2.5 \times 10^2$	<i>E.coli</i> (2)	S	
23	199	Βιολογικό	$6.2 \times 10^2$	<i>E.coli</i> (3) <i>Klebsiella ozanae</i>	S S	
22	136	Βιολογικό	$1 \times 10^3$	<i>E.coli</i>	S	
14	7	Βιολογικό	$3.7 \times 10^3$	<i>E.coli</i>	S	
15	9	Βιολογικό	$1.6 \times 10^4$	<i>Enterobacter gergoviae</i> (2)	R σε AM, AMC, FOX	Ενδογενής
17	40	Βιολογικό	$2.2 \times 10^4$	<i>E.coli</i> (1) (5)	S R σε AM	<b>Επίκτητη</b>
21	110	Βιολογικό	$1.1 \times 10^5$	<i>Pantoea agglomerans</i>	S	

#### Δ) Παράγοντες εκτροφής που σχετίζονται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών

Μετά την επεξεργασία των ερωτηματολογίων και τη συσχέτιση των δεδομένων με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, προέκυψαν οι παρακάτω παράγοντες που αφορούν την εκτροφή και φαίνεται να σχετίζονται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών στο γάλα (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Παράγοντες εκτροφής που σχετίζονται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών

Παράγοντας εκτροφής		Ανθεκτικότητα στελεχών					
		Συχνότητα	%	RR	95% CI		P-value
Είδος εκτροφής	Βιολογική Συμβατική	6/26	23,1	8,77	1,12	68,63	<b>0,015**</b>
		1/38	2,6				
Είδος ζώου	Αίγα Πρόβατο	6/48	12,5	2,00	0,26	15,38	0,669**
		1/16	6,3				
Τρόπος άμελης	Με το χέρι Αλμεκτική μηχανή Αυτοματοποιημένο αρμεκτήριο	7/49	14,2				0,132***
		0/2	0				
		0/13	0				
Υγιεινή χώρα άμελης	Μέτρια Καλή Πολύ καλή	1/14	7,1				0,626***
		6/38	15,7				
		0/12	0				
Υγιεινή γαλακτοδοχείων	Μέτρια Καλή Πολύ καλή	1/23	4,3				0,536***
		5/11	45,4				
		1/14	7,1				
Υγιεινή παγολεκάνης	Μέτρια Καλή Πολύ καλή	0/8	0				0,720***
		1/15	6,7				
		1/22	4,5				
Υγιεινή μαστών	Μέτρια Καλή Πολύ καλή	5/13	38,5				<b>0,002***</b>
		2/42	4,8				
		0/8	0				
Καθαρισμός μαστών	Ναι Όχι	1/6	16,7	1,61	0,23	11,25	0,516**
		6/58	10,3				
Χρήση απορρυπαντικού	Μόνο ζεστό νερό Ζεστό νερό και κοινό απορρυπαντικό Ειδικό απορρυπαντικό	7/32	21,9				<b>0,013***</b>
		0/23	0				
		0/9	0				
Χρήση εγκεκριμένου απορρυπαντικού	Ναι Όχι	0/5	0	0,72****			1**
		6/57	10,5				
Διαχείριση γάλακτος	Παγολεκάνη Γαλακτοδοχεία Γαλακτοδοχεία και παγολεκάνες	0/26	0				0,435***
		6/18	33,3				
		1/20	5				
Διάρκεια παραμονής σε	0 2 24	1/2	50				<b>0,002***</b>
		6/21	28,6				
		0/15	0				

ώρες	36 48	0/4 0/21	0 0				
Έλεγχος γάλακτος	Ναι Όχι	6/40 1/24	15 4,2	3,60	0,46	28,12	0,241**
Μαστίτιδες	Ναι Όχι	7/48 0/16	14,6 0	5.96****			0,178**

\*Chi-square test

\*\*Fisher's exact test

\*\*\*Chi-square test for trend

\*\*\*\*Haldane's method correction

## 4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### A. Προσδιορισμός των ολικών κολοβακτηριοειδών

Ο αριθμός των ολικών κολοβακτηριοειδών τόσο στα δείγματα βιολογικού όσο και στα δείγματα συμβατικού κυμαίνεται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, με τον μέσο όρο για τα βιολογικά δείγματα να είναι  $1.5 \times 10^4$  και για τα συμβατικά  $5.8 \times 10^3$ . Αντίστοιχα η διάμεσος για το βιολογικό γάλα είναι  $8.3 \times 10^2$  ενώ για το συμβατικό  $9.7 \times 10^3$ , ενώ μόλις το 25% των δειγμάτων στο βιολογικό είναι πάνω από  $1.9 \times 10^4$  και  $2.6 \times 10^4$  στο συμβατικό. Οι τιμές που προέκυψαν είναι χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες παρόμοιων μελετών.

Συγκεκριμένα οι Morgan *et al.* (2003) σε συγκριτική μελέτη σε Γαλλία, Πορτογαλία και Ελλάδα για τα χαρακτηριστικά του νοπού αίγειου γάλακτος, αναφέρουν ότι οι αριθμοί των ολικών κολοβακτηριοειδών που βρέθηκαν ήταν  $1.8 \times 10^6$  cfu/ml για την Ελλάδα,  $2.5 \times 10^6$  cfu/ml για την Πορτογαλία ενώ για τη Γαλλία (με διαφορετικό βέβαια σύστημα εκτροφής) ήταν χαμηλότεροι  $1.4 \times 10^2$  cfu/ml.

Ομοίως οι Wasiksiri *et al.* σε μετρήσεις που έκαναν σε νωπό γάλα αιγών βρήκαν αριθμούς ολικών κολοβακτηριοειδών που κυμαίνονταν από  $1.3 \times 10^5$  έως  $1 \times 10^6$  cfu/ml, αρκετά υψηλότερους από τους αντίστοιχους στη δική μας μελέτη.

