

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΝΤΟΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

1. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ
2. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ :**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗΣ ΤΗΣ E. COLI ΠΟΥ  
ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ ΑΠΟ ΖΩΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΤΕΣ  
ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΜΗΝΑΣ**

**ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ Κ. ΜΑΓΔΑ**

**ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ Α.Π.Θ.**

**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

## ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Αναστάσιος Μηνάς, Dr. Κτηνίατρος, Καθηγητής ΤΕΙ Λάρισας.

Κρικέλης Βασίλειος, Dr. Κτηνίατρος, Καθηγητής ΤΕΙ Λάρισας.

Χατζοπούλου-Μπούρτζη Ελευθερία, Dr. Κτηνίατρος, Καθηγήτρια Κτηνιατρικής  
Σχολής Αριστοτελείου Παν/μίου Θεσσαλονίκης

## Ένα μεγάλο ευχαριστώ

- Στους επιβλέποντες Καθηγητές μου για το ενδιαφέρον τους και τις καίριες υποδείξεις τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας
- Στους συναδέλφους μου: κ. Θώμο Γιώργο, Κτηνίατρο της Ν.Α. Φθιώτιδας, κ. Μέρκο Ιωάννη, Κτηνίατρο της Ν.Α. Πιερίας, κ. Σάββα Ανδρέα, Δ/ντή Κτηνιατρικής Ν.Α. Φωκίδας, κ. Νίττη Κυριάκο, Κτηνίατρο της Ν.Α. Φωκίδας για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την μεγάλη βοήθεια τους κατά την διάρκεια συλλογής των δειγμάτων.
- Στην κ. Κόκκαλη Σταματία, Ιατρό-Επιδημιολόγο για την βοήθεια της .
- Σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Π.Θ. για την άριστη συνεργασία μας.
- Στην κ. Αρτοποιού Μαρία, Καθηγήτρια Κτηνιατρικής Α.Π.Θ, για την αμέριστη αγάπη της και τις σοφές συμβουλές της.
- Στην φίλη και συνάδελφο κ. Γεωργιάδου Μαρία, Προϊσταμένη του Γενικού Χημείου του Κράτους, για τις «λύσεις» της, και την αμέριστη ηθική συμπαράσταση της.
- Στον Καθηγητή κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, για την κατανόηση του.
- Στην οικογένεια μου, για την στήριξη της.

Αφιερώνεται στους γονείς μου,

Κωνσταντίνο και Ελευθερία

για την αείρμη

αγάπη τους !

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ.....	3
1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ .....	4
1.2.1. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ .....	4
1.2.2. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ .....	5
1.2.3. ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DNA.....	5
1.3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	8
1.3.1. ΓΕΝΙΚΑ .....	8
1.3.2. ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ-ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΤΟΧΗ .....	8
1.3.3. ΤΥΧΑΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΠΡΟΫΠΑΡΧΟΝΤΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ.....	9
1.3.4. ΟΡΙΖΟΝΤΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΞΩΓΕΝΟΥΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	10
1.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	16
1.4.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ .....	16
1.4.2. ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ .....	17
1.4.3. ΙΝΤΕΓΚΡΟΝΙΑ .....	19
1.4.5. ORF (OPEN READING FRAME) .....	20
1.5. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ.....	21
2. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ.....	23
2.1. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ .....	25
2.1.1. ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	25
2.1.2. ΜΕΤΑΦΥΛΑΞΗ.....	27
2.1.3. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ – ΠΡΟΛΗΨΗ .....	27
2.1.4. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	28
2.2. ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ.....	30
2.2.1. ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΧΟΙΡΟΥΣ .....	30
2.2.2. ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΠΤΗΝΑ.....	32
2.3. ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ.....	33
2.4. ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ .....	35
2.5. ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	38
2.5.1. ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ(CHLORAMPHENICOL) .....	38
2.5.2. ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ .....	40
2.5.3. ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ (Framycetin ή neomycin B).....	42
2.5.4. ΓΕΝΤΑΜΙΚΙΝΗ (GENTAMICIN) .....	44
2.5.5. ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ .....	46
2.6. ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ .....	48
2.6.1. ΚΑΝΟΝΕΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	48
2.6.2. ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ .....	50
2.6.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ .....	50
3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	52
3.1. ΓΕΝΙΚΑ .....	52
3.1.1. ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ .....	53

3.1.2. ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ .....	53
3.1.3. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	55
3.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	56
3.2.1. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ .....	56
3.2.2. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ.....	59
3.2.3. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ .....	62
3.2.4. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ	64
3.2.5. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ .....	67
3.2.6. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ, ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ ΚΑΙ ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΙΝΕΣ (ΜΛΣ) .....	70
3.2.7. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ .....	72
4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΗΣ «ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ» ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ .....	74
4.1. ΓΕΝΙΚΑ .....	74
4.2. ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΘΕΤΟΥΝ ΣΕ ΚΙΝΔΥΝΟ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ .....	76
4.2.1. Escherichia coli .....	76
4.2.2. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) .....	79
4.2.3. Campylobacter sp. ....	81
4.2.4. Salmonella .....	84
5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	89
5.1. ΜΕΘΟΔΟΣ KIRBY-BAUER ή ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑ .....	89
5.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ή MIC.....	91
5.3. ΕΤΟΙΜΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ .....	92
5.3.1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑ ΧΕΙΡΟΣ: E-Test (AB Biodisk) .....	93
5.3.2. ΗΜΙΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ .....	93
5.4. ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ .....	94
5.4.1. Phoenix σύστημα (BD Diagnostics Systems) .....	95
1. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ .....	98
1.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ .....	98
1.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ .....	102
1.2.1. Δημιουργία εναιωρήματος των κοπράνων.....	102
1.2.2. Ενοφθαλμισμός σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα.....	102
1.2.3. Ανακαλλιέργεια αποικιών σε Nutrient agar (NA).....	104
1.3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ.....	104
1.3.1. Δοκιμή οξειδάσης .....	104
1.3.2. Δοκιμή ινδόλης.....	105
1.3.3. API 20E-TEST .....	107
1.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ E. coli ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ .....	110
1.4.3. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ...	115
1.5. ΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑΣ.....	115
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	120
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	133
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	148
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	170

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 - Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ζωνοσογόνα παθογόνα βακτήρια (μηχανισμός Α) και σε κοινά βακτήρια που προέρχονται από τα ζώα (μηχανισμός Β) (Tollefson et. al., 2006)	75
Εικόνα 2 – E. coli σε MacConkey Agar .....	103
Εικόνα 3 – Ανακαλλιέργεια σε Nutrient Agar .....	104
Εικόνα 4 - Μετά την επώαση και πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου Kovac's. ....	106
Εικόνα 5 - Μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου Kovac's. Στα ινδόλη (+) σχηματισμός ροζ δακτυλίου στην επιφάνεια .....	106
Εικόνα 6 - Ινδόλη (+) και Ινδόλη (-) .....	107
Εικόνα 7 - Ινδόλη(+), δεξιά και Ινδόλη (-), αριστερά.....	107
Εικόνα 8 - API 20E- test.....	110
Εικόνα 9 - API 20E -test.....	111

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα βακτηρίων που μολύνουν τον άνθρωπο και προέρχονται από τα ζώα, είναι ένα πολύπλοκο θέμα με σοβαρές επιπτώσεις τόσο στην υγεία των ζώων, όσο και των ανθρώπων. Σε γενικές γραμμές τα προβλήματα που προκύπτουν για τη Δημόσια Υγεία από τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων στα ζώα είναι τα εξής:

- α) η επιλογή ανθεκτικών βακτηρίων ,
- β) η μετάδοση ανθεκτικών κλώνων βακτηρίων, κινητών γενετικών στοιχείων και γονιδίων από τα ζώα στον άνθρωπο, και
- γ) λοιμώξεις του ανθρώπου που δεν ανταποκρίνονται στη συνηθισμένη αγωγή με αντιμικροβιακά φάρμακα (Aarestrup, 2006).

Βακτήρια ζωικής προέλευσης ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα μπορούν να μολύνουν τους ανθρώπους με διάφορους τρόπους όπως, άμεση επαφή με τα ζώα (κτηνοτρόφοι, κτηνίατροι, εκδοροσφαγείς), επαφή με μολυσμένα με βακτήρια υλικά πχ σάλιο, κόπρανα, ή τέλος με την πρόσληψη μολυσμένων τροφίμων, νερού ή ακόμα και μέσω μολυσμένου αέρα (Scwarz et al., 2001). Η μόλυνση του ανθρώπου με βακτήρια ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα μέσω της τροφικής αλυσίδας, δηλαδή από την πρόσληψη ζωϊκών προϊόντων (κρέας, γάλα, αυγά) από τα παραγωγικά ζώα, έχει μελετηθεί περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη. Αυτό έχει αποδειχθεί κυρίως για κάποια ζωονοσογόνα βακτήρια (zoonotic organisms) όπως *Salmonella* και *Campylobacter* spp.

Από την άλλη πλευρά για κοινά βακτήρια όπως *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. δεν υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις, απλώς πιθανόν τα βακτήρια αυτά να λειτουργούν σαν δεξαμενές ανθεκτικών γονιδίων τα οποία μπορούν να μεταφερθούν στα βακτήρια της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου από τα παραγωγικά ζώα.

Ωστόσο, δεν πρέπει να αγνοηθεί η πρόσληψη ανθεκτικών βακτηρίων τόσο από τους ανθρώπους, όσο και από τα ζώα από κοινές πηγές όπως είναι το νερό τα φυτά και τα άγρια ζώα (κυρίως τρωκτικά και πτηνά ιδίως σπουργίτια). Τα άγρια ζώα μπορούν να αποκτήσουν τα

ανθεκτικά στελέχη από το περιβάλλον, στη συνέχεια να τα μεταφέρουν και μέσω των εκκρίσεών τους να μολύνουν την τροφή των παραγωγικών ζώων. Έτσι εντερόκοκκοι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη (Vancomycin-Resistant *Enterococci*-VRE) έχουν βρεθεί σε άγρια τρωκτικά και κατοικίδια ζώα.

Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι αντιμικροβιακά φάρμακα κυρίως τετρακυκλίνες και αμινογλυκοσίδες χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό για την πρόληψη βακτηριακών νοσημάτων στα φυτά, (Vidaver, 2002), ενώ η βανκομυκίνη χρησιμοποιείται στη μηχανική γενετική των φυτών, προς το παρόν όμως δεν έχει μελετηθεί η πιθανότητα συμβολής των φυτών στη μόλυνση του ανθρώπου με ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα στελέχη βακτηρίων.

Η μόλυνση του νερού και γενικότερα του περιβάλλοντος από ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα βακτήρια γίνεται τόσο από τα απόβλητα των εκτροφών των ζώων, όσο και από τα οικιακά απόβλητα ή τα απόβλητα των νοσοκομείων. Αυτή η μόλυνση μπορεί να επεκταθεί και στα λαχανικά όταν τα παραπάνω απόβλητα ζώων ή ανθρώπων χρησιμοποιούνται ως λίπασμα για τα χωράφια με αποτέλεσμα να αποτελεί πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο. Απόδειξη των παραπάνω αποτελεί η απομόνωση στελέχους *E. coli* με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά σε λαχανικά που πωλούνταν σε αγορές του Λονδίνου, κατά τη διάρκεια επιδημιολογικής διερεύνησης μιας μαζικής τροφολοίμωξης από *E.coli* O15.

Η συμβολή της ύπαρξης στο υδάτινο περιβάλλον αντιμικροβιακών φαρμάκων και βακτηρίων ανθεκτικών σε αυτά, στη διάδοση της ανθεκτικότητας, είναι αντικείμενο μελέτης αλλά και διαφωνιών μεταξύ των επιστημόνων (Segura et al., 2009).

Σημαντικό ρόλο επίσης στη μεταφορά ανθεκτικών βακτηρίων μεταξύ των ζώων, εκτός βέβαια από την εκτεταμένη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων, είναι η μεταφορά ζώων-φορέων μεταξύ διαφορετικών εκτροφών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών κρατών, η συγκέντρωση μεγάλου αριθμού ζώων σε περιορισμένους και κλειστούς χώρους, και η ύπαρξη μολυσμένων ζωοτροφών.

Σε μια προσπάθεια να μελετηθεί το φαινόμενο της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιμικροβιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο και να εκτιμηθεί η συμβολή των ζώων στο φαινόμενο αυτό, καταρτίστηκε το 2000 από τους Bywater και Casewell ένα

ερωτηματολόγιο που απευθυνόταν σε ιατρούς κλινικούς μικροβιολόγους από την Ευρώπη και τις Η.Π.Α. Το ερωτηματολόγιο αφορούσε 20 παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο.

Μέσα στα 20 αυτά βακτήρια υπήρχαν και κάποια που μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο, όπως *non-typhoid Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *E.coli O157: H7*, *Enterococcus spp.*, *VRE*.

Η στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η συνολική συμβολή των ζώων στην ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα των βακτηρίων που απειλούν τη Δημόσια Υγεία ήταν μικρότερη του 4% (Bywater, 2004). Όπως αναμενόταν το ποσοστό αυτό αφορούσε κυρίως τα ζωνοσογόνα βακτήρια που μεταδίδονταν στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα συμβάλλει στην ανάπτυξη ανθεκτικών ζωνοσογόνων βακτηρίων, τα οποία μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο με δυσμενείς επιπτώσεις.

Δεδομένου ότι η επιδημιολογία της ανθεκτικότητας είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και παρόλο που η συμβολή των ζώων στο πρόβλημα της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιμικροβιακά φάρμακα που απασχολούν τη Δημόσια Υγεία είναι μικρή, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν οι ενδεδειγμένες διορθωτικές κινήσεις για να περιορισθεί η αύξηση της εμφάνισης καθώς και η μετάδοση των ανθεκτικών μικροοργανισμών πριν να είναι αργά. Μια από τις βασικότερες διορθωτικές κινήσεις είναι, η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα να γίνεται σύμφωνα με τους Κανόνες της Ορθής Κτηνιατρικής Πρακτικής.

## 1.1. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ

Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες που καταστρέφουν τα βακτήρια χωρίς να βλάπτουν το μεγαλοοργανισμό ξενιστή. Είναι φυσικές ουσίες, που παράγονται συνήθως από μύκητες, στρεπτομύκητες ή άλλους μικροοργανισμούς. Σπανιότερα είναι συνθετικές ουσίες.