Ωστόσο πρέπει να συνεκτιμηθεί το γεγονός ότι τα δείγματά μας έχουν υποστεί την επίδραση της κατάψυξης ( $-80^{\circ}$ ). Σύμφωνα με τους Hubaakona και Rysanek (2007) η επίδραση της κατάψυξης στους μικροβιακό πληθυσμό των ολικών κολοβακτηριοειδών στους  $-20^{\circ}$  παρουσίασε σημαντική μείωση, ωστόσο η παραπάνω μελέτη αφορούσε αγελαδινό γάλα. Σύμφωνα με τους Sanchez *et al* (2003) που μελέτησαν την επίδραση της κατάψυξης σε αίγειο γάλα δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μείωση στο μικροβιακό φορτίο της *E. Coli* σε δείγματα γίδινου γάλακτος ύστερα από κατάψυξη στους  $-20^{\circ}$  C και ακόμα και ύστερα από 730 μέρες στην κατάψυξη στους  $-80^{\circ}$  C. Το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης των gram – βακτηρίων στο γίδινο γάλα σε σχέση με το αγελαδινό μπορεί να εξηγηθεί λόγω της διαφοράς στη σύσταση του γάλακτος καθώς τα συστατικά του αίγειου γάλακτος δρουν προστατευτικά έναντι των βακτηρίων. Σε ότι αφορά τον αριθμό των ολικών κολοβακτηριοειδών, στα δείγματα βιολογικού γάλακτος ο αριθμός των ολικών κολοβακτηριοειδών ήταν χαμηλότερος σε σχέση με τα συμβατικά όπως και σε αντίστοιχη μελέτη (Cicconi-Hogan *et al.* 2013) ωστόσο δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ομοίως δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο είδος γάλακτος (πρόβειο-αίγειο) και στον αριθμό των ολικών κολοβακτηριοειδών. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αντίστοιχες μελέτες (Haskell, 2009; Cicconi-Hogan *et al.* 2013)

## **B. Ταυτοποίηση στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών**

Σε ότι αφορά τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών παρατήθηκε διαφορά στη μικροβιολογική χλωρίδα. Στο βιολογικό γάλα κυριαρχεί η *E.coli* σε συντριπτική πλειοψηφία (80%) ενώ σε μικρό ποσοστό ακολουθούν οι *Pantoea spp*, *Pantoea agglomerans*, *E.gergoviae*, *K.ozanae*. Αντίθετα στο συμβατικό γάλα, το κυρίαρχο είδος είναι η *Hafnia alvei* (34%) με δεύτερη την *E.coli* (26%) και ακολουθεί η *K. oxytoca* (10%). Ομοίως οι Salman και Hamad (2011) και ο

Kagkli (2006) και οι Sana *et al* (2005) αναφέρουν ότι το κυρίαρχο είδος των κολοβακτηριοειδών που απομόνωσαν ήταν *E.coli*.

## Γ. Αντιμικροβιακή αντοχή των στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών

Κατά τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής αντοχής των στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών η πλειοψηφία αυτών 64% (41/64) παρουσίασε ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες 25% (16) στελέχη εμφάνισαν ενδογενή αντοχή χαρακτηριστική του είδους και 7/64 στελέχη από τα 64 εμφάνισαν επίκτητη αντοχή (εκ των οποίων 6 σε βιολογικό και 1 σε συμβατικό).

Σε ότι αφορά την παρουσία ανθεκτικών στελεχών και το είδος του γάλακτος βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση καθώς 6 από τα 7 στελέχη (86%) που εμφάνισαν επίκτητη αντοχή βρέθηκαν στο βιολογικό γάλα. Το εύρημα αυτό δεν συμφωνεί με τα αποτελέσματα αντίστοιχων ερευνών και συγκεκριμένα με τους Roesch *et al* (2006) όπου δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην αντιμικροβιακή αντοχή των στελεχών σε οργανικό και συμβατικό γάλα με εξαίρεση τον *Streptococcus uberis*.

Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία ανθεκτικών στελεχών και το είδος ζώου αίγαιο-προβειο.

### α) Αντιμικροβιακή αντοχή της *Hafnia alvei*

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν 13 στελέχη *Hafnia alvei* τα οποία ανιχνεύθηκαν μόνο σε δείγματα συμβατικού γάλακτος. Σε ότι αφορά την αντιμικροβιακή αντοχή τους, 6 από τα 13 (46%) παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και την αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τους Abbot και συν. (2011) σύμφωνα με τους οποίους το μεγαλύτερο ποσοστό αντοχής που παρατηρήθηκε σε στελέχη *Hafnia alvei* και *Hafnia paralvei* αφορούσε τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, συνδυασμούς β-λακταμικών και τις κεφαλοσπορίνες ενώ παρουσιάστηκε 100% ευαισθησία στην αμικασίνη,σιπροφλοξασίνη και κεφεπίμη ακριβώς όπως και στη δική



μας μελέτη. Ομοίως οι Roblas και συν. (2000) ανέφεραν στελέχη *Hafnia alvei* βρέθηκαν ευαίσθητα στην κεφοταξίμη, την κοτριμοξαζόλη και το ναλιδιχικό οξύ.

Παρόμοια ευρήματα αναφέρουν οι Stock και συν. (2005) καθώς οι Laurland και συν. (2006) οι οποίοι σε στελέχη *Hafnia alvei* που απομονώθηκαν από νοσοκομειακούς ασθενείς παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά αντοχής στην αμπικιλίνη σε ποσοστό 80% ενώ στην αμοξυκιλλίνη κλαβουλανικό σε ποσοστό 71%. Τέλος οι Falomir και συν. το 2010, οι οποίοι εξέτασαν εντεροβακτηριακά σε ωμά λαχανικά αναφέρουν ότι απομονώθηκαν δύο στελέχη *H. alvei* ανθεκτικά σε αμπικιλίνη και αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ. Στην πλειοψηφία των μελετών η αντοχή στα β-λακταμικά και στους συνδυασμούς β-λακταμικών θεωρήθηκε ενδογενής και χαρακτηριστική του είδους. Ωστόσο το γεγονός ότι 7 από τα 13 (54%) στελέχη *Hafnia alvei* παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε και σε άλλες μελέτες αλλά σε μικρότερα ποσοστά και αιτιολογήθηκε ως αποτέλεσμα της μειωμένης ή μη παραγωγής β-λακταμάσης τύπου AmpC (Laurland *et al.* 2006).

## β) Αντιμικροβιακή αντοχή της *E.coli*

Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 30 στελέχη *E.coli*, 20 από δείγματα βιολογικού και 10 από δείγματα συμβατικού γάλακτος. Τα 10 στελέχη που απομονώθηκαν από το συμβατικό γάλα παρουσίασαν ήταν ευαίσθητα σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Αντίθετα από τα 20 στελέχη που ανιχνεύθηκαν στο βιολογικό γάλα τα 6 παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη (30%) ενώ τα υπόλοιπα 14 (70%) ήταν ευαίσθητα σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Η *E.coli* παράγει χαμηλό ποσοστό β-λακταμασών επαγωγίμου τύπου AmpC που την καθιστά ευαίσθητη στην αμπικιλίνη και σε άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Ωστόσο η χρήση των αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση επίκτητων β-λακταμασών ευρέως φάσματος (TEM-1, TEM-2, SHV-1, OXA-1) που έχει ως αποτέλεσμα εμφάνιση αντοχής στην αμπικιλίνη, τικρακιλλίνη και πρώτης γενιάς κεφαλοσπορίνες (Susic, 2004)

### γ) Αντιμικροβιακή αντοχή της *Klebsiella spp*

Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 4 στελέχη *K. oxytoca*, ένα στέλεχος *K. pneumoniae* σε συμβατικό γάλα και ένα στέλεχος *K. ozanae* σε βιολογικό γάλα. Με εξαίρεση την *K. ozanae* και ένα στέλεχος *K. oxytoca* που παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες τα υπόλοιπα στελέχη εμφάνισαν την χαρακτηριστική του είδους αντοχή στην αμπικιλίνη ενώ η *K. pneumoniae* εμφάνισε επιπλέον αντοχή και στην αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό και κεφοξιτίνη.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το γένος *Klebsiella spp* παρουσιάζει ενδογενή αντοχή στην αμπικιλίνη (Forbes et al., 1998, Giguere et al., 2006) μέσω της παραγωγή β-λακταμασών. Ειδικότερα η *K. pneumoniae* παράγει μικρές ποσότητες SHV-1 β-λακταμασών και η *K. oxytoca* χρωμοσωματική K1 β-λακταμάση προσδίδοντας ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, τικρακιλλίνη. Ωστόσο είναι ευαίσθητες στους αναστολείς των β-λακταμασών. Στη δική μας μελέτη το στέλεχος *K. pneumoniae* εμφανίζει επίκτητη αντοχή στην αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό και κεφοξιτίνη μέσω της β-λακταμάσης πλασμιδιακού τύπου AmpC και κεφαλοσπορινάσης πλασμιδιακού τύπου AmpC.

### δ) Αντιμικροβιακή αντοχή του *Enterobacter spp*

Απομονώθηκαν 7 στελέχη του γένους *Enterobacter spp* (1 στέλεχος *Enterobacter amnigenus*, 2 στελέχη *Enterobacter cloacae*, 3 στελέχη *Enterobacter gergoviae* και ένα στέλεχος *Enterobacter hormaechei*). Από αυτά τα 2 από τα 3 στελέχη *Enterobacter gergoviae* βρέθηκαν σε βιολογικό γάλα ενώ όλα τα υπόλοιπα σε συμβατικό. Σε ότι αφορά την αντοχή αυτών, τα 3 στελέχη *E. gergoviae*, το 1 στέλεχος *Enterobacter hormaechei* και το ένα από τα δύο στελέχη *Enterobacter cloacae* βρέθηκαν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, αμοξυλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και στην κεφοξιτίνη. Αντίθετα το δεύτερο στέλεχος *Enterobacter cloacae* και το στέλεχος *Enterobacter amnigenus* παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Leclercq *et al*, 2013) τα στελέχη του γένους *Enterobacterspp.* παρουσιάζουν ενδογενή αντοχή στην αμπικιλίνη,αμοξυλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και στην κεφοξιτίνη και στις κεφαλοσπορίνες α΄ γενιάς λόγω παραγωγής χρωμοσωμικών επαγωγίμων AmpC β-λακταμασών που δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών.

Το γεγονός ότι έχουμε 2 στελέχη (ένα στέλεχος *Enterobacter cloacae* και ένα *Enterobacter amnigenus*) τα οποία δεν παρουσιάζουν την χαρακτηριστική του είδους ενδογενή αντοχή, μπορεί να οφείλεται σε απώλεια της επαγωγιμότητας της χρωμοσωμιακής AmpC β-λακταμάσης λόγω μετάλλαξης ή σε μη έκφραση αυτής (BSAC, 2003).