Όλα τα αντιβιοτικά δεν είναι δραστικά έναντι όλων των ειδών μικροοργανισμών, δηλαδή κάποια μικροβιακά είδη έχουν ενδογενή ή ιδιοσυστασιακή αντοχή σε κάποιες ομάδες

αντιβιοτικών. Η **εγγενής** αυτή αντοχή είναι γνωστή και προκαθορισμένη.

Τα μικροβιακά είδη, στα οποία το αντιβιοτικό (ή η ομάδα των αντιβιοτικών) είναι δραστικά αποτελούν το αντιμικροβιακό φάσμα αυτού. Η αντοχή που εμφανίζουν ορισμένα μικροβιακά στελέχη έναντι αντιβιοτικών του φάσματός τους καλείται **επίκτητη**. Έτσι, π.χ., η αντοχή στην αμπικιλίνη που εμφανίζουν κάποια στελέχη (isolates) *E. coli*, είναι επίκτητη, αφορά δηλαδή μόνο στα συγκεκριμένα στελέχη, δεν είναι εγγενής ιδιότητα του είδους *E. coli*, ενώ συνδέεται με αλλαγές στα βακτηριακά κύτταρα των στελεχών αυτών, όπως είναι η παραγωγή του ενζύμου β-λακταμάση που αδρανοποιεί την αμπικιλίνη.

Αντιθέτως, η αντοχή της *Pseudomonas aeruginosa* στην αμπικιλίνη είναι εγγενής και αποτελεί ιδιότητα του είδους.

Ως «**μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά**» με ενδιαφέρον για την κλινική πράξη και τη Δημόσια Υγεία εννοείται η επίκτητη αντοχή.

## **1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ**

Η επίκτητη αντοχή είναι αποτέλεσμα αλλαγών στο γενετικό υλικό του συγκεκριμένου στελέχους του μικροβιακού είδους.

Κάθε μια από τις ομάδες των αντιμικροβιακών φαρμάκων δρά με συγκεκριμένο τρόπο σε συγκεκριμένο στόχο μέσα στο μικροβιακό κύτταρο. Σε γενικές γραμμές οι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών είναι:

### **1.2.1. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ**

Εδώ υπάγονται τα αντιβιοτικά που έχουν τον δακτύλιο της β-λακτάμης, χαρακτηριστικό στοιχείο της δομής των πενικιλινών. Τα β-λακταμικά αναστέλλουν τη δράση των τρανσπεπτιδασών (Penicillin Binding Proteins - PBPs) των ενζύμων που καταλύουν το cross linking, ενώ τα γλυκοπεπτίδια τροποποιούν την δομή του πενταπεπτιδίου του δισακχαρίτη, ώστε να μην μπορεί να λειτουργήσει ως δομικό στοιχείο της πεπτιδογλυκάνης .

Εδώ ανήκουν οι **πενικιλίνες** και τα **γλυκοπεπτίδια**. Έχουν τη μικρότερη τοξικότητα σε σχέση με άλλα αντιβιοτικά. Χρησιμοποιούνται κυρίως στη χημειοθεραπεία νόσων που προκαλούνται από Gram θετικά βακτήρια (στρεπτόκοκκοι, κλωστρίδια κ.α.) αλλά και Gram αρνητικά (νεϊσέριες, αιμόφιλοι, όχι εντεροβακτηριακά).

### **1.2.2. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ**

Εδώ ανήκουν οι **αμινογλυκοσίδες**, οι **μακρολίδες**, οι **τετρακυκλίνες** και η **χλωραμφαινικόλη**. Παρεμβαίνουν σε κάποια φάση της πρωτεϊνσύνθεσης μέσα στο μικροβιακό κύτταρο. Δρουν στο σημείο κατά το οποίο γίνεται η μετάφραση του γενετικού μηνύματος που μετέφερε το m-RNA μέσα στο ριβόσωμα. Στο 30S του ριβοσώματος δρουν οι αμινογλυκοσίδες και στο 50S οι μακρολίδες, η χλωραμφαινικόλη και η κλινδαμυκίνη. Έχουν στενό θεραπευτικό φάσμα.

### **1.2.3. ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DNA**

Δρουν είτε σαν αντιμεταβολίτες στην μεταβολική οδό σύνθεσης των πουρινών (**σουλφοναμίδες**, **τριμεθοπρίμη**), είτε αναστέλλοντας την δράση της DNA γυράσης (**κινολόνες**).

Αναλυτικότερα οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται στις κυριότερες κατηγορίες αντιβιοτικών είναι :

#### **β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ**

Εδώ ανήκουν οι **πενικιλίνες**, **κεφαλοσπορίνες**, **μονοβακτάμες**, **καρβανεπέμες** καθώς και συνδυασμοί πενικιλινών ή κεφαλοσπορίνων με αναστολείς β-λακταμασών.

Κοινό χαρακτηριστικό τους αποτελεί η παρουσία του β-λακταμικού δακτυλίου και μιας καρβοξυλικής ομάδας, πράγμα που συνεπάγεται ομοιότητες στο μηχανισμό δράσης και στη φαρμακοκινητική τους.

Ο μηχανισμός δράσης τους οφείλεται στην αναστολή σύνθεσης του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος. Ειδικότερα το στρώμα που προσφέρει προστασία στο βακτηριακό κύτταρο είναι οι πεπτιδογλυκάνες, ένα δίκτυο από αλυσίδες δισακχαριτών, που συνδέονται μέσω παράπλευρων πεπτιδίων. Για τον σχηματισμό του δικτύου βασικό ρόλο παίζουν οι τρανσπεπτιδάσες που συνδέουν τις παράπλευρες αλυσίδες πεπτιδίων και οι τρανσγλυκοζυλάσες που επεκτείνουν τις πολυσακχαριδικές αλυσίδες των γλυκανών. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και χαρακτηρίζονται ως πενικίλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες. (Penicillin Binding Proteins-PBPs), λόγω της ικανότητας σύνδεσης τους με ραδιενεργά σημασμένη πενικιλίνη. Οι πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες δρουν σαν ψευδο-υποστρώματα των παραπάνω ενζύμων, καταλαμβάνοντας και ακετυλιώνοντας τα ενεργά τους κέντρα, εμποδίζοντας έτσι την σύνθεση πεπτιδογλυκάνων, με αποτέλεσμα το βακτηριακό τοίχωμα να αποδυναμώνεται και να είναι εύαλωτο σε ρήξη λόγω ωσμωτικών αλλαγών. Παρομοίως η αζτρεονάμη δεσμεύεται κυρίως από το ένζυμο PBP3 των Gram αρνητικών αερόβιων βακτηρίων και σε αντίθεση με τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες δεν υδρολύεται από τις πιο συνηθισμένες β-λακταμάσες.

Οι καρβαπενέμες δεσμεύονται από ένζυμα PBP1 και PBP2 των Gram αρνητικών και των Gram θετικών βακτηρίων και είναι ανθεκτικές προς τις περισσότερες β-λακταμάσες.

Όσον αφορά για τις πενικιλίνες έχει προταθεί ότι διαθέτουν επιπλέον μηχανισμούς δράσης, όπως επαγωγή μεμβρανικών αυτολυτικών ενζύμων που καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα, η αναστολή ενδοπεπτιδασών και γλυκοσιδασών που εμπλέκονται στην κυτταρική αύξηση και τέλος, η αναστολή της σύνθεσης RNA σε ορισμένα βακτήρια

## **ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ**

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η *γενταμικίνη*, η *στρεπτομικίνη*, η *νεομικίνη*, η *καναμικίνη*, η *αμικασίνη*, η *τομπραμικίνη*, η *νετιμικίνη*. Αποτελούν μία από τις παλαιότερες και ευρύτερα χρησιμοποιούμενες ομάδες αντιβιοτικών και είναι εξαιρετικά δραστικές έναντι των εντεροβακτηριακών.

Ο μηχανισμός δράσης έγκειται στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω δέσμευσης

της ριβοσωμιακής υπομονάδας 30S των βακτηρίων με αποτέλεσμα να προκαλούν λανθασμένη ανάγνωση της γενετικής πληροφορίας και την παραγωγή μη λειτουργικών πρωτεϊνών.

## **ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ**

Περιλαμβάνει βακτηριοστατικά αντιβιοτικά ευρέος φάσματος όπως η *τετρακυκλίνη*, η *μινοκυκλίνη*, η *δοξυκυκλίνη*, η *οξυτετρακυκλίνη*. Ο μηχανισμός δράσης τους βασίζεται στην δέσμευση της ριβοσωμιακής υπομονάδας 30S, έτσι ώστε το μεταφορικό αμινοάκυλ-t RNA να μην έχει πρόσβαση στο σύμπλοκο αγγελιοφόρο RNA-ριβόσωμα, και κατά συνέπεια να αναστέλλεται η πρωτεϊνοσύνθεση.

## **ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ**

Είναι βακτηριοστατικός αντιμικροβιακός παράγοντας, που προέρχεται από τον μύκητα *Streptomyces venezuelae* και έχει ευρύ φάσμα δράσης. Παρεμποδίζει την επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μέσω δέσμευσης στην πεπτιδυλοτρανσφεράση της ριβοσωμικής υπομονάδας 50S, με αποτέλεσμα την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης.

## **ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ-ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ**

Εμπλέκονται σε μεταβολικές οδούς παρεμποδίζοντας έτσι την παραγωγή χημικών ουσιών απαραίτητων για τα βακτήρια. Π.χ. οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν την μετατροπή του p-αμινοβενζοϊκού οξέος σε διϋδροφυλλικό οξύ, ενώ η τριμεθοπρίμη αναστέλλει την δράση της διϋδροφυλλικής αναγωγάσης, με συνέπεια την αναστολή της σύνθεσης τετραϋδροφυλλικού από διϋδροφυλλικό οξύ και κατ' επέκταση τη σύνθεση DNA και πρωτεϊνών.

## **ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ**

Εδώ ανήκουν ισχυροί αντιμικροβιακοί παράγοντες όπως το *ναλιξιδικό οξύ*, η

*οφλοξασίνη*, η *νορφλοξασίνη* και η *σιπροφλοξασίνη*. Παρουσιάζουν εξαιρετική δραστηριότητα έναντι των εντεροβακτηριακών. Έχουν ως κύριο στόχο τη DNA γυράση, μία τύπου II DNA τοποϊσομεράση που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή, τον ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση του DNA, και ως εκ τούτου εμποδίζουν την σύνθεση του DNA.

Η DNA γυράση τέμνει τη διπλή έλικα του DNA. Η υπομονάδα A δεσμεύεται στα 5' άκρα που προκύπτουν και στη συνέχεια ένα άλλο τμήμα της αλυσίδας DNA περνάει μέσα από το σημείο που έγινε η τομή, οπότε επιτυγχάνεται «ξετύλιγμα» της διπλής έλικας και τέλος ξανακολλάει τις αλυσίδες DNA στο σημείο που έγινε η τομή. Η υπομονάδα A αποτελεί και τον πρωταρχικό στόχο των κινολών και έχει προταθεί ότι οι κινολόνες δεσμεύονται στο σύμπλοκο DNA-DNA γυράση μετά την τομή του DNA και εμποδίζουν την επανασυγκόλληση του.

### **1.3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ**

#### **1.3.1. ΓΕΝΙΚΑ**

Η ανάπτυξη των μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά προϋποθέτει αντίστοιχους γενετικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα οι στρατηγικές επιβίωσης των παθογόνων βακτηρίων βασίζονται στην έκφραση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά (Davies J., 1994, Mazel D, Davies J, 1999). Οι μηχανισμοί αυτοί δεν σχετίζονται μόνο με την αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, αλλά γενικότερα στην εξέλιξη του γονιδιώματος των βακτηρίων. Η προέλευση τους δεν είναι γνωστή.

Θεωρείται ότι μπορεί να βρίσκονται στο φυσικό περιβάλλον σε μια ποικιλία μικροοργανισμών που δεν είναι απαραίτητα παθογόνοι. Θεωρείται επίσης ότι προϋπήρχαν της χρήσης των αντιβιοτικών, αλλά κάτω από την επιλεκτική πίεση της χρήσης των αντιβιοτικών για προφύλαξη σε ανθρώπους και ζώα, ευνοήθηκε η επικράτηση των οργανισμών που τα έφεραν, καθώς και η οριζόντια μεταφορά τους, με αποτέλεσμα την εξάπλωση τους και την



εμφάνιση τους και σε είδη, όπου δεν υπήρχαν αρχικά.

Τα γονίδια αντοχής μπορεί να διακριθούν σε:

α) γονίδια αντοχής που αρχικά υπήρχαν σε βακτήρια ή μύκητες που παράγουν αντιβιοτικά για αυτοπροστασία,

β) γονίδια αντοχής που έχουν προέλθει από βασικά γονίδια κλασσικών βιοχημικών διεργασιών και τα οποία πλέον έχουν την ικανότητα να τροποποιούν και να απενεργοποιούν τα αντιβιοτικά.

### 1.3.2. ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ-ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΤΟΧΗ

Η αντοχή στα αντιβιοτικά διακρίνεται σε δύο τύπους :

α) **ενδογενής αντοχή (intrinsic resistance)**, όπου τα βακτήρια είναι ανθεκτικά σε κάποιο/α αντιβιοτικά από τη φύση τους, δηλαδή χωρίς να χρειάζεται να υποστούν τροποποίηση του γενετικού τους υλικού. Στην περίπτωση αυτή είναι ανθεκτικά όλα τα στελέχη ενός συγκεκριμένου είδους ή γένους.

Χαρακτηριστικές περιπτώσεις ενδογενούς αντοχής στα εντεροβακτηριακά αποτελούν:

- Η δυσχερής διάχυση αντιβιοτικών όπως πενικιλίνες G και M, η βανκομυκίνη, η ριφαμπικίνη, μέσω της εξωτερικής μεμβράνης των *E. coli*, *Pseudomonas spp.*
- Η απενεργοποίηση ορισμένων αντιβιοτικών από βακτηριακά ένζυμα π.χ. Φυσικές β-λακταμάσες στα γένη *Klebsiella*, *Enterobacter* και *P. aeruginosa*.
- Μειωμένη χημική συγγένεια μεταξύ του αντιβιοτικού και του στόχου του.

β) **επίκτητη αντοχή (acquired resistance)**, όπου τα βακτήρια καθίστανται ανθεκτικά στα αντιβιοτικά έπειτα από τροποποίηση του γενετικού τους υλικού. Αυτό το είδος αντοχής απαντάται σε ορισμένα μόνο στελέχη ενός είδους ή γένους.