#### ε) Αντιμικροβιακή αντοχή της *Pantoea spp*

Απομονώθηκαν 4 στελέχη *Pantoea spp*, δύο σε συμβατικό και δύο σε βιολογικό γάλα και 3 στελέχη *Pantoea agglomerans* από τα οποία δύο βρέθηκαν σε συμβατικό και ένα σε βιολογικό γάλα. Τα 4 στελέχη *Pantoea spp* παρουσίασαν ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες ενώ από τα στελέχη της *Pantoea agglomerans* στο συμβατικό γάλα, το ένα βρέθηκε ανθεκτικό στην κεφοξιτίνη και το δεύτερο στην αμπικιλίνη, αμοξυλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και στην κεφοξιτίνη.

Σε ότι αφορά την *Pantoea agglomerans* εμφανίζει ενδογενή αντοχή στην αμπικιλίνη, αμοξυλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και στην κεφοξιτίνη (Leclercq *et al*, 2013), που είναι χαρακτηριστική του είδους και τα στελέχη δεν χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά. Το στέλεχος που βρέθηκε στο βιολογικό γάλα παρουσίασε ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

#### στ) Αντιμικροβιακή αντοχή της *Serratia spp*

Απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ένα στέλεχος *Serratia rubidae* σε συμβατικό γάλα το οποίο παρουσίασε ευαισθησία σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα στελέχη του γένους *Serratia spp.* εμφανίζουν ενδογενή αντοχή στην αμπικιλίνη, αμοξυλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και στην κεφοξιτίνη και στις κεφαλοσπορίνες α' γενιάς λόγω παραγωγής χρωμοσωμικών επαγωγίμων AmpC β-λακταμασών που δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών (Suzic, 2004).

Ωστόσο συγκεκριμένα για τα στελέχη του είδους *Serratia rubidae* υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν διαφορετικά αποτελέσματα. Ειδικότερα οι Ursua και συν.(1996) αναφέρουν ότι απομόνωσαν στέλεχος από ανοσοκατασταλμένο ασθενή, το οποίο παρουσίασε ευαισθησία σε αμπικιλίνη, αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ, αμικασίνη, τομπραμυκίνη, οφλοξασίνη και ανθεκτικότητα σε κεφουροξίμη και κεφταζολίνη. Παρόμοια συμπεράσματα αναφέρουν και οι Stock και συν.(2003) οι οποίοι σε μελέτη τους κατά την οποία απομόνωσαν μεγάλο αριθμό (104) στελεχών του γένους *Serratia spp* αναφέρονται στα στελέχη της *Serratia rubidae* ως "φυσικά" ευαίσθητα στην αμοξυκιλλίνη, αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και τρικακιλλίνη και ανθεκτικά σε στενού φάσματος κεφαλοσπορίνες όπως η κεφαζολίνη και κεφουροξίμη.

#### **Δ. Παράγοντες εκτροφής που σχετίζονται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών**

Όπως προκύπτει, η παρουσία ανθεκτικών στελεχών φαίνεται να σχετίζεται με το είδος του γάλακτος. Συγκεκριμένα στο βιολογικό γάλα έχουμε μεγαλύτερο κίνδυνο να συναντήσουμε ανθεκτικά στελέχη κολοβακτηριοειδών σε σχέση με το συμβατικό και το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ( $p\text{-value}=0.015$ ).

Επίσης, η υγιεινή των μαστών του αρμεγόμενου ζώου φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών κολοβακτηριοειδών στο γάλα. Συγκεκριμένα σε γάλα που προέρχεται από ζώα των οποίων η υγιεινή των μαστών έχει χαρακτηριστεί ως μέτρια βρέθηκαν περισσότερα ανθεκτικά στελέχη σε σχέση με αυτά των οποίων η υγιεινή χαρακτηρίστηκε ως καλή και τέλος κανένα ανθεκτικό στέλεχος δεν βρέθηκε σε γάλα ζώων με πολύ καλή υγιεινή μαστών. Το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ( $p\text{-value}=0.002$ ).

Ομοίως ο τρόπος καθαρισμού φαίνεται να συσχετίζεται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών στο γάλα, καθώς η χρήση μόνο ζεστού νερού χωρίς ειδικού ή έστω κοινού

απορρυπαντικού αυξάνει τον κίνδυνο επιβίωσης και ανεύρεσης ανθεκτικών στελεχών στο γάλα και το αποτέλεσμα αυτό επίσης είναι στατιστικά σημαντικό ( $p\text{-value}=0,013$ )

Μία επιπλέον παράμετρος η οποία σχετίζεται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών κολοβακτηριοειδών στο γάλα είναι η διάρκεια παραμονής του γάλακτος (μετρούμενη σε ώρες) στους χώρους προσωρινής αποθήκευσής του-παγολεκάνες ή γαλακτοδοχεία-αμέσως μετά την άμελξη και πριν τη διάθεσή του. Η διάρκεια παραμονής του γάλακτος στις εξεταζόμενες εκτροφές κυμαινόταν από 0, 2, 24, 36 και 48 ώρες και ο μεγαλύτερος αριθμός ανθεκτικών στελεχών παρουσιάστηκε όταν η παραμονή του γάλακτος ήταν 2 ώρες. Η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ( $p\text{-value}=0,002$ ). Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του αριθμού ανθεκτικών στελεχών και του χώρου της προσωρινής αποθήκευσης του γάλακτος (παγολεκάνη ή γαλακτοδοχείο) ( $p\text{-value}=0,435$ ) ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών που παρατηρήθηκε στις 2 ώρες ήταν σε γάλα αποθηκευμένο σε γαλακτοδοχεία.