Στην περίπτωση της επίκτητης αντοχής η τροποποίηση του γενετικού υλικού βασίζεται

σε δύο μηχανισμούς :

A) ΤΥΧΑΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΠΡΟΪΠΑΡΧΟΝΤΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

B) ΟΡΙΖΟΝΤΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΞΩΓΕΝΟΥΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

### 1.3.3. ΤΥΧΑΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΠΡΟΪΠΑΡΧΟΝΤΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Η μετάλλαξη που θα οδηγήσει σε αλλαγή γονοτύπου του βακτηρίου μπορεί να περιλαμβάνει μία απλή σημειακή μετάλλαξη (σε μια μοναδική βάση του DNA) ή ένα ολόκληρο γονίδιο ή πολλά γονίδια μαζί. Η μετάλλαξη αυτή μπορεί να είναι καταστροφική για το βακτήριο που την υπέστη (π.χ. θάνατος του βακτηρίου) ή “σιωπηρή” χωρίς αλλαγές στον φαινότυπο του βακτηρίου ή ακόμη μπορεί να οπλίσει τον μικροοργανισμό με “πλεονέκτημα επιβίωσης”.

Μια απλή τυχαία μετάλλαξη σε ένα γονίδιο του βακτηρίου μπορεί να οδηγήσει σε αντοχή προς κάποιο αντιβιοτικό, χωρίς να επηρεάζεται η λοιμογόνος δράση του βακτηρίου π.χ. αντοχή σε αντιφυματικούς παράγοντες, όπως η στρεπτομυκίνη, οφείλεται σε μια απλή μετάλλαξη .

Η αντοχή στις κινολόνες οφείλεται σε απλές μεταλλάξεις που αλλάζουν την DNA-γυράση ή προκαλούν αλλαγές στις πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους στην εξωτερική μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαπερατότητας του φαρμάκου. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι πολλά παθογόνα βακτήρια παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων (mutators).

Τα βακτήρια αυτά έχουν ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης του DNA ή δεν είναι ικανά να επαληθεύουν (proofreading) την ορθότητα της αντιγραφής (Bridges BA, 2001). Η συχνότητα των μεταλλάξεων σε βακτήρια με υψηλή αντοχή σε αντιβιοτικά είναι 1000 φορές μεγαλύτερη απ' ό τι σε φυσιολογικά στελέχη, γεγονός που προσδίδει αυξημένη ικανότητα προσαρμογής των μεταλλαγμένων αυτών στελεχών (mutators) (Chopra I. et al. 2003).

#### 1.3.4. ΟΡΙΖΟΝΤΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΞΩΓΕΝΟΥΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Ο δεύτερος τρόπος απόκτησης γονιδίων που προσφέρουν αντοχή σε αντιβιοτικά βασίζεται στη μεταφορά και ανταλλαγή ενός τέτοιου γονιδίου ή μιας ομάδας γονιδίων μεταξύ μικροοργανισμών (Davies J, 1994, Davison J 1994).

Πρόκειται δηλαδή για εισαγωγή εξωγενών γονιδίων στη γονιδιακή δεξαμενή ενός βακτηρίου. Σ' αυτή την περίπτωση το γονίδιο προϋπάρχει σε κάποια γονιδιακή δεξαμενή.

Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων βασίζεται σε τρεις γενετικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων τα βακτήρια κατορθώνουν να “εξελίσσονται” γενετικά. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι η Βακτηριακή Σύζευξη, η Μεταγωγή και ο Μετασχηματισμός.

**ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΣΥΖΕΥΞΗ** : Κατά την βακτηριακή σύζευξη δύο βακτήρια έρχονται σε στενή φυσική επαφή, μέσω των ινιδίων F ή sex pill (σωλήνας σύζευξης), που κωδικοποιούνται από τα συζευκτικά πλασμίδια (παράγοντες F). Γίνεται δηλαδή αυτομεταφορά ενός συζευκτικού πλασμιδίου ή τραπεζοζόνιου από ένα κύτταρο δότη (F+) σε ένα κύτταρο δέκτη (F-) (Bennett, 1995). Η στενή επαφή μεταξύ του δότη και του δέκτη είναι μία από τις σημαντικότερες απαιτήσεις για την αποτελεσματική σύζευξη.

Το σύμπλεγμα γονιδίων που κωδικοποιεί τα συστατικά της συσκευής μεταφοράς (transfer apparatus), έχει μέγεθος τουλάχιστον 15 kbp στα Gram-θετικά βακτήρια και 30 kbp στα Gram-αρνητικά. Επομένως δεν μπορεί να βρεθεί σε μικρά πλασμίδια ανθεκτικότητας που εμφανίζονται συνήθως μεταξύ των παθογόνων βακτηρίων.

Η σύζευξη είναι σπουδαία για τη διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ βακτηρίων διαφορετικού είδους και γένους σε μικτούς βακτηριακούς πληθυσμούς, όπως αυτοί που υπάρχουν στο δέρμα και τους βλεννογόνους της πεπτικής, της αναπνευστικής, και της γεννητικής οδού του ανθρώπου και των ζώων.

Μέχρι τώρα, συζευκτικά πλασμίδια και τραπεζοζόνια που μεταφέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα έχει αναφερθεί ότι βρίσκονται στα Gram-θετικά και gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια (Salysers et al., 1995).

**ΜΕΤΑΓΩΓΗ** : Είναι η διαδικασία μεταφοράς DNA από κύτταρο σε κύτταρο μέσω βακτηριοφάγων. Οι «βακτηριακοί ιοί» μολύνουν τα βακτήρια με την ενσωμάτωση του δικού τους DNA.

Στο βακτηριακό κύτταρο που δέχτηκε το φάγο, το DNA του μπορεί να κατευθύνει την παραγωγή των νέων μορίων του, η οποία περιλαμβάνει την έκφραση των γονιδίων που προέρχονται από το φάγο, την αντιγραφή του DNA του φάγου και το «πακετάρισμα» αυτού του DNA στα νέα μόρια του φάγου που απελευθερώνονται από το βακτηριακό κύτταρο (λυτικός κύκλος).

Από την άλλη, το DNA του φάγου μπορεί να ενσωματωθεί στο χρωμοσωμικό DNA του βακτηριακού κυττάρου του ξενιστή ως «προφάγος» και να παραμείνει εκεί για μεγάλες περιόδους σε μια ανενεργή κατάσταση (λυσιγενής κύκλος-λυσιγονία) δηλαδή σε μια γενετική κατάσταση κατά την οποία το γονιδίωμα του φάγου πολλαπλασιάζεται ως προφάγος μαζί με το γονιδίωμα του ξενιστή.

Ωστόσο οι εξωγενείς παράγοντες όπως UV-ακτινοβολία είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν τον προφάγο και να αρχίσει ένας λυτικός κύκλος. Χρωμοσωμικά γονίδια ανθεκτικότητας που βρίσκονται κοντά στην περιοχή ενσωμάτωσης του προφάγου μπορεί να γίνουν μέρος του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου όταν ο προφάγος δεν αποκόπτεται με ακρίβεια από το χρωμοσωμικό DNA (εξειδικευμένη μεταγωγή). Σε αυτή την περίπτωση, τα γονίδια ανθεκτικότητας μεταδίδονται μαζί με τα μόρια του φάγου στα κύτταρα ενός καινούργιου βακτηρίου-ξενιστή.

Από την άλλη κατά τη διάρκεια της συνάθροισης των βακτηριοφάγων, πλασμίδια ανθεκτικότητας μπορούν τυχαία να «πακεταριστούν» στις κεφαλές των φάγων αντί του DNA των βακτηριοφάγων. Οι «ψευδοφάγοι» που προκύπτουν είναι σε θέση να μολύνουν νέα κύτταρα ξενιστών, όπως οι κανονικοί βακτηριοφάγοι. Αφού όμως στερούνται το DNA του φάγου, μπορούν να εισάγουν μόνο πλασμιδιακό DNA και επομένως να προάγουν τη διάδοση πλασμιδίων ανθεκτικότητας στα κύτταρα του καινούργιου ξενιστή.

Η διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας μέσω της μεταγωγής επηρεάζεται έντονα από το περιορισμένο ποσό του DNA που μπορεί να «πακεταριστεί» σε μια κεφαλή φάγου και από την ανάγκη ύπαρξης ειδικών υποδοχέων για τη σύνδεση του βακτηριοφάγου στην επιφάνεια

του κυττάρου του νέου ξενιστή.

Ενώ τα μικρότερα πλασμίδια μεταφέρονται με μεταγωγή σαν γραμμικές αλυσίδες, μεγαλύτερα πλασμίδια δεν μπορούν να «πακεταριστούν» μέσα την κεφαλή ενός φάγου, δεδομένου ότι μόνο τα κύτταρα των ξενιστών που είναι φυλογενετικά συγγενή φέρουν τους ίδιους υποδοχείς για τη σύνδεση των φάγων.

Μεταγωγή παρατηρείται συνήθως μεταξύ των βακτηρίων του ίδιου είδους, αλλά σπάνια παρατηρείται μεταξύ βακτηρίων διαφορετικού είδους και γένους. Οι βακτηριοφάγοι που εμπλέκονται στην μεταγωγή ανιχνεύονται σε μια ευρεία ποικιλία βακτηρίων όπως *Desulfovibrio*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus* και *Xanthobacter* spp. (Modigan et al., 2003).

**ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ** : Ο μετασχηματισμός περιγράφει τη μεταφορά ελεύθερου DNA σε ικανά κύτταρα υποδοχείς. Ήταν ο πρώτος μηχανισμός μεταφοράς DNA που ανακαλύφθηκε μεταξύ των προκαρυωτικών οργανισμών (βακτηρίων) και περιλαμβάνει τον «καθαρισμό», δηλαδή την πρόσληψη του DNA από ένα βακτήριο μετά το θάνατο και την απογύμνωση του DNA ενός άλλου βακτηρίου.

Το DNA σε ένα νεκρό βακτήριο αποσυντίθεται και σπάει σε κομμάτια που απελευθερώνονται στο γύρω περιβάλλον, και που μπορεί να προσληφθούν από ικανούς για μετασχηματισμό υποδοχείς. Όταν γονίδια ανθεκτικότητας περιλαμβάνονται στο αποσυντιθέμενο DNA, είναι δυνατόν να προσληφθούν από τα γειτονικά βακτήρια και να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα τους (Harbottle et al., 2006).

Ωστόσο αφ' ενός, το ελεύθερο DNA που προέρχεται από τα βακτήρια που έχουν υποστεί λύση αποσυντίθεται εύκολα σε συνήθεις περιβαλλοντικές συνθήκες, αφ' ετέρου, μόνο μερικά βακτήρια, όπως ο *Streptococcus pneumoniae* ή ο *Bacillus* spp., δείχνουν μια φυσική δυνατότητα να προσλαμβάνουν DNA από το περιβάλλον τους.

Γενικά σε συνθήκες *in vivo*, ο μετασχηματισμός θεωρείται ότι παίζει περιορισμένο ρόλο στη μεταφορά των γονιδίων ανθεκτικότητας (Bennett, 1995), ενώ σε *in vitro* συνθήκες είναι ο σημαντικότερος τρόπος να εισαχθούν πλασμίδια σε νέα βακτήρια ξενιστών.

Η συμβολή πάντως του μετασχηματισμού και της μεταγωγής στην εξέλιξη της

πολλαπλής ανθεκτικότητας είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, αλλά εργαστηριακές έρευνες υποδεικνύουν ότι παίζουν θεωρητικά ρόλο στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα.

#### **1.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ**

Η διασπορά των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μεταξύ των βακτηρίων του ίδιου αλλά και διαφορετικού είδους και γένους, γίνεται κυρίως με την οριζόντια μεταφορά των κινητών γενετικών στοιχείων που φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας.

Τα κινητά γενετικά στοιχεία είναι δυνατόν να φέρουν πολλαπλά γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα στη σειρά και είναι πιθανόν υπεύθυνα για τη γρήγορη διασπορά τους μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων (Harbottle et al., 2006).

Τα κύρια κινητά γενετικά στοιχεία είναι τα πλασμίδια (plasmids), τα μεταθετόνια ή τρανσποζόνια (transposons) και τα ενσωματόνια ή ιντεγκρόνια (integrons) που φέρουν γονιδιακές κασέτες (gene cassettes). Αυτοί οι τύποι στοιχείων αποτελούνται από δίκλωνο DNA, αλλά διαφέρουν ευδιάκριτα στο μέγεθος, τη δομή, τις βιολογικές ιδιότητες καθώς επίσης και στους τρόπους μεταφοράς.

##### **1.4.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ**

Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί αντοχής εδρεύουν στα πλασμίδια, τα οποία είναι εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία και έχουν ανιχνευθεί στα περισσότερα γένη βακτηρίων ιατρικής ή κτηνιατρικής σημασίας, αλλά και σε βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλεννογόνων στον άνθρωπο και στα ζώα. Σχεδόν όλα είναι κυκλικά μόρια (υπάρχουν και αρκετά γραμμικά) και αποτελούνται από δίκλωνο DNA μεγέθους 1-300 Kb. Το τυπικό πλασμίδιο είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA, μικρότερο από το 1/20 του μεγέθους του χρωμοσώματος.

Τα πλασμίδια αντιγράφονται αυτόνομα, ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του ξενιστή λόγω της ύπαρξης δικών τους συστημάτων αντιγραφής. Πλασμίδια που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες μπορούν σταθερά να συνυπάρξουν μέσα στο ίδιο βακτηριακό κύτταρο. Τα πλασμίδια που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας ονομάζονται R πλασμίδια (Resistant plasmids) ή R factors (Harbottle et al., 2006). Τα R πλασμίδια ανακαλύφθηκαν στην Ιαπωνία τη δεκαετία του 1950, σε στελέχη των *Enterobacteriaceae* sp. που είχαν αποκτήσει ανθεκτικότητα σε πλήθος αντιμικροβιακών φαρμάκων (πολλαπλή ανθεκτικότητα).

Η μεταφορά των πλασμιδίων R επιτρέπει την ταχεία διάδοση της ανθεκτικότητας και επιτυγχάνεται μέσω της σύζευξης βακτηρίων. Εκτός από τα γονίδια ανθεκτικότητας, διάφορα άλλα γονίδια φέρονται με τα πλασμίδια, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν τις λειτουργίες μεταβολισμού, τη λοιμογόνο δύναμη, και τις λειτουργίες γονιμότητας του βακτηρίου (Stanisich, 1988). Τα πλασμίδια μπορεί να φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας εκτός από τα γονίδια που κωδικοποιούν τις άλλες λειτουργίες. Τα πλασμίδια είναι δυνατόν να συγχωνευθούν με άλλα πλασμίδια, να ενσωματωθούν, είτε εν μέρει, είτε στο σύνολο τους μέσα στο χρωμοσωμικό DNA, και να ενεργήσουν ως μεταφορείς τραπεζονίων ή ενσωματονίων (Bennett, 1995).

Μεγάλα πλασμίδια μπορεί να φέρουν *tra2* σύμπλεγμα γονιδίων, γονίδια υπεύθυνα για τη μεταφορά του ίδιου του πλασμιδίου από ένα βακτηριακό κύτταρο σε άλλο. Τέτοια πλασμίδια αναφέρονται ως συζευκτικά (conjugative) πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι δυνατόν να φέρουν γονίδια για:

- α) την αναπαραγωγή του πλασμιδίου,
- β) τον σχηματισμό συζευκτικών ινιδίων (sex pilli),
- γ) την ικανότητα σύζευξης και μεταφοράς DNA σε άλλο βακτήριο,
- δ) την αντοχή στα αντιβιοτικά,
- ε) την παραγωγή κολισίνης-βακτηριοσίνης,
- στ) την σύνθεση εντεροτοξίνης, αιμολυσίνης και εξωτοξίνης,
- ζ) την ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα.

Παράδειγμα αντοχής σε αντιβιοτικό που βασίζεται σε πλασμιδιακό γονίδιο αποτελεί η αντοχή στα β-λακταμικά, λόγω της πλασμιδιακής παραγωγής των β-λακταμασών ευρέως

φάσματος. Αυτές προσφέρουν αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά εκτός από τις καρβανεπάμες και τις κεφαμυκίνες. Επίσης το πλασμίδιο pMG252 προσφέρει αντοχή στις κινολόνες και το ναλιξιδικό οξύ στην *Klebsiella pneumoniae*, ενώ η πλασμιδιο-εξαρτώμενη ακετυλοτρανσφεράση απενεργοποιεί την χλωραμφαινικόλη (Swaw WV, 1984).

#### 1.4.2. ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ

Εκτός από τα πλασμίδια μία άλλη κατηγορία μεταθετών γενετικών στοιχείων είναι τα μεταθετόνια ή τρανσποζόνια (transposons), τα οποία σε αντίθεση με τα πλασμίδια-που αντιγράφονται αυτόνομα–δεν διαθέτουν συστήματα αντιγραφής και για το λόγο αυτό προκειμένου να επιβιώσουν πρέπει να ενσωματωθούν σε γενετικά στοιχεία ικανά για αντιγραφή, όπως είναι το χρωμοσωμικό DNA ή τα πλασμίδια στο κύτταρο. (Παπαναγιώτου Ι.,Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β, 2005).

Πρωτομελετήθηκαν από την Barbara McClintock η οποία να χαρακτήρησε και ως “μοριακά παράσιτα”. Τα τρανσποζόνια ποικίλλουν σε μέγεθος (<1 kb-60 kbp ) και σε δομή. Τα μικρότερα τρανσποζόνια, επίσης γνωστά ως ακολουθίες ένθεσης (insertion sequence, IS elements) (Insertion sequence, IS): είναι ο απλούστερος τύπος μεταθετών στοιχείων. Διαθέτει μόνο γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη μετάθεση και φέρουν απλώς το γονίδιο της μεταθετάσης που είναι υπεύθυνη για τη μετακίνηση του γενετικού στοιχείου.

Τα μεγαλύτερα τρανσποζόνια φέρουν συνήθως ένα ή περισσότερα πρόσθετα γονίδια, τα περισσότερα εκ των οποίων κωδικοποιούν ιδιότητες της ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Πολλά τρανσποζόνια έχουν ελάχιστη ή καμία ειδικότητα στόχου και επομένως είναι σε θέση να παρεμβληθούν σε διάφορες θέσεις στο χρωμοσωμικό ή πλασμιδιακό DNA. Επιπρόσθετα υπάρχουν και συζευκτικά τρανσποζόνια, τα οποία διαθέτουν γονίδια που τους επιτρέπουν όχι μόνο να μετακινούνται από μία θέση του βακτηριακού γονιδιώματος σε άλλη, αλλά να μεταφέρονται ολόκληρα από ένα βακτήριο σε άλλο.

Τα συζευκτικά τρανσποζόνια φαίνονται σαν να είναι υβρίδια μεταξύ τρανσποζόνιων και πλασμιδίων και έχουν ταυτοποιηθεί τόσο σε Gram-αρνητικά όσο και Gram-θετικά βακτήρια (Harbottle et al., 2006). Τα μεγάλα συζευκτικά τρανσποζόνια φέρουν επίσης τα



γονίδια *tra* (Alekshun και Levy, 2000; Bager και Helmuth, 2001) που είναι ομάδα γονιδίων του πλασμιδίου που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη μεταφορά και αντιγραφή του DNA, καθώς και άλλες που συμμετέχουν σε σχηματισμό κυτταρικών ζευγών.

Παράδειγμα αντοχής σε αντιβιοτικά οφειλόμενη στα τρανσποζόνια αποτελεί η αντοχή της *Salmonella panama* στην καναμυκίνη, που βασίζεται στο τρανσποζόνιο Tn1525, το οποίο εδρεύει στο πλασμίδιο pIP112 (IncII). (Labigne-Roussel A, Briaux-Gerbaud S, Courvalin P, 1983).

Άλλο ένα παράδειγμα είναι το τρανσποζόνιο Tn2610, στο πλασμίδιο pCS200 κλινικών στελεχών της *Escherichia coli*, το οποίο φέρει το γονίδιο των β-λακταμασών που υδρολύουν την καρβενικιλίνη, καθώς και τα γονίδια αντοχής στη στρεπτομυκίνη και την σουλφοναμίδη (Yamamoto T. et al. 1983).

### 1.4.3. INTEΓΚΡΟΝΙΑ

Τα ενσωματόνια ή ιντεγκρόνια (integrations) είναι ένα είδος μεταθετών γενετικών στοιχείων, τα οποία βρίσκονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα, στα πλασμίδια αλλά και στα τρανσποζόνια, και τα οποία έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν εξωγενή γονίδια αλλά και να τα αποκόπτουν (Stokes HW, Hall RM, 1989; Fluit AC, Schmitz FJ 2004).

Όλα τα ιντεγκρόνια αποτελούνται από 3 στοιχεία :

α) γονίδιο ιντεγράσης

β) μία πρωταρχική θέση ανασυνδυασμού (adjacent recombination site)

γ) έναν ισχυρό υποκινητή (Maguire AJ et al. 2001). Οι ιντεγκράσες επιτρέπουν τον ανασυνδυασμό συγκεκριμένων μονάδων DNA που φέρουν γονίδια αντοχής. Ο υποκινητής επάγει την έκφραση των γονιδίων αντοχής, ενώ η θέση ανασυνδυασμού είναι το σημείο όπου θα ενσωματωθεί το DNA.

Αντιπροσωπεύουν άθικτα ή ελαττωματικά τρανσποζόνια και αποτελούνται συνήθως από δύο συντηρημένες περιοχές στις θέσεις 5' και 3' (conserved regions).

Η περιοχή 5' φέρει το γονίδιο *intI* που κωδικοποιεί την ενσωματάση (integrase), υπεύθυνη για την ειδική περιοχή ενσωμάτωσης των γονιδιακών κασετών-στη θέση

ανασυνδυσμού attI που αναγνωρίζεται από την ενσωμάτωση-καθώς και τον υποκινητή P<sub>c</sub> που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των γονιδίων των γονιδιακών κασετών.

Η περιοχή 3' μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα άλλο γονίδιο ανθεκτικότητας, όπως το γονίδιο ανθεκτικότητας στις σουλφοναμίδες sulII (Recchia και Hall, 1995).

Σήμερα είναι γνωστές τουλάχιστον πέντε κλάσεις ενσωματωσίων I, II, III, IV και V με βάση την ακολουθία των γονιδίων που κωδικοποιούν την ενσωμάτωση (integrase coding sequence).

Στα *Enterobacteriaceae* spp., ταυτοποιούνται συχνότερα τα ενσωματόνια της κλάσης I (class I intergens) και II (Harbottle et al., 2006), όπου η τάξη I έχει σχέση με την πολλαπλή αντοχή (αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά ταυτόχρονα) ενώ η τάξη II περιλαμβάνει το τρανσποζόνιο Tn7 το οποίο σχετίζεται με την αντοχή στην τριμεθοπρίμη, στρεπτομυκίνη και σπεκτινομυκίνη (Hall RM et al. 1998, Chang CY et al. 2000, Yu HS 2004).

Ο όρος “superintegron” επινοήθηκε από τον Mazel και τους συνεργάτες του το 1998 για τα ενσωματόνια (integrons) που έχουν ενσωματώσει εκατοντάδες γονιδιακές κασέτες.

#### 1.4.4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΣΕΤΕΣ

Οι γονιδιακές κασέτες (gene cassettes) είναι μικρά κινητά γενετικά στοιχεία άγνωστης προέλευσης που έχουν μέγεθος μικρότερο από 2 kbp (συνήθως 500-1000 bp). Μέχρι σήμερα, έχουν παρητηρηθεί μόνο στα Gram-αρνητικά βακτήρια (Recchia και Hall, 1995).

Αποτελούνται συνήθως από ένα γονίδιο που συνήθως είναι ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα και μια μόνο συγκεκριμένη περιοχή ανασυνδυσμού (περιοχή ανασυνδυσμού σε ειδική θέση, attC). Περιβάλλονται εκατέρωθεν από την αλληλουχία GTTPuPu (όπου Pu είναι μία πουρίνη), άρα δεν αποτελούν τυχαία γονίδια που μπορεί να μεταφερθούν, αλλά γονίδια μέσα σε ειδικές αλληλουχίες του DNA (περιοχές ανασυνδυσμού), που αναγνωρίζονται από την ενσωμάτωση των ενσωματωσίων.

Είναι γονίδια που δεν εκφράζονται έως ότου ενσωματωθούν κοντά σε έναν υποκινητή του ενσωματωσίου. Οι γονιδιακές κασέτες διαφέρουν από τα πλασμίδια στο ότι δεν διαθέτουν συστήματα αντιγραφής, και από τα τρανσποζόνια στην έλλειψη συστημάτων μετάθεσης. Κινούνται μέσω της περιοχής ανασυνδυσμού σε ειδική θέση και συνήθως βρίσκονται σε

συγκεκριμένες θέσεις μέσα σε ένα ενσωματόνιο.

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί κασέτες γονιδίων που προσφέρουν αντοχή σε όλα σχεδόν τα αντιβιοτικά (πάνω από 70 διαφορετικές κασέτες είναι γνωστές και έχουν παρατηρηθεί μέχρι και 9 σε ένα ενσωματόνιο. (Recchia G.D&Hall R.M., 1999).

#### **1.4.5. ORF (OPEN READING FRAME)**

Το τμήμα 3' του ιντεγρονίου περιλαμβάνει συχνά ένα γονίδιο αντοχής στις σουλφοναμίδες (sull), ένα γονιδιακό τόπο αντοχής στο βρωμιούχο αιθίδιο (qacEΔI) και μία περιοχή orf5 (Grape M et al. 2003).

Τέλος ένα καινούργιο γενετικό στοιχείο έχει βρεθεί το οποίο ονομάζεται orf513. Το στοιχείο αυτό σχετίζεται με μεγάλο αριθμό γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα και με τα ενσωματόνια κλάσης I, δημιουργώντας την έννοια της “σύνθετης κλάσης I των ενσωματονίων”.

Αυτό το σύνθετο ενσωματόνιο μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη, τριμεθοπρίμη, αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες και σε μια σειρά από β-λακτάμες. Η orf513 περιοχή θεωρείται από ορισμένους ότι ίσως να αποτελεί υποομάδα μιας οικογένειας ασυνήθιστων ακολουθιών ένθεσης IS91 (Toleman, et al., 2006).

Σε έρευνα στην Αυστραλία βρέθηκε ότι το 49% των Εντεροβακτηριακών που απομονώθηκαν από το ουροποιητικό σύστημα έφεραν ιντεργκόνια που περιείχαν κασέτες γονιδίων αντοχής στην στρεπτομυκίνη, σπεκτινομυκίνη καθώς και στις αμινογλυκοσίδες ,τριμεθοπρίμη και ερυθρομυκίνη (White P. A. et al., 2000). Έχει αποδειχθεί ότι ιντεργκόνια υπάρχουν στις αιμορραγικές *Escherichia coli* και περιέχουν γονίδια αντοχής κυρίως στη στρεπτομυκίνη και ασπεκτινομυκίνη και λιγότερο στην τριμεθοπρίμη (Morabito S. et al. 2002).

### **1.5. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

Η παρουσία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών αποτελεί—παγκοσμίως αναγνωρισμένο-σημαντικό πρόβλημα της Δημόσιας Υγείας γιατί:

- Είναι πολύ διαδεδομένο φαινόμενο παγκοσμίως και παρουσιάζει συνεχή και διαχρονική αύξηση.
- Μειώνει τις επιλογές των γιατρών για θεραπεία, περιορίζοντας τις ομάδες των δραστικών αντιβιοτικών για την συγκεκριμένη λοίμωξη. Έτσι ο γιατρός είναι υποχρεωμένος να διαλέξει αντιβιοτικό που είναι πιο ακριβό, είναι συχνά πολύ πιο τοξικό και μπορεί να εμφανίζει μειωμένη φαρμακοκινητική ικανότητα.
- Αυξάνεται η θνητότητα και δημιουργούνται σοβαρά κλινικά προβλήματα , κυρίως στα νοσοκομεία μέσα στα οποία από τις δεκάδες των αντιβιοτικών που υπάρχουν ελάχιστα είναι δραστικά έναντι των πολυανθεκτικών μικροβίων .
- Αυξάνεται ο ανθρώπινος πόνος καθώς οι λοιμώξεις γίνονται δυσίατες, ο ασθενής πρέπει να παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο νοσοκομείο και παράλληλα να του χορηγείται ενδοφλέβια θεραπεία .
- Δημιουργούνται επίσης νομικά ζητήματα.
- Επιπλέον η εμφάνιση μικροβιακής αντοχής σε νοσοκομεία αποτελεί δείκτη κακής ποιότητας υπηρεσιών περίθαλψης και πολλοί ασθενείς καταφεύγουν σε αγωγές για αποζημίωση.