Άλλοι παράγοντες που εξετάστηκαν χωρίς όμως να προκύψει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ήταν το είδος του γάλακτος (γίδινο-πρόβειο), ο τρόπος άμελξης, η υγιεινή του χώρου άμελξης καθώς και το είδος των χώρων προσωρινής αποθήκευσης του γάλακτος (γαλακτοδοχεία, παγολεκάνες), η ύπαρξη μαστίτιδας και ο καθαρισμός των μαστών πριν την άμελξη.

Κοινός παρονομαστής των περισσότερων παραγόντων που εξετάστηκαν είναι οι συνθήκες υγιεινής καθώς η παρουσία στελεχών των ολικών κολοβακτηριοειδών-ανθεκτικών και μη-αποτελεί δείκτη υγιεινής τόσο των χώρων της εκτροφής όσο της παραγωγικής διαδικασίας.

### 4.3 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Τα δείγματα γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν από νωπό κατεψυγμένο γάλα. Τα δείγματα προτού χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη μας βρισκόταν σε βαθιά κατάψυξη ( $-80^{\circ}\text{C}$ ).

Αρκετές μελέτες αναφέρουν σημαντική μείωση στους αριθμούς στελεχών *E. coli* σε δείγματα τα οποία καταψύχθηκαν (Stopper *et al.* 1982; Pankey *et al.* 1987; Schukken *et al.* 1989). Ο μεγαλύτερος ρυθμός θανάτωσης των κυττάρων παρατηρήθηκε κατά τις 10 πρώτες μέρες της παραμονής στην κατάψυξη (Restaino *et al.* 2001). Ωστόσο σε αντίθεση με το αγελαδινό, στο οποίο αναφέρονται οι παραπάνω μελέτες, δεν έχει παρατηρηθεί κάποια σημαντική μείωση στο μικροβιακό φορτίο της *E. Coli* σε δείγματα γίδινου γάλακτος ύστερα από κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και ακόμα και ύστερα από 730 μέρες στην κατάψυξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης των gram – βακτηρίων στο αίγιο γάλα σε σχέση με το αγελαδινό μπορεί να εξηγηθεί λόγω της διαφοράς στη σύσταση του γάλακτος καθώς τα συστατικά του αίγιου γάλακτος δρουν προστατευτικά έναντι των βακτηρίων (Sanchez *et al.* 2003).

#### 4.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Ο αριθμός των ολικών κολοβακτηριοειδών στο γάλα δεν φαίνεται να εξαρτάται από τον τύπο της εκτροφής (βιολογική ή συμβατική) ούτε από το είδος του ζώου (πρόβειο-αίγιο)
- Το είδος του γάλακτος φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία ανθεκτικών (στην αμπικιλίνη) στελεχών καθώς στο βιολογικό γάλα βρέθηκαν περισσότερα ανθεκτικά στελέχη σε σχέση με το συμβατικό
- Η συντριπτική πλειοψηφία των ανθεκτικών στελεχών ήταν *E.coli* με επίκτητη αντοχή μόνο στην αμπικιλίνη, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό και όχι σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών
- Η υγιεινή των μαστών και ο τρόπος καθαρισμού σχετίζεται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών κολοβακτηριοειδών, αφού τα τελευταία είναι δείκτες υγιεινής και η παρουσία τους σχετίζεται με τους παραπάνω παράγοντες

- Η διάρκεια της παραμονής σε δεξαμενές νωπού γάλακτος φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών στο γάλα
- Η αντιβιοαντοχή των απομονωθέντων στελεχών όπου παρατηρήθηκε ήταν στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ενδογενής και χαρακτηριστική του είδους. Δεν παρατηρήθηκε κάποια ασυνήθιστη ή σπάνια αντιβιοαντοχή στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά.

#### **4.5 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ**

Με βάση τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να εστιάσουν στους παράγοντες εκτροφής που φαίνεται ότι σχετίζονται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών κολοβακτηριοειδών στο γάλα. Παράλληλα, θα μπορούσε να γίνει περαιτέρω διερεύνηση των στελεχών των κολοβακτηριοειδών με μοριακές τεχνικές και τέλος θα μπορούσε να συνδυαστεί και με διερεύνηση ύπαρξης καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων καθώς απαγορεύεται ρητά η χρησιμοποίησή τους στις βιολογικές εκτροφές.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ελληνική Βιβλιογραφία

**Αρσένη Α.** (1994) Enterobacteriaceae. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων. Τέταρτη έκδοση. Αθήνα, Ιατρικές εκδόσεις Ζήτα Τόμος Ι. σ.233-276.

**Βρυώνη Γ., Παγκάλη Α.,** (2009) Ταυτοποίηση βακτηρίων: Συμβατικές και αυτοματοποιημένες μέθοδοι. Μετεκπαιδευτικά μαθήματα Ε.Μ.Ε – 2009-2011

**Ζωϊόπουλος Π. και Παπαθεοδώρου Α.,** (2000) Βιολογική κτηνοτροφία. Εκδόσεις Αγροτύπος, Αθήνα

**ICAP ΑΕ.** Κλαδική μελέτη για τις βιολογικές καλλιέργειες και τα βιολογικά προϊόντα. 2005. Σελ.53-55

**Καλιάνη Κ.** (2007) «Ερευνα των προτιμήσεων των καταναλωτών ως προς το Βιολογικό γάλα». Μεταπτυχιακή Διατριβή. Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, Ειδίκευση Αειφορικής Γεωργικής Ανάπτυξης. Γεωπονική Σχολή Α.Π.Θ