Η αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής απαιτεί την εφαρμογή πολιτικών Δημόσιας Υγείας όπως είναι:

- Η επιτήρηση και παρακολούθηση των επιδημιολογικών δεδομένων της.
- Η εκπόνηση στρατηγικών εμπειρικής φαρμακευτικής αγωγής.
- Η εφαρμογή μέτρων ελέγχου διασποράς λοιμώξεων.

## 2. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ

Η παραγωγή ζωικών προϊόντων έχει εντατικοποιηθεί τα τελευταία πενήντα χρόνια, ενώ ταυτόχρονα έχει γίνει περισσότερο αποδοτική, αφού μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντων παράγεται από μικρότερο αριθμό ζώων. Αυτή η αύξηση της παραγωγικότητας είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων όπως, της γενετικής επιλογής, της βελτίωσης της διατροφής, της βελτίωσης της διαχείρισης και της προληπτικής ιατρικής. Άλλωστε οι σύγχρονες πρακτικές εντατικοποίησης της εκτροφής των παραγωγικών ζώων έχουν δημιουργήσει μια καινούργια κατάσταση όσον αφορά τη διαχείριση των εκτροφών, στην οποία σημαντικό ρόλο παίζει η παροχή κτηνιατρικών υπηρεσιών. Η κτηνιατρική κλινική πράξη στα παραγωγικά ζώα περιλαμβάνει:

- τη χρήση εμβολίων και προληπτικής φαρμακευτικής αγωγής για την πρόληψη ή ελαχιστοποίηση των λοιμώξεων,
- τη χρήση αντιμικροβιακών και αντιπαρασιτικών φαρμάκων για τη θεραπεία μικροβιακών και παρασιτικών παθήσεων αντίστοιχα, και
- τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων και ορμονών, (για την αύξηση της παραγωγικότητας, της ανάπτυξης και τη βελτίωση της μετατρεψιμότητας της τροφής) ως αυξητικών παραγόντων (National Research Council, 1999).

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα ως αυξητικοί παράγοντες δεν χρησιμοποιούνται πλέον στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αφού υπάρχει νομοθετική απαγόρευση από 1/1/2006 (Κανονισμός 1831/2003 Ε.Κ), αλλά εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται στην εκτροφή των παραγωγικών ζώων σε άλλες χώρες, όπως για παράδειγμα στις Η.Π.Α. Είναι επομένως φανερό ότι τα κτηνιατρικά φάρμακα και ειδικότερα τα αντιμικροβιακά αποτελούν ένα σημαντικό στοιχείο της παραγωγής κρέατος, αυγών και γάλακτος από τα ζώα που εκτρέφονται για αυτό ακριβώς το σκοπό.

Η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων για τη θεραπεία ασθενειών στα παραγωγικά

ζώα άρχισε στα μέσα της δεκαετίας του 1940, ενώ η προσθήκη τους στην τροφή που προοριζόταν για βοοειδή, χοίρους, ορνιθοειδή ξεκίνησε στις αρχές του 1950 (Tollefson και Flynn, 2002). Τα αντιμικροβιακά φάρμακα δρούν κατά των μικροοργανισμών με διαφορετικούς μηχανισμούς και με βάση τον μηχανισμό δράσης τους ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες:

- σε αυτά που προκαλούν αναστολή ή παρεμπόδιση της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες, γλυκοπεπτίδια και βακιτρακίνη).
- σε αυτά που προκαλούν διάσπαση/αποσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών (πολυμυξίνη Β, κολιστίνη, νυστατίνη, αμφοτερικίνη Β).
- σε αυτά που προκαλούν αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης των μικροοργανισμών (αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη, μακρολίδια, πλεуроμουτιλίνες, λινκοσαμίδες, στρεπτογραμμίνες) και ,
- σε αυτά που προκαλούν αναστολή της σύνθεσης ή της λειτουργίας των νουκλεϊκών οξέων (κινολόνες-φθοριοκινολόνες, σουλφοναμίδες, διαμινοπυριδίνες).

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στα παραγωγικά ζώα για:

- τη διασφάλιση της υγείας και της ευζωίας των ζώων
- την πρόληψη της διασποράς επιδημικών λοιμώξεων στα ζώα,
- την πρόληψη της μετάδοσης των ζωνοσόων από τα ζώα στον άνθρωπο,
- τη διασφάλιση της ποιότητας των ζωικών προϊόντων,
- την πρόληψη τροφιογενών λοιμώξεων στον άνθρωπο (Ungemach, 2000).

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στα παραγωγικά ζώα συνήθως ανήκουν στις ίδιες ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται και στον άνθρωπο (Guardabass και Courvalin, 2006) και ανάλογα με τη σημασία που έχουν για την υγεία του ανθρώπου διακρίνονται σε:

α) πολύ μεγάλης σπουδαιότητας (very high importance), όπως π.χ δεύτερης γενεάς

φθοριοκινολόνες, ριφαμυκίνες, λινκομυκίνη, ερυθρομυκίνη, κεφαλοσπορίνες 3ης και 4ης γενιάς,

β) μεγάλης σπουδαιότητας (high importance), όπως π.χ. γενταμυκίνη, κεφαλοσπορίνες 1ης και 2ης γενιάς,

γ) μέτριας σπουδαιότητας (medium importance), όπως π.χ. καναμυκίνη, αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη,

κινολόνες στενού φάσματος,

δ) μικρής σπουδαιότητας (low importance), όπως π.χ. κολιστίνη, πενικιλίνη G και V, σπεκτινομυκίνη, και

ε) πολύ μικρής σπουδαιότητας (very low importance) όπως π.χ βακιτρακίνη, πολυμυξίνη.

Είναι επομένως σημαντικό να μη γίνεται κατάχρηση των αντιμικροβιακών φαρμάκων που έχουν μεγάλη σπουδαιότητα για την υγεία του ανθρώπου, όπως π.χ. οι κεφαλοσπορίνες 3ης και 4ης γενιάς, οι οποίες χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για νοσοκομειακές λοιμώξεις από gram-αρνητικά βακτήρια ή/και στην περίπτωση αποτυχίας θεραπείας με άλλες β-λακτάμες, δεδομένου ότι αυξάνεται η πιθανότητα δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών που μπορεί να μεταδοθούν από τα ζώα στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας ή μέσω της επαφής. Τα ανθεκτικά αυτά στελέχη δεν μπορεί να αντιμετωπισθούν με τα παραπάνω αντιμικροβιακά και έτσι ουσιαστικά αποδυναμώνεται το οπλοστάσιο των φαρμάκων που είναι διαθέσιμο για την προστασία της Δημόσιας Υγείας.

## **2.1. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ**

Τα αντιβιοτικά στα παραγωγικά ζώα χρησιμοποιούνται για :

- Θεραπεία
- Μεταφύλαξη
- Προφύλαξη - Πρόληψη

- Αυξητική δράση

### 2.1.1. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ως *θεραπεία* ορίζεται η χορήγηση αντιβιοτικών σε ένα ζώο (ατομική θεραπεία) ή σε μια ομάδα ζώων (ομαδική θεραπεία) που νοσεί κλινικά, δηλαδή παρουσιάζει μια εμφανή βακτηριακή λοίμωξη. Σκοπός της θεραπείας είναι να περιορισθεί η εξέλιξη της ασθένειας στα νοσούντα ζώα, αφού η ασθένεια θα είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη απόδοση των ζώων.

Ο τρόπος χορήγησης των φαρμάκων για θεραπευτικούς σκοπούς διαφέρει ανάλογα με τον αριθμό των ζώων και τον τύπο της εκτροφής. Η ατομική θεραπεία εφαρμόζεται κυρίως στα κατοικίδια ζώα, ενώ στα παραγωγικά ζώα εφαρμόζεται κατά περίπτωση σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, μόσχους, χοιρομητέρες, ενήλικα πρόβατα και αίγες (Schwarz et al., 2001; McEwen και Fedorka-Cray, 2002).

Η ατομική θεραπεία συχνά δεν μπορεί να εφαρμοσθεί στην πράξη σε παραγωγικά ζώα, τα οποία εκτρέφονται σε ομάδες, όπως σμήνη κρεοπαραγωγών ορνίθων ή ομάδες απογαλακτισμένων χοιριδίων. Σε τέτοιες περιπτώσεις είναι προτιμότερη η ομαδική θεραπεία, οπότε τα αντιμικροβιακά φάρμακα χορηγούνται με την τροφή ή το νερό. Όπως στην ατομική έτσι και στην ομαδική θεραπεία πριν την εφαρμογή της πρέπει να γίνει ταυτοποίηση του παθογόνου βακτηρίου και να επιλεγεί το κατάλληλο αντιμικροβιακό με βάση τη δοκιμή ευαισθησίας.

Η θεραπεία με αντιβιοτικά μέσω της τροφής ή του νερού, όσο εύκολα και αν εφαρμόζεται παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα. Τα σπουδαιότερα είναι:

- η ανομοιογενής ανάμιξη του αντιμικροβιακού φαρμάκου με την τροφή,
- η μειωμένη διαλυτότητα του φαρμάκου στο πόσιμο νερό και
- η ασυμβατότητα-αλληλεπίδραση του αντιμικροβιακού φαρμάκου με κάποιο συστατικό της τροφής ή του νερού.

Επίσης, ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με την ομαδική θεραπεία είναι η ανεπαρκής πρόσληψη του φαρμάκου από τα ζώα, δεδομένης της μειωμένης λήψης τροφής και



νερού από τα ασθενή ζώα. Παρόλα αυτά η ομαδική θεραπεία μέσω τροφής ή νερού είναι ο μόνος τρόπος χορήγησης φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα και για να έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα θα πρέπει να γίνεται με τον ενδεδειγμένο τρόπο.

### **2.1.2. ΜΕΤΑΦΥΛΑΞΗ**

Ο όρος *μεταφύλαξη* περιγράφει την χρήση των αντιβιοτικών φαρμάκων σε μια ομάδα ζώων σε χρόνο κατά τον οποίο ορισμένα μόνο από αυτά παρουσιάζουν συμπτώματα της ασθένειας, αλλά αναμένεται μελλοντικά να προσβληθούν και άλλα ζώα της ομάδας.

Η μεταφύλαξη είναι απαραίτητη για την αποτροπή της μετάδοσης της λοίμωξης από τα ασθενή στα υγιή ζώα της ομάδας. Η μεταφύλαξη ως μαζική θεραπεία μειονεκτεί αφενός διότι χορηγούνται φάρμακα σε ζώα που δεν τα χρειάζονται, αφετέρου η χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων μόνο σε διαγνωσμένα ασθενή ζώα μειονεκτεί διότι η χορήγηση του φαρμάκου δεν γίνεται σε ζώα τα οποία βρίσκονται στα αρχικά στάδια της νόσου.

Προσπάθειες να περιορισθεί η μεταφύλαξη μόνο σε ζώα που πιθανόν θα ωφεληθούν από τη θεραπεία χρησιμοποιώντας ως δείκτη εκτίμησης της κλινικής κατάστασης τη θερμοκρασία του σώματος, απέτυχαν (Guthrie, et al., 1997).

### **2.1.3. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ – ΠΡΟΛΗΨΗ**

Η *προφύλαξη-πρόληψη* είναι η χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων σε υγιή ζώα, τα οποία εκτίθενται σε κάποιο κίνδυνο χωρίς όμως να έχει εκδηλωθεί κάποιο νόσημα και να έχει ταυτοποιηθεί ο υπεύθυνος αιτιολογικός παράγοντας (Phillips, et al., 2004).

Η προφυλακτική θεραπεία με αντιμικροβιακά φάρμακα εφαρμόζεται σε κάποιες κρίσιμες χρονικές περιόδους για την υγεία των ζώων, περιόδους δηλαδή που υφίστανται έντονη καταπόνηση με ενδεχόμενο κίνδυνο ανάδυσης λοιμωδών νοσημάτων.

Η προληπτική χρήση των αντιμικροβιακών μπορεί να γίνει τόσο ατομικά, όσο και ομαδικά και είναι ευρέως αποδεκτή στη κτηνιατρική κλινική πρακτική (παθολογία-

χειρουργική). Ειδικότερα:

α) στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες η προφυλακτική ενδομαστική χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων σε θεραπευτικά επίπεδα στο τέλος της γαλακτικής περιόδου προλαμβάνει την εκδήλωση μαστίτιδων κατά την επόμενη γαλακτική περίοδο, αφού μεγάλες συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού φαρμάκου επιτυγχάνονται για όλη τη διάρκεια της ξηράς περιόδου.

β) στην εκτροφή χοίρων και μόσχων προληπτική χορήγηση εφαρμόζεται κατά τον απογαλακτισμό και κατά την ανάμιξη ζώων από διαφορετικές ομάδες, προκειμένου να ελεγχθεί η εκδήλωση νοσημάτων από το αναπνευστικό και πεπτικό σύστημα.

Χωρίς την προληπτική χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων θα εμφανίζονταν σε μεγάλο ποσοστό κλινικές λοιμώξεις που θα είχαν αρνητική επίδραση στην ευζωία, θα απαιτούσαν μεγαλύτερες ποσότητες αντιμικροβιακών φαρμάκων για τη θεραπεία-μεταφύλαξη, ενώ ταυτόχρονα θα μειωνόταν δραστικά η παραγωγικότητα των ζώων. Έτσι, η προφυλακτική θεραπεία για τις χρονικές περιόδους της εκτροφής των ζώων που υφίστανται έντονη καταπόνηση και άρα κινδυνεύουν από λοιμώξεις - ειδικά στην εκτροφή των χοίρων και των μόσχων - είναι αναπόφευκτη (Schwarz, et al., 2001).

Ωστόσο, η προληπτική χορήγηση αντιβιοτικών θεωρείται από πολλούς ερευνητές σαν το υπόβαθρο για την ανάπτυξη βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά φάρμακα, λειτουργεί δηλαδή ως παράγοντας άσκησης «πίεσης επιλογής» (selective pressure).

Ακόμα περισσότερο όμως θεωρήθηκε ως παράγοντας πίεσης επιλογής για τα βακτήρια η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων ως *αυξητικών παραγόντων*.

#### **2.1.4. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

Αν και τα αντιβιοτικά φάρμακα ως αυξητικοί παράγοντες έχουν απαγορευθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.), κρίνεται απαραίτητο να αναφερθούν στοιχεία για τη δράση αυτή των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Η ιδιότητα των αντιμικροβιακών φαρμάκων να επιταχύνουν την ανάπτυξη των ζώων ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1940, όταν διαπιστώθηκε ότι

όρνιθες που τρέφονταν με τροφή εμπλουτισμένη με τετρακυκλίνες, αναπτύσσονταν ταχύτερα από τα κοτόπουλα που τρέφονταν με τροφή που δεν περιείχε τετρακυκλίνες.

Από τότε πολλά αντιμικροβιακά φάρμακα έχει βρεθεί ότι βελτιώνουν τη μέση ημερήσια αύξηση βάρους, καθώς και τη μετατρεψιμότητα της τροφής στα διάφορα ζωικά είδη (Gaskins et al., 2002). Τα αντιβιοτικά φάρμακα για αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνται ως προσθετικά της τροφής σε υπο-θεραπευτικές δόσεις που κυμαίνονται από 2,5 μέχρι 125 mg/kg (Lawrence, 1998).

Στις Η.Π.Α. η «υπό-θεραπευτική χορήγηση» των αντιβιοτικών φαρμάκων, δηλαδή χρήση τους για βελτίωση ανάπτυξης των ζώων και της μετατρεψιμότητας της τροφής, σημαίνει προσθήκη τους στην τροφή σε συγκέντρωση κάτω από 200g ανά τόνο για περισσότερες από δύο εβδομάδες. Είναι γεγονός όμως ότι η χρήση των αντιβιοτικών φαρμάκων ως *αυξητικών παραγόντων* λειτουργεί ταυτόχρονα και με την έννοια της *προληπτικής θεραπείας*, για αυτό και στη Βόρεια Αμερική κάποια φάρμακα εγκρίνονται ταυτόχρονα και για τους δύο σκοπούς, δηλαδή την πρόληψη και την αύξηση της ανάπτυξης. Για αυτόν ακριβώς το λόγο οι Mellon και συνεργάτες (2001) χρησιμοποιούν τον όρο «μη θεραπευτική χρήση» των αντιβιοτικών που περιλαμβάνει την αύξηση της ανάπτυξης και την προληπτική χρήση αυτών κατά των ασθενειών των ζώων.

Είναι γεγονός ότι η διαφορά μεταξύ πρόληψης και αύξησης της ανάπτυξης είναι λιγότερο σαφής από ότι η διαφορά μεταξύ προφύλαξης και θεραπείας. Η Ευρωπαϊκή Ένωση υιοθετώντας την «αρχή της πρόβλεψης ή πρόληψης του κινδύνου» διατυπώνει ότι η ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά φάρμακα έχει μεγαλύτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία από ότι η χρήση τους ως αυξητικών παραγόντων. Με βάση αυτή την αρχή προχώρησε στην απαγόρευση κάποιων αντιβιοτικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνταν ως αυξητικοί παράγοντες. Αρχικά απαγορεύτηκαν ορισμένα φάρμακα, όπως η αβοπαρκίνη (γλυκοπεπτιδίο) το 1996, και τον Ιανουάριο του 1999 ακόμα έξι αντιβιοτικά, δηλαδή η τυλοσίνη και η σπιραμυκίνη (μακρολίδια), η βιργινιαμυκίνη (στρεπτογραμίνη), η βακιτρακίνη (πολυπεπτιδίο) και carbadox και olaquinox (κινόξαλίνες).

Στη συνέχεια όμως επήλθε ολοκληρωτική απαγόρευση της χρήσης των αντιβιοτικών φαρμάκων ως αυξητικών παραγόντων σύμφωνα με τον Κανονισμό 1831/2003 του Ε.Κ. για τις

πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται στην διατροφή των ζώων.

Συγκεκριμένα στο άρθρο 11 σημείο 2 αναφέρεται: «κατά παρέκκλιση του άρθρου 10 και με την επιφύλαξη του άρθρου 13 τα αντιβιοτικά εκτός των κοκκιδιοστατικών και των ιστομοναδικών, μπορούν να διατίθενται στην αγορά και να χρησιμοποιούνται ως πρόσθετες ύλες ζωοτροφών μόνο μέχρι τις 31/12/2005. Από 1/1/2006 αυτές οι ουσίες διαγράφονται από το μητρώο».

Σε αντίθεση με την Ευρωπαϊκή Ένωση, οι Η.Π.Α και άλλες χώρες εκτός Ευρώπης ακολουθούν την «αρχή της απόδειξης» με βάση την οποία διατυπώνεται ότι δεν έχει αποδειχθεί ότι η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα φάρμακα οφείλεται στη χρήση τους ως αυξητικών παραγόντων στα ζώα. Άρα σύμφωνα με την αρχή αυτή θεωρείται ότι δεν απαιτείται καμία ενέργεια και ότι οι ενέργειες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα δεν είναι αιτιολογημένες (Turnidge, 2004).

Στα πλαίσια αυτής της λογικής, κυρίως οι Η.Π.Α και άλλες χώρες εξακολουθούν μέχρι και σήμερα να χρησιμοποιούν τα αντιμικροβιακά φάρμακα ως πρόσθετες ύλες ζωοτροφών για βελτίωση της ανάπτυξης των ζώων και της μετατρεψιμότητας της τροφής.

## **2.2. ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ**

Όπως προαναφέρθηκε, τα αντιβιοτικά αποτελούν ζωτικής σημασίας φάρμακα για τη ζωική παραγωγή, τα οποία δεν μπορούν να αντικατασταθούν προς το παρόν από κάποια άλλα, εναλλακτικά, όπως για παράδειγμα τα εμβόλια, τα προβιοτικά ή τους φάγους (Ungemach, 2006).

Στα πλαίσια της πρόληψης-προφύλαξης καθώς και της θεραπείας-μεταφύλαξης, ανάλογα με το είδος των παραγωγικών ζώων και τις ιδιαιτερότητες αυτών χρησιμοποιούνται διάφορες κατηγορίες φαρμάκων. Στην κτηνιατρική σε γενικές γραμμές τα νοσήματα που απαιτούν πιο εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών φαρμάκων για θεραπεία ή προφύλαξη είναι τα νοσήματα του αναπνευστικού και πεπτικού στα βοοειδή και χοίρους, οι μαστίτιδες στις

γαλακτοπαραγωγές αγελάδες και η κολιβακίλλωση στα πτηνά.

### 2.2.1. ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΧΟΙΡΟΥΣ

Ο σύγχρονος τρόπος διαχείρισης στις χοιροτροφικές μονάδες επιβάλλει τον διαχωρισμό των ζώων σε ομάδες, ανάλογα με την ηλικία, έτσι ώστε τελικά η χορήγηση αντιβιοτικών φαρμάκων να γίνεται σε επίπεδο ομάδας (μαζική χορήγηση). Η ομαδική θεραπεία γίνεται είτε με την προσθήκη του φαρμάκου στην τροφή και είναι περισσότερο αποτελεσματική για τη θεραπεία εντερικών παθήσεων, είτε με την προσθήκη του αντιβιοτικού στο νερό (Prescott et al., 2000).

Η ατομική θεραπεία με ενέσιμες μορφές των φαρμάκων αφορά κυρίως τον αναπαραγωγικό πληθυσμό της εκτροφής, δηλαδή χοιρομητέρες και κάπρους, αλλά και τα γαλουχούμενα χοιρίδια.

Σε κάθε περίπτωση η επιλογή του αντιβιοτικού και της μεθόδου χορήγησης εκτός από τις φαρμακοκινητικές/φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του εξαρτάται:

- ❖ από τη γνώση του τρόπου λειτουργίας της συγκεκριμένης εκτροφής χοίρων,
- ❖ από τη διάθεση και ικανότητα των εκτροφέων να εφαρμόσουν τη συγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή, και
- ❖ από την αποτυχία προηγούμενων θεραπευτικών αγωγών με διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα.

Η προληπτική χορήγηση αντιβιοτικών φαρμάκων αποτελεί συνηθισμένη πρακτική στις εκτροφές χοίρων, ειδικά κατά τις περιόδους εκείνες που τα ζώα υφίστανται έντονο stress το οποίο προδιαθέτει στην εμφάνιση λοιμωδών νοσημάτων λόγω της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος. Τέτοιες περιόδους είναι από τη γέννηση ως τη γαλουχία (αποκοπή ομφάλιου λώρου, κοπή της ουράς, κοπή κυνοδόντων), ο απογαλακτισμός (αλλαγή περιβάλλοντος, αλλαγή διατροφής, ευνουχισμός, ανάμιξη με άλλα ζώα, εμβολιασμοί), η

πάχυνση (συνωστισμός, κακός αερισμός, υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες) (Barragry, 2000). Μεγαλύτερη χρήση φαρμάκων γίνεται στο στάδιο του απογαλακτισμού, ενώ συνήθως στο τελευταίο στάδιο της πάχυνσης δε χρησιμοποιούνται για την αποφυγή ύπαρξης καταλοίπων στο σφάγιο.

Για την πρόληψη και θεραπεία της πνευμονίας (π.χ. ενζωτική πνευμονία, πλευροπνευμονία) που αποτελεί σημαντική νοσολογική οντότητα στους χοίρους, χρησιμοποιούνται διάφορα αντιβιοτικά, όπως κεφτιοφούρη, σουλφοναμίδες, τετρακυκλίνες, τιαμουλίνη, λινκομυκίνη, ενροφλοξακίνη (Mc Ewen και Fedorka-Cray, 2002).

Η βακτηριακής αιτιολογίας εντερίτιδα με κυρίαρχο σύμπτωμα τη διάρροια αποτελεί και αυτή σοβαρό πρόβλημα της συστηματικής χοιροτροφίας, έτσι στην περίπτωση που αιτιολογικός παράγοντας είναι η *E. coli* ή *Clostridium perfringens* αντιμετωπίζεται κυρίως με πενικιλίνες, αμινογλυκοσίδες (απραμυκίνη, γενταμικίνη, νεομυκίνη), τετρακυκλίνες (χλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη), και φθοριοκινολόνες (ενροφλοξακίνη).

Στην δυσεντερία του χοίρου (*Brahyspira hyodysenteriae*) και στην ειλεΐτιδα (*Lawsonia intracellularis*) χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση τους κυρίως λινκομυκίνη, τιαμουλίνη, μακρολίδια, ή τετρακυκλίνες.

Η σαλμονέλωση αποτελεί πρόβλημα, όσον αφορά την αντιμετώπισή της δεδομένης της σημασίας που έχει για τη Δημόσια Υγεία, καθώς και των ανθεκτικών στελεχών του βακτηρίου που έχουν εμφανισθεί, με αποτέλεσμα η επιλογή του κατάλληλου αντιμικροβιακού φαρμάκου να παρουσιάζει μεγάλη δυσκολία. Άλλωστε η χρήση τους στην περίπτωση της σαλμονέλωσης πρέπει να θεωρείται περισσότερο προφυλακτική παρά θεραπευτική (Κρήτας, 2004), ενώ αυτά που θεωρούνται *in vitro* αποτελεσματικά είναι: απραμυκίνη, νεομυκίνη, κεφτιοφούρη, σπεκτινομυκίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφοναμίδη και φθοριοκινολόνες.

## 2.2.2. ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΠΤΗΝΑ

Η συστηματική πτηνοτροφία χαρακτηρίζεται σήμερα από την εκτροφή των

κρεοπαραγωγών ορνίθων (broilers) σε κλειστούς θαλάμους με τεχνητό αερισμό και φωτισμό ομαδικά σε μεγάλους αριθμούς, ενώ κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με τις όρνιθες ωοπαραγωγής που εκτρέφονται συνήθως σε κλωβοστοιχίες.

Τα πτηνά που εκτρέφονται εντατικά εκτίθενται σε μολυσματικούς παράγοντες σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους, αλλά εκδηλώνουν κλινικό νόσημα μόνο όταν υποβληθούν σε στρεστικές καταστάσεις, όπως εμβολιασμός, αυξημένη θερμοκρασία περιβάλλοντος, ανεπαρκής αερισμός, μεταφορά, απότομη αλλαγή σιτηρεσίου.

Σε αυτές τις περιόδους εφαρμόζεται προληπτική χορήγηση αντιβιοτικών φαρμάκων προκειμένου να αποφευχθεί η εκδήλωση κλινικής νόσου, με την προσθήκη τους στην τροφή ή το νερό. Η προσθήκη στην τροφή ενδείκνυται για πιο μακροχρόνια προφύλαξη συγκριτικά με τη χρήση τους στο νερό, όπως πρακτικά συμβαίνει με την προσθήκη αντικοκκιδιακών (Prescott et al., 2000). Στην κατηγορία των αντικοκκιδιακών χρησιμοποιούνται κυρίως τα ιονοφόρα (μονενσίνη, σαλινομυκίνη, λασαλοσίδη).

Επίσης, εγκεκριμένη για κτηνιατρική χρήση είναι και μια σειρά σουλφοναμιδών-τριμεθοπρίμης (σουλφαδιμεραζίνη, σουλφαδιμεθοξίνη, τριμεθοπρίμη- σουλφαδιμεθοξίνη ή τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη). Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται σε περίπτωση κρουσμάτων σποραδικής κοκκιδίωσης, η οποία μπορεί να εμφανιστεί εάν στη ζωοτροφή δεν υπάρχουν κοκκιδιοστατικά, σε περίπτωση ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα ιονοφόρα ή και στην περίπτωση που η χρήση εμβολίου κατά των κοκκιδίων δεν είναι αποτελεσματική (Εκθεση της Επιτροπής στο Συμβούλιο και στο Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο για τη χρήση των κοκκιδιοστατικών και των ιστομοναδικών ως πρόσθετων υλών ζωοτροφών, 2008).

Για θεραπευτική χρήση των αντιβιοτικών φαρμάκων είναι περισσότερο αποτελεσματική η προσθήκη τους στο νερό από την προσθήκη τους στην τροφή. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά είναι: αμοξικιλίνη, νεομυκίνη, τετρακυκλίνες, τυλοσίνη, τιαμουλίνη, ερυθρομυκίνη, και φθοριοκινολόνες. Ειδικά οι φθοριοκινολόνες χρησιμοποιούνται σήμερα σε μεγάλο βαθμό για την αντιμετώπιση διαφόρων μολύνσεων όπως από *E. coli* που αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για την πτηνοτροφία, δεδομένου ότι τα παλαιότερα φάρμακα, όπως οι τετρακυκλίνες, δεν είναι πια αποτελεσματικά λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών.

Επίσης, αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται και στο εκκολαπτήριο, όπου τα αυγά είτε βυθίζονται σε διάλυμα γενταμικίνης ή ενροφλοξακίνης 500 ppm, είτε οι ουσίες εγχέονται με ένεση στον αεροθάλαμο των αυγών προκειμένου να προληφθεί η είσοδος μυκοπλασμάτων ή άλλων μικροοργανισμών, δηλαδή κάθετη μόλυνση των νεοσσών (Prescott et al., 2000).