**Κράσσοι Δ., Σκούφος Ι., Βόιδαρου Χ., Αναστασίου Ι., Τσόλκας Φ., Τζώρα Α., Μάργαρης Ν.** (2005) Η βιολογική κτηνοτροφία και το προφίλ των κτηνοτρόφων βιολογικών εκτροφών. 2<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο Βιολογικής Κτηνοτροφίας « Βιολογική κτηνοτροφία και Βιώσιμη Ανάπτυξη της Υπαίθρου » Αγρίνιο, 28-29 Μαΐου, 2005

**Φώτου Κ., Τζώρα Α., Βόιδαρου Χ., Αναστασίου Ι., Μαυροφίδης Α., Αυγέρης Ι., Μέγα Α., Μπεζιρτζόγλου Ε.** (2003). «Μελέτη της μικροχλωρίδας νοπού πρόβειου γάλακτος και συσχετίσή της με την υγιεινή και την ποιότητά του». Εργαστήριο Μικροβιολογίας-Παρασιτολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων των Ζώων, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, Άρτα

**Χατζηδημητρίου Μ.** (2006). Διερεύνηση Μηχανισμών Αντοχής εντεροβακτηριακών στην τριμεθοπρίμη .Διδακτορική διατριβή.Εργαστήριο Μικροβιολογίας Π.Γ.Ν.Θ ΑΧΕΠΑ. Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ



## Νομοθεσία

**Κανονισμός της Επιτροπής αριθ. 1804/1999 της Επιτροπής** καθορίζει τις απαιτήσεις για τη βιολογική ζωική παραγωγή και για πρώτη φορά θεσπίζει κοινούς κανόνες για τη βιολογική κτηνοτροφία.

**Κανονισμός του Συμβουλίου (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91** περί του βιολογικού τρόπου παραγωγής γεωργικών προϊόντων και των σχετικών ενδείξεων στα γεωργικά προϊόντα και στα είδη διατροφής. (L198)

**Κανονισμός της Επιτροπής (ΕΚ) αριθ. 882/2004** σχετικά με τους επίσημους ελέγχους τροφίμων και ζωοτροφών προκειμένου να επαληθευτεί η τήρηση του νόμου περί τροφίμων και ζωοτροφών και τους κανονισμούς για την υγεία και την καλή μεταχείριση των ζώων.

**Κανονισμός του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 834/2007** για τη βιολογική παραγωγή, την επισήμανση βιολογικών προϊόντων και την κατάργηση του Κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91.(L189)

**Κανονισμός της Επιτροπής (ΕΚ) αριθ. 404/2008** τροποποιεί το Παράρτημα II του Κανονισμού του Συμβουλίου (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91 περί βιολογικής παραγωγής αγροτικών προϊόντων με την έγκριση των ουσιών pinosad, όξινο ανθρακικό κάλιο και οκτανικό χαλκό καθώς και της χρήσης αιθυλενίου. (L120)

**Κανονισμός της Επιτροπής (ΕΚ) αριθ. 889/2008** διατυπώνει λεπτομερείς κανόνες εφαρμογής εφαρμογής του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 834/2007 ( L250)

## Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

**Abbott , S. L. , Moler, S., Green, N. , Tran ,R. K., Wainwright K., and Janda J. M.** (2011) “*Clinical and Laboratory Diagnostic Characteristics and Cytotoxigenic Potential of Hafnia alvei and Hafnia paralvei Strains*”. **Journal of Clinical Microbiology** **49** (9):3122-3126

**Aarestrup, F. M, Wegener, H. C. and Collignon P. (2008).** “*Resistance in Bacteria of the food chain epidemiology and control strategies*”. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, **6**(5), 733-750.

**Agresti, A. (2002).***Categorical Data Analysis*, 2nd ed.; John Wiley and Sons Inc.: Hoboken, N. J, USA,

**Bailey & Scott.** Enterobacteriaceae. In : Betty A.Forbes, Daniel F.Sahn, Alice S.Welssfeld. (ed.) *Diagnostic Microbiology 11<sup>th</sup> edition by Mosby Inc, Missouri 2002* p.365-377

**Baron S. (1996).** Medical Microbiolgy- 4th edition – Galveston (TX). University of Texas Medical Branch at Galveston.

**Boor, K. J., Brown D. P., Murphy S. C., Bandler D. K. (1998).** “ *Microbial and chemical quality of raw milk in New York State*” **Journal of Dairy Science**, **81**: 1743-1748

**Bouza E., Cercenado E. (2002)** “*Klebsiella and enterobacter: antibiotic resistance and treatment implications*” **Semin Respir Infect**;17: 215-30

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2004).** Foodborne Disease Active Surveillance Network (FoodNet): Population Survey Atlas of Exposures, 2002. Bethesda, MD, , p. 205

**Cicconi-Hogan K. M., Gamroth M., Richert R., Ruegg P. L., Stiglbauer K. E, Schukken Y.H. (2013).** “*Risk factors associated with bulk tank standard plate count, bulk tank coliform count, and the presence of Staphylococcus aureus on organic and conventional dairy farms in the United States*” **Journal of Dairy Science**, **96** :1–13

**EL-Zubeir I. E. M., Ahmed M. I.** (2007). *The hygienic quality of raw milk produced by some dairy farms in Khartoum-Sudan*. **Journal of Microbiology, 2: 988-991.**

**Falomir M. P., Gozalbo D. and Rico H.** (2010). Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. In Mendez Vilas A, ed. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* Badajoz, Formatex Research Center.:1175-1181

**FAO** (2008) Milk hygiene in milking, milk production hygiene and udder health. FAO Animal Production and Health Papers-78. FAO Corporate Document Repository. (CDR), pp. 1-7.

**Farmer, J. J.** (2003) Enterobacteriaceae. Introduction and Identification. In Murray P.R, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC. (ed.) *Manual of clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> edition 2003 ASM Press, Washington D.C.