Επιπλέον σε νεοσσούς μιας ημέρας γίνεται ενέσιμη χορήγηση αντιβιοτικών φαρμάκων, όπως γενταμικίνης ή λινκομυκίνης-σπεκτινομυκίνης προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος ομφαλίτιδας ή δημιουργίας αποστημάτων στο σημείο του εμβολιασμού.

### **2.3. ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ**

Μια σημαντική παράμετρος που διέπει τη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα είναι τα κατάλοιπα που αυτά αφήνουν στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (κρέας, αυγά, γάλα). Ειδικότερα, η κατανάλωση καταλοίπων φαρμάκων μαζί με τα τρόφιμα μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στην εντερική χλωρίδα του ανθρώπου, συμβάλλοντας έτσι στην εμφάνιση του φαινομένου της ανθεκτικότητας με όλες τις δυσμενείς επιπτώσεις για τη Δημόσια Υγεία.

**Κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων** θεωρούνται όλες οι φαρμακολογικά ενεργές ουσίες, τα έκδοχα, τα προϊόντα αποδόμησης τους, καθώς και τα προϊόντα μεταβολισμού τους που παραμένουν στους εδώδιμους ιστούς των ζώων, στα οποία χορηγήθηκε το εν λόγω κτηνιατρικό φάρμακο. Αυτό το πρόβλημα έχει ληφθεί υπόψη και η Ευρωπαϊκή νομοθεσία έχει επαναπροσδιορισθεί προκειμένου να διατίθενται ασφαλή προϊόντα στους καταναλωτές, θεσπίζοντας τον Κανονισμό 2377/90.

Δεδομένου ότι η επιστημονική και τεχνική πρόοδος επιτρέπουν να ανιχνεύεται η παρουσία καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα σε όλο και χαμηλότερες συγκεντρώσεις, για κάθε αντιμικροβιακό φάρμακο που χρησιμοποιείται, πρέπει να καθορίζεται το ανώτατο όριο καταλοίπων (Maximum Residue Level, MRL) πριν χορηγηθεί άδεια κυκλοφορίας του φαρμάκου.



*Ανώτατο όριο καταλοίπων* είναι η μέγιστη συγκέντρωση καταλοίπων που προκύπτει από τη χρήση κτηνιατρικού φαρμάκου (εκφραζόμενη σε mg/kg ή µg/kg με βάση το βάρος του νωπού προϊόντος), η οποία μπορεί να θεωρείται ως νομίμως επιτρεπτή από την Κοινότητα, ή να αναγνωρίζεται ως αποδεκτή εντός ή επί του τροφίμου (Κανονισμός ΕΟΚ αριθ.2377/90 του Συμβουλίου, άρθρο 1), ή η μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στη Δημόσια υγεία.

Με βάση τα ανώτατα όρια καταλοίπων για κάθε φαρμακοτεχνική μορφή των φαρμάκων καθορίζονται οι χρόνοι αναμονής. Ως *χρόνος αναμονής* ορίζεται το διάστημα μεταξύ του χρονικού σημείου της τελευταίας χορήγησης κτηνιατρικού φαρμάκου και του χρονικού σημείου που το ζώο με ασφάλεια μπορεί να οδηγηθεί στο σφαγείο ή να καταναλωθούν με ασφάλεια το γάλα ή τα αυγά (Barragry, 1994).

Μια άλλη σπουδαία παράμετρος που διέπει τη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από παθογόνα και κοινά βακτήρια, τα οποία μπορεί να αποτελέσουν σοβαρό κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία. Για το λόγο αυτό πρέπει η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα να γίνεται σύμφωνα με τους κανόνες της Ορθής Κτηνιατρικής Πρακτικής

## **2.4. ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ**

Στις περισσότερες χώρες, υπάρχει νομική υποχρέωση για τις φαρμακοβιομηχανίες να παρέχουν στοιχεία σχετικά με τις πωλήσεις αντιμικροβιακών φαρμάκων. Ωστόσο είναι πολύ δύσκολο να υπάρξει ακριβής γνώση της ποσότητας των φαρμάκων που πωλούνται στην Ευρώπη. Τέτοια στοιχεία κοινοποιήθηκαν για πρώτη φορά από την Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία για την Υγεία των Ζώων το έτος 1997 (FEDESA, Federation Europeene de la Sanete-European federation for animal health) μετά από αίτηση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, προκειμένου να συγκεντρωθούν οι απαραίτητες πληροφορίες για την πραγματική χρήση των αντιμικροβιακών

φαρμάκων στην Ε.Ε. συμπεριλαμβανομένης της Ελβετίας (Boatman, 1998), ενώ παρόμοια στοιχεία δόθηκαν και το 1999.

Υπολογισμοί κατά προσέγγιση απαιτήθηκαν για κάθε χώρα προκειμένου να υπολογισθεί το συνολικό ποσό των αντιμικροβιακών φαρμάκων που πωλήθηκε, συμπεριλαμβανομένων και των εκτιμήσεων από τις πωλήσεις σε χώρες μη-μέλη της FEDESA (<http://www.fedesa.be/eng/PublicSite/xtra/dossiers/doss9/>).

Η παγκόσμια χρήση των φαρμάκων με σκοπό την εξασφάλιση της υγείας των ζώων το 1996 υπολογίστηκε σε 27.000 τόνους, εκ των οποίων ποσοστό περίπου 25% χρησιμοποιήθηκε στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Το 50% των φαρμάκων που παράγονται στην Ε.Ε. χορηγείται στα ζώα (FEDESA, *The Microbial Threat*, Copenhagen 1998), ενώ σύμφωνα με μια κατ' εκτίμηση κατανομή: το 50% των φαρμάκων χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς, το 25% ως προσθετικές ουσίες ζωοτροφών και το υπόλοιπο 25% για την πρόληψη της κοκκιδίωσης στα πουλερικά και αφορά αποκλειστικά τα ιονοφόρα (Boatman, 1998).

Ενενήντα τοις εκατό (90%) όλων των αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων τόσο εκείνων που χρησιμοποιούνται για την αύξηση της ανάπτυξης, όσο και εκείνων για θεραπεία που παράγονται στον κόσμο για τη χρήση τους στα ζώα, χορηγούνται μέσω της τροφής. Κυρίως, χρησιμοποιείται το 60% στους χοίρους, το 20% στα πουλερικά και κουνέλια, το 18% στα μηρυκαστικά, το 1% στους ιχθείς και το 1% στα κατοικίδια ζώα (Bories και Louisot, 1998).

Στην Ευρώπη το 1997, οι συνολικές πωλήσεις των φαρμάκων ήταν 10.493 τόνοι, από τους οποίους οι 5.400 τόνοι χρησιμοποιήθηκαν στην Ιατρική του ανθρώπου (52%), 3.494 τόνοι χρησιμοποιήθηκαν στη θεραπευτική των ζώων (33%), και 1.599 τόνοι ως αυξητικοί παράγοντες στα ζώα (15%) (Schwarz και Chaslus-Dancila, 2001).

Εκτιμήσεις των πωλήσεων φαρμάκων στην Ευρωπαϊκή Ένωση συμπεριλαμβανομένης και της Ελβετίας δόθηκαν από τη FEDESA για τα έτη 1997 και 1999. Το 1997, 3.494 τόνοι χρησιμοποιήθηκαν για θεραπευτικούς σκοπούς στα ζώα, ποσοστό 80% καταναλώθηκε από παραγωγικά ζώα, ενώ το υπόλοιπο 20% από τα ζώα συντροφιάς. Από την προαναφερόμενη ποσότητα το 66% ήταν τετρακυκλίνες, 12% μακρολίδια, 9% πενικιλίνες και 12% οι υπόλοιπες ομάδες αντιβιοτικών φαρμάκων. Το 1999 η χρήση φαρμάκων για θεραπευτικούς

σκοπούς στα ζώα αυξήθηκε κατά 408 τόνους, δηλαδή έφθασε τους 3.902 τόνους, ενώ στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα η ποσότητα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν ως αυξητικοί παράγοντες στα παραγωγικά ζώα μειώθηκε κατά 51%, έφθασε δηλαδή τους 786 τόνους, εξαιτίας της απαγόρευσης της χρήσης ορισμένων φαρμάκων ως προσθετικά τροφής, απαγόρευση που τελικά ολοκληρώθηκε το 2006.

Μεγάλες διαφορές στα ποσοστά των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ή την αύξηση της ανάπτυξης υπάρχει μεταξύ των διαφορετικών χωρών σε σχέση με τον τύπο ζωικής παραγωγής, είτε αυτή είναι εντατική είτε όχι.

Θα ήταν ενδιαφέρον να αναλυθούν περαιτέρω οι σχέσεις μεταξύ των ποσοτήτων των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κατηγορία εκτρεφόμενων ζώων και του αριθμού των ζώων που παράγονταν ανά χώρα. Για το 1997, αυτή η σύγκριση ήταν δύσκολη δεδομένου ότι τα στοιχεία ζωικής παραγωγής ήταν διαθέσιμα μόνο για το 1996, ενώ τα στοιχεία για τις πωλήσεις φαρμάκων ήταν διαθέσιμα για το έτος 1997. Εντούτοις, η ζωική παραγωγή το 1997 αναμενόταν να είναι παρόμοια με το 1996. Μια άλλη δυσκολία ήταν ότι τα στοιχεία που αφορούσαν τον αριθμό των εκτρεφόμενων ζώων αναφέρονται στα ζώα τα οποία εκτρέφονται στη Ε.Ε. μια δεδομένη χρονική στιγμή, και όχι στο συνολικό αριθμό των ζώων που εκτρέφονται σε ένα έτος.

Αντίθετα, τα στοιχεία παραγωγής (σφαγέντα ζώα, παραγωγή γάλακτος/αυγών) υπολογίζονται σε ετήσια βάση. Επίσης, τα βάρη των σφάγιων διαφέρουν αρκετά στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ανάλογα με τον τύπο παραγωγής και τις προτιμήσεις των καταναλωτών.

Με βάση την ποσότητα του αντιβιοτικού ανά κιλό ζώντος βάρους σφαγέντων ζώων, οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ταξινομούνται σε *τρεις ομάδες*: στην πρώτη ομάδα (>100mg/kg ζώντος βάρους) περιλαμβάνονται το *Ηνωμένο Βασίλειο, η Ελλάδα, η Ισπανία και η Ολλανδία*, στη δεύτερη ομάδα (25-100 mg/kg ζώντος βάρους) περιλαμβάνονται το *Βέλγιο, η Γαλλία, η Ιταλία, η Γερμανία και η Πορτογαλία*, και τέλος στην τρίτη ομάδα (<25 mg/kg ζώντος βάρους) περιλαμβάνονται η *Δανία, η Φινλανδία, η Σουηδία, η Ιρλανδία και η Αυστρία*.

Αυτή η ταξινόμηση απεικονίζει κατά ένα μεγάλο μέρος τον τύπο συστήματος εκτροφής των παραγωγικών ζώων, καθώς επίσης και την ορθολογική ή μη χρήση των φαρμάκων

(Teuber, 2001).

Μια άλλη ανάλυση θα μπορούσε να είναι η σύγκριση της κατανάλωσης αντιβιοτικών φαρμάκων σε επίπεδο Ιατρικής και Κτηνιατρικής. Καθώς όμως αυτή η σύγκριση δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με βάση τον υπολογισμό ανά άτομο ή ζώο και ανά έτος, δεδομένου ότι η διάρκεια ζωής των παραγωγικών ζώων είναι μικρότερη του έτους, συγκρίθηκαν αντ' αυτού οι ποσότητες των φαρμάκων που πωλήθηκαν και η μάζα σώματος (Ungemach, 2000). Η μάζα του σώματος των ζώων υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη τα ζώα που σφάγηκαν και τα ζώα που εκτρέφονται για την παραγωγή γάλατος και αυγών. Έτσι η συνολική μάζα σώματος υπολογίστηκε ότι ήταν 51,5 δισεκατομμύρια τόνοι (6,1 δισεκατομμύρια εκτρεφόμενα ζώα), ενώ η ποσότητα των φαρμάκων που καταναλώθηκε ήταν 54 mg αντιβιοτικού ανά kg ζώου, και υπολογίστηκε με βάση τα στοιχεία της FEDESA .

Όσον αφορά την κατανάλωση φαρμάκων στην Ιατρική, το 1997 ο πληθυσμός της Ευρώπης ήταν 373 εκατομμύρια κατοίκων με ένα μέσο ατομικό βάρος σώματος 60 kg. Σύμφωνα τους Swharz και Chaslus-Dancla πωλήθηκαν 5.400 τόνοι φαρμάκων για θεραπευτική χρήση, οπότε η αντίστοιχη κατανάλωση για τον άνθρωπο ήταν 241 mg ανά kg βάρος σώματος. Ωστόσο για το ίδιο χρονικό διάστημα ο Ungemach και συνεργάτες εκτιμούν ότι η κατανάλωση φαρμάκων από τους Ευρωπαίους ήταν 7.659 τόνοι, επομένως η αντίστοιχη κατανάλωση για τον άνθρωπο ήταν 342 mg ανά kg βάρος σώματος.

Επίσης, πρέπει να τονισθεί ότι η διάρκεια της θεραπείας με αντιβιοτικά στον άνθρωπο είναι μεγαλύτερη από εκείνη στα παραγωγικά ζώα, γεγονός που υποδηλώνει αρκετά μεγαλύτερη κατανάλωση φαρμάκων στους ανθρώπους από ό,τι στα ζώα.

## **2.5. ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

### **2.5.1.ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ(CHLORAMPHENICOL)**

Είναι αντιβιοτικό με απλό χημικό τύπο, ευρύτατο αντιμικροβιακό φάσμα και άριστες

φαρμακοκινητικές ιδιότητες, γεγονός που το καθιστά αναντικατάστατο αντιμικροβιακό ευρέος φάσματος κυρίως στις περιπτώσεις που επιζητείται καλή διαπερατότητα μέσω δυσδιαπέρατων βιολογικών φραγμών, όπως ο αιματοεγκεφαλικός, ο πλακούντας και ο φραγμός αίμα-μαστός.