**Forbes B. A., Sahm DF, Weissfeld AS.** 1998. *Bailey And Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th edn. Mosby Inc., St. Louis Missouri, USA.

**Foschino R., Invernizzi A., Barucco R., Stradiotto K.** (2002) *Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year.* **Journal of Dairy Research, 69(2), 213-25.**

**Giguère S.** 2006. Antimicrobial Drug Action and Interaction: An Introduction. Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine 4th edn, S Giguère, JF Prescott, JD Baggot, RD Walker and PM Dowling, eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA.

**Giguere S, Prescott J.F, Baggot J.D, Walker R. D, Dowling P.M.** (2006). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine - 4th Edition.* Page 31

**Girlich, D., Naas, T., Bellais, S, Poirel. L, Karim, A, Nordmann., P** (2000). “*Heterogeneity of AmpC cephalosporinases of Hafnia alvei clinical isolates expressing inducible or constitutive ceftazidime resistance phenotype*”s. **Antimicrobial Agents Chemotherapy, 44:3220-3223.**

**Gunthard, H., Pennekamp, A.** (1996). “*Clinical significance of extraintestinal Hafnia alvei isolates from 61 patients and review of the literature*”. **Clinical Infectious Diseases, 22:1040-1045**

**Haldane, J.B.** *The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies.* **Ann. Intern. Med.** 1956, **20**, 309–311.

**Hubáňková M., Rysánek D.** (2007). “*Effects of Freezing Milk Samples on the Recovery of Alimentary Pathogens and Indicator Microorganisms*”. **Acta Vet. Brno**, **76**: 301-307.

**ISO** (2006) ISO 4832:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs -Horizontal method for the enumeration of coliforms -Colony-count technique. International Organization for Standardization, Geneva

**Karns, J. S., Van Kessel, J. S., McClusky, B. J.,** (2007). “*Incidence of Escherichia coli O157:H7 and E. coli virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction*”. **Journal of Dairy Science**, **90**:3212–3219.

**Kagkli, D.M.M, Vancanneyt P., Vandamme C.H., Cogan T.M.** (2006). “*Contamination of milk enterococci and coliforms from bovine faeces*”. **Journal of Applied Microbiology**, 1364-507.

**Laupland, K. B., Church, D. L., Ross, T., Pitout, J. D. D.** (2006). “*Population-based laboratory surveillance of Hafnia alvei isolates in a large Canadian health region*”. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, **5**:12 /1476-0711-5-12

**Leclercq, R., Canton, R. D., Brown, F. J., Giske, C. G., Heisig, P., MacGowan, A. P., Mouton, J. W. Nordmann, P., Rodloff A. C., Rossolini, G. M.,Soussy C. J., Steinbakk M., Winstanley T. G. and Kahlmeter G.** (2013) “*EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing*”.**Clinical Microbiology and Infection Volume 19, Issue 2, pages 141–160, February 2013**

**Liu, Z., Kanter, C. A., Messer, K. D. and Kaiser, H. M.** (2013). “*Identifying significant characteristics of organic milk consumers: a CART analysis of an artefactual field experiment*”. **Applied Economics**, **45**(21), 3110-3121

**MacFaddin, J. F.** 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria.* 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

**Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM and Tauze R.** (1999) *Food-Related Illness and Death in the United States.* **Emerging Infectious Diseases**, **5**(5), 607-625.

**Murphy SC, Boor K. J.** (2003). “*Basic dairy Bacteriology. Microbiological quality defects in fluid milk products: The evaluation of shelf life*”. **Cornell University, Ithaca, NY.**

**Morgan, F., Massouras, T., Barbosa, M., Roseiro, L., Ravasco, F., Kandarakis, I., Bonnin, V., Fistakoris, M., Anifantakis, E., Jaubert, G., Raynal-Ljutovac K.** (2003) “*Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France*”. **Small Ruminant Research, Volume 47, Issue 1, Pages 39–49**

**Nadjar D, Rouveau M, Verdet C, Donay L, Herrmann J, Lagrange PH, Philippon A, Arlet, G.** (2000) “*Outbreak of Klebsiella pneumoniae producing transferable AmpC-type beta-lactamase (ACC-1) originating from Hafnia alvei*”. **FEMS Microbiology Letters, 187:35-40.**

**Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S.C., Murinda S.E** (2009) “*Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk*”. **Foodborne Pathogens and disease Volume 6, Number 7, 2009**

**Pankey, J. W., Wadsworth, J. K., Metha, K. H., Murdough P.A.** (1987). “*Effects of storage on viability of mastitis pathogens*”. **Journal of Dairy Science, 70 (Suppl. 1): 132**

**Ramos, A., Damaso, D.** (2000). “*Extraintestinal infection due to Hafnia alvei*”. **European Journal of Clinical Microbiol Infectious Diseases, 19:708-710.**

**Restaino, L., Frampton, E.W., Spitz, H.** (2001). “*Repair and growth of heat- and freeze-injured Escherichia coli O157:H7 in selective enrichment broths*”. **Food Microbiology, 18, 617-629**

**Roblas, F., Cabria, R. F., Esteban J., Lopez, J. C., Gadea, I. and Soriano F.** (2000). “*In vitro activity of gemifloxacin (SB-265805) compared with 14 other antimicrobials against intestinal pathogens*”. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 46, 1023–1027**

**Salman, A.M.A and Hamad I. M.** (2011). “*Enumeration and identification of Coliform bacteria from raw milk in Khartoum State, Sudan*”. **Journal of Cell and Animal Biology Vol. 5(7), pp. 121-128**

**Sana, O., Yagoub, N., Awadalla, E., Ibtism, E. M. E. (2005).** “*Incidence of some potential pathogens in raw milk in Khartoum North- Sudan-and their susceptibility to antimicrobial agents*”. **Journal of Animal Veterinary Advances, 4(3), 341- 344.**

**Sanchez, A., Contreras, A., Jimenez, J., Luengo, C., Corralesm, J.C, Fernandez, C. (2003).** “*Effect of freezing goat milk samples on recovery of intramammary bacterial pathogens*”. **Veterinary Microbiology, 94, 71-77**

**Schukken, Y. H., Smit, J., A. H., Groommers, F. J., Vandegeer, D., Brand, A.(1989):** “*Effect of freezing on bacteriologic culturing on mastitis milk samples*”. **Journal of Dairy Science, 72, 1900-1906**

**Shojaei, Z. A, Yadollahi, A. (2008).** “*Physiochemical and Microbiological Quality of raw milk, Pasteurized and UHT milks in Shops*”. **Asian Journal of Science Res., 1(5): 532-538**

**Stopper, M., Ziv, G., Saran, A. (1982).** “*Effect of storing milk samples at -18 °C on the viability of certain udder pathogens*”. **Refuah veterinarith, 39: 1-2**

**Stege, H., Bage, F., Jacobsen, E. and Thougard, A. (2003).** “*VETSTAT – the Danish system for surveillance of the veterinary use of drugs for production animals*”. **Preventive Veterinary Medicine, 57, 103-115.**

**Stock, I., Motiur, Rahmanb., Sherwood, K. J., Wiedemann, B. (2005).** “*Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical identification of Escherichia albertii and Hafnia alvei strains*”. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Volume 51, Issue 3, Pages 151–163**

**Stock, I., Burak, S., Sherwood, K. J., Grüger, T. and Wiedemann, B. (2003).** “*Natural antimicrobial susceptibilities of strains of ‘unusual’ Serratia species: S. ficaria, S.fonticola, S. odorifera, S. plymuthica and S.rubidaea*”. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51, 865–885**

**Suzic, E. (2004).** “*Mechanisms of resistance in Enterobacteriaceae towards beta-lactamase antibiotics*”. **Acta medical Croatica, 58 (4), 307-12.**

**Tsiplakou, E., Kotrotsios, V., Hadjigeorgiou, I., Zervas, G. (2010).** “*Differences in sheep and goats milk fatty acid profile between conventional and organic farming systems*”. **Journal of Dairy Research Volume 77, Issue 03 August 2010, pp 343-349**

**Ursua, P. R., Unzaga, M. J., Melero, P., Iturburo, I., Ezpeleta, C., Cisterna, R. (1996).** “*Serratia rubidaea as an invasive pathogen*”. **Journal of Clinical Microbiology Jan 1996; 34(1), 216–217.**

**Wasiksiri, S., Chethanond, U., Pongprayoon, S., Srimai, S. Nasaee, B. (2010).** “*Quality aspects of raw goat milk in Lower Southern Thailand*”. **Songklanakarin Journal of Science and Technology 32 (2), 109-113, 2010**

**World Health Organization Study Group. (2002).** “*Future trends in veterinary public health*”. **World Health Organization Technical Report Series 907:1-85.**

**Zadoks, R. N., Gillespie, B. E., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Oliver, P., Schukken, Y. (2007).** “*Comparison of the etiology of environmental mastitis in two herds of Dairy cows*”. **Slovak Journal of Animal Science, 40(3), 132-140.**

## Ηλεκτρονικές πηγές

### **Antimicrobial Resistance in Foodborne Pathogens**

Διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <http://amrls.cvm.msu.edu/veterinary-public-health-module>

Ημερομηνία ανάκτησης 5-5-2014

### **BSAC. The British Society for Antimicrobial Chemotherapy (2003) Publications on BSAC Methods of Antimicrobial Susceptibility Testing**

Διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/FAQ.pdf>

Ημερομηνία ανάκτησης 31-6-2014

### **Biomerieux clinical diagnostics.**

Διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <http://www.Biomerieux.com>

Ημερομηνία ανάκτησης 17-7-2012

### **GAO (2004) Antibiotic resistance: Federal agencies need to better focus efforts to address risk to humans from antibiotic use in animals. Report to US GAO: Report to congressional**

Διαθέσιμο στη σελίδα <http://www.gao.gov/new.items/d04490.pdf>

Ημερομηνία ανάκτησης 15-7-2012

### **FDA (2005) . FDA News: FDA announces final decision about veterinary medicine.**

Διαθέσιμο στη σελίδα <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2005/new01212.html>

Ημερομηνία ανάκτησης 23-3-2012

### **IFOAM (2009). Ο νέος Ευρωπαϊκός Κανονισμός για τη βιολογική παραγωγή και τα βιολογικά προϊόντα. Ερμηνεία και αξιολόγηση του νέου κανονισμού και επιπτώσεις σε συγκεκριμένους τομείς του κλάδου.**

Διαθέσιμο στη σελίδα <http://www.ifoam-eu.org>

Ημερομηνία ανάκτησης 27-5-2013

### **ΚΕΕΛΠΝΟ (2012) Εθνικό Σχέδιο Δράσης για την Αντιμετώπιση της Μικροβιακής Αντοχής στα Αντιβιοτικά και των Λοιμώξεων σε Χώρους Παροχής Υπηρεσιών Υγείας 2008 – 2012 . Διαθέσιμο στη σελίδα <http://www.keelpno.gr/>**

Ημερομηνία ανάκτησης 16-3-2013



**Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2013) Ανάπτυξη τομέα Βιολογικής  
Αιγοπροβατοτροφίας. Διαθέσιμο στη σελίδα <http://www.minagric.gr>  
Ημερομηνία ανάκτησης 2-2-2014**