Η αποδεδειγμένη όμως τοξικότητα της στον άνθρωπο περιορίζει τη χρήση της στα παραγωγικά ζώα. Έτσι ανακαλύφθηκαν πρόσφατα παράγωγα της (Thiamfenicol και Florfenicol) που είναι ασφαλείς, αλλά με μικρότερο αντιμικροβιακό φάσμα. Έχει πικρή γεύση και γι' αυτό για την χορήγηση της από το στόμα χρησιμοποιείται το ουδέτερο παλμιτικό της άλας, ενώ ως ενέσιμη χρησιμοποιείται το υδατοδιαλυτό σουκινιλονατριούχο άλας (chloramphenicol sodium succinate.).

#### *Απορρόφηση-κατανομή*

Ως λιπόφιλη ουσία δεν ιονίζεται εύκολα, γι' αυτό περνά πολύ εύκολα τις βιολογικές μεμβράνες και κατανέμεται σε ψηλά επίπεδα σε όλους τους ιστούς και τα υγρά του σώματος. Διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και ανιχνεύεται σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Οι συγκεντρώσεις στο αίμα του εμβρύου φτάνουν το 75% των συγκεντρώσεων στο αίμα της μητέρας. Οι συγκεντρώσεις της στο γάλα ανέρχονται στο 50% των συγκεντρώσεων στο πλάσμα, παρ' όλο που σε περιπτώσεις μαστίτιδας είναι ακόμη πιο ψηλές.

#### *Βιομετατροπή - απέκκριση*

Βιομετατρέπεται εύκολα στο ήπαρ σε γλυκουρονιδάση. Σε τυχόν έλλειψη του ενζύμου γλυκουρονική μεταφοράση, όπως συμβαίνει σε νεογέννητα ή νεαρά ζώα, στα οποία το ενζυμικό σύστημα δεν είναι πλήρως αναπτυγμένο, σε περιπτώσεις παρατεταμένης χορήγησης παρατηρούνται φαινόμενα τοξικότητας εξ' αιτίας της συσσώρευσης του φαρμάκου. Απεκκρίνεται αδρανοποιημένη με τα ούρα. Μόνο το 5-15% απεκκρίνεται με την χολή (εντεροηπατική κυκλοφορία δηλαδή επαναπορρόφηση της από το έντερο στην γενική κυκλοφορία γεγονός που παρατείνει τις συγκεντρώσεις της στο αίμα).

### Τοξικότητα – Ανεπιθύμητες Ενέργειες

Παρατεταμένη χορήγηση της μπορεί να προκαλέσει ανωμαλίες στο ουροποιητικό σύστημα και αντιδράσεις υπεραισθησίας. Όταν χορηγηθεί από το στόμα μπορεί να προκληθούν γαστρεντερικές διαταραχές (εμετός, διάρροια). Στον άνθρωπο προκαλεί καταστολή του μυελού (bone marrow suppression) των οστών, πράγμα που οδηγεί σε απλαστική αναιμία.

Οι τοξικές παρενέργειες έχουν άμεση σχέση με τον τρόπο δράσης της, που είναι η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Η δράση αυτή δεν περιορίζεται μόνο στο μικροβιακό κύτταρο αλλά επεκτείνεται και στα κύτταρα των θηλαστικών που βρίσκονται σε φάση έντονου πολλαπλασιασμού.

### Φαρμακοδυναμικές Ιδιότητες

Είναι αντιμικροβιακό με ευρύτατο φάσμα δράσης. Έχει μικροβιοστατικές και σε υψηλές δόσεις μικροβιοκτόνες ιδιότητες τόσο έναντι των Gram θετικών, όσο και των αρνητικών καθώς επίσης και έναντι των γλαμυδίων και μερικών ιών.

Αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση με τη σύνδεση της στη θέση της υπομονάδας 50S του ριβοσώματος των ευαίσθητων βακτηρίων. Οι υψηλές συγκεντρώσεις στο κυτταρόπλασμα την καθιστούν ως αντιμικροβιακό επιλογής έναντι των ενδοκυτταρικών ρικέτσιων και βρουκελλών.

Το φάσμα δράσης της περιλαμβάνει τους εξής παθογόνους μικροοργανισμούς: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brucella*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*.

Έτσι παρά τις σοβαρές τοξικές παρενέργειες, που μπορεί να αποφευχθούν αν η θεραπεία δεν ξεπερνάει τις 5-7 ημέρες και οι δόσεις δεν ξεπερνούν τις συνιστώμενες, αποτελεί χάρη στην καλή φαρμακοκινητική της και κατανομή της στους ιστούς ένα πολύ καλό

αντιμικροβιακό για την αντιμετώπιση τόσο γενικευμένων, όσο και τοπικών λοιμώξεων. Ιδιαίτερα δραστική είναι στην αντιμετώπιση των σαλμονελλώσεων διαφόρων ζώων, στην θεραπεία αναπνευστικών λοιμώξεων, της μηνιγγοεγκεφαλίτιδας, δερματικών λοιμώξεων και έσω και έξω ωτίτιδας.

#### *Αλληλεπιδράσεις*

Δεν πρέπει να συνδυάζεται με πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και αμινογλυκοσίδες γιατί παρατηρείται ανταγωνισμός της μικροβιοκτόνου δράσης της. Σε ταυτόχρονη χορήγηση της με ιόντα σιδήρου, φολικό οξύ ή βιταμίνη Β12 επιβραδύνεται η δράση τους. Το υδατικό της διάλυμα Chloramphenicol sodium selenite δεν θα πρέπει να αναμιγνύεται με άλλα φαρμακώχα διαλύματα.

Δεν πρέπει να χορηγείται σε ζώα με ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια. Επίσης δεν πρέπει να χορηγείται σε παραγωγικά ζώα (Ε.Ο.Φ. 1430/13-7-1994).

### **2.5.2.ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ**

Η αμπικιλλίνη είναι ημισυνθετική πενικιλλίνη ευρέος φάσματος ευαίσθητη στις β-λακταμάσες. Χρησιμοποιείται ως άνυδρη ή με τη μορφή νατριούχου και τριϋδρικού άλατος. Το νατριούχο άλας της αμπικιλλίνης χρησιμοποιείται παρεντερικά λόγω της υψηλής διαλυτότητας του. Το έτοιμο διάλυμα ωστόσο είναι ασταθές και για το λόγο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την προετοιμασία του.

Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα και για να εξασφαλιστούν παρατεταμένες συγκεντρώσεις στους ιστούς, χρησιμοποιείται το έτοιμο ελαιούχο εναιώρημα της τριϋδρικής αμπικιλλίνης.

#### *Φαρμακοκινητική*

Απορροφάται από το γαστρεντερικό σωλήνα (30-55% στα μονογαστρικά). Η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος επιτυγχάνεται μετά από 2 ώρες περίπου. Όταν χορηγείται με τη μορφή της τριωδικής αμπικιλίνης, υποδόρια ή ενδομυϊκά η μέγιστη συγκέντρωση επιτυγχάνεται μετά από 30 λεπτά περίπου.

### *Κατανομή*

Κατανέμεται στους ιστούς και στα υγρά του σώματος με ιδιαίτερα ψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ και στους νεφρούς. Δύσκολα περνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και η συγκέντρωσή της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι μικρή. Ένα μέρος συνδέεται με πρωτεΐνες του πλάσματος του αίματος (20% περίπου). Μεταβολίζεται και αποβάλλεται κυρίως με τα ούρα (40-50% σε 6 ώρες). Στα βοοειδή η αμπικιλίνη απορροφάται στα πρώτα τμήματα του λεπτού εντέρου και απεκκρίνεται σε μεγάλο βαθμό με τη χολή. Η συγκέντρωσή της στη χολή μπορεί να είναι μέχρι 4 φορές μεγαλύτερη από εκείνη στο πλάσμα του αίματος. Η ημιπερίοδος ζωής στα ιπποειδή, βοοειδή και στο χοίρο είναι περίπου 1 ώρα, ενώ στο σκύλο και τη γάτα 45-80 λεπτά.

### *Βιομετατροπή - Απέκκριση*

Η αμπικιλίνη παρουσιάζει το φαινόμενο της εντεροηπατικής κυκλοφορίας. Δηλαδή μετά την απορρόφηση της και την ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωσή της στη χολή επανεκκρίνεται στον εντερικό σωλήνα σε ενεργό μορφή. Αυτό θεωρείται κλινικά σημαντικό, γιατί την καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλη για αντιμετώπιση γαστρεντερικών λοιμώξεων και λοιμώξεων της χοληδόχου κύστης. Ωστόσο κάτι τέτοιο προκαλεί προβλήματα σε ζώα με διαταραχές της μικροβιακής χλωρίδας, όπως κουνέλια, ινδόχοιρους στα οποία η χρήση της αντενδείκνυται.

Επίσης όταν χορηγείται από το στόμα, μπορεί να προκαλέσει καταστροφή της φυσιολογικής μικροχλωρίδας και γαστρεντερικές διαταραχές.

### *Αντιμικροβιακό Φάσμα*



Είναι δραστική κατά των Gram θετικών (*Actinomyces* spp., *Bacillus anthracis*, *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp.) και Gram αρνητικών (*Bacteroides* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella* spp., *Escherichia coli*, *Haemophilus* spp., *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp.) καθώς επίσης και κατά των *Leprosppira* spp.

#### *Διασταυρούμενη Αντοχή*

Μεταξύ της αμπικιλίνης και αμοξικιλίνης υπάρχει διασταυρούμενη αντοχή. Συνδυάζεται επίσης με πενικιλίνες ανθεκτικές στις β-λακταμάσες, όπως κλοξακιλλίνη και δικλοξακιλλίνη, καθώς επίσης και με αμινογλυκοσίδες. Δεν πρέπει να συνδυάζεται με σουλφοναμίδες, ερυθρομυκίνη, δοξκυκλίνη, ριφαμπικίνες και χλωραμφανικόλη.

ΙΠΠΟΕΙΔΗ: Χορηγείται για λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, εντερίτιδας, μητρίτιδας και της σηψαιμίας των νεογέννητων και νεαρών πώλων.

ΒΟΟΕΙΔΗ και ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΑ: Χορηγείται κατά της πνευμονίας, εντερίτιδας, πυελονεφρίτιδας, μητρίτιδας, μαστίτιδας και της σηψαιμίας.

ΧΟΙΡΟΙ: Χορηγείται κατά της πνευμονίας, εντερίτιδας, πυελονεφρίτιδας, μητρίτιδας, μαστίτιδας και της σηψαιμίας και της ερυθράς.

### **2.5.3. NEOMYKINH (Framycetin ή neomycin B)**

Η νεομυκίνη βρέθηκε στον *Streptomyces fradiae*. Είναι μίγμα δύο ισομερών, της νεομυκίνης Β και της νεομυκίνης C.

#### *Φαρμακοκινητική*

Απορροφάται σε πολύ μικρό βαθμό από το γαστρεντερικό σωλήνα (3% περίπου) και

αποβάλλεται σε αυτούσια μορφή κυρίως με τα κόπρανα. Όταν χορηγείται ενδομυϊκά απορροφάται γρήγορα. Η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος επιτυγχάνεται μετά από μία ώρα περίπου. Αποβάλλεται κυρίως με τα ούρα.

#### *Αντιμικροβιακό Φάσμα*

Η νεομυκίνη είναι δραστική κατά των βακτηρίων Gram θετικών (*Staphylococcus aureus*) Gram αρνητικών (*Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*) καθώς επίσης και κατά της *Entamoeba histolytica*.

#### *Διασταυρούμενη Αντοχή*

Υπάρχει διασταυρούμενη αντοχή με τη στρεπτομυκίνη και την καναμυκίνη.

#### *Χορήγηση*

Χορηγείται από το στόμα για την αντιμετώπιση γαστρεντερικών λοιμώξεων. Επίσης χορηγείται ενδομυϊκά για λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος καθώς επίσης και κατά της μητρίτιδας, μαστίτιδας σε συνδυασμό με τοπική θεραπεία.

Η παρεντερική της χορήγηση είναι πολύ περιορισμένη λόγω των σοβαρών νεφροτοξικών και ωτοτοξικών παρενεργειών που προκαλεί. Στα ζώα αναφυλής χορηγείται για την αντιμετώπιση της έξω ωτίτιδας και δερματίτιδων.

#### *Αντενδείξεις*

Δεν πρέπει να χορηγείται σε ζώα με ιστορικό υπεραισθησίας και σε ζώα με νεφρική ανεπάρκεια.

#### *Ανεπιθύμητες Ενέργειες*

Παρόμοιες με εκείνες της στρεπτομυκίνης.

#### 2.5.4. GENTAMΙΚΙΝΗ (GENTAMICIN)

Η γενταμικίνη απομονώθηκε το 1963 από το *Micromonospora purpurea*. Είναι μίγμα τριών ουσιών, της γενταμικίνης C1, C3A και C2. Επίσης μπορεί να περιέχει γενταμικίνη C2A και C2B.

##### Φαρμακοκινητική

Η γενταμικίνη, όπως και οι άλλες αμινογλυκοσίδες, απορροφάται σε πολύ μικρό βαθμό από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Απορροφάται εύκολα μετά από υποδόρια ή ενδομυϊκή έγχυση (>90%). Χορηγείται αποκλειστικά παρεντερικά για αντιμετώπιση συστηματικών λοιμώξεων που οφείλονται κυρίως σε Gram αρνητικά βακτήρια. Χορηγείται επίσης ενδοφθαλμικά για την αντιμετώπιση οφθαλμικών λοιμώξεων που προκαλούνται από *Pseudomonas aeruginosa*.

Περνά εύκολα τον φραγμό του πλακούντα προκαλώντας σοβαρά νεφροτοξικά φαινόμενα στο έμβρυο. Η χρήση της παρ' όλα αυτά κατά την διάρκεια της κύησης αντενδείκνυται. Αποβάλλεται κυρίως με τα ούρα. Η ημιπερίοδος ζωής είναι από μισή έως 3,2 ώρες ανάλογα με το είδος του ζώου.:

##### Αντιμικροβιακό Φάσμα

Είναι δραστική έναντι των Gram θετικών βακτηρίων (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.), καθώς επίσης και κατά των *Mycoplasma* spp.

### *Διασταυρούμενη Αντοχή*

Δεν πρέπει να συνδυάζεται με άλλες αμινογλυκοσίδες (διασταυρούμενη αντοχή), κεφαλοσπορίνες, τετρακυκλίνες, ερυθρομυκίνη, μνοχαλαρωτικά και γενικά αναισθητικά, καθώς επίσης και διουρητικά που δρουν στην αγκύλη του σπειράματος (φουροσεμίδα).

### *Ενδείξεις*

Χορηγείται στα ιπποειδή και στα νεαρά μηρυκαστικά για την αντιμετώπιση λοιμώξεων του αναπνευστικού και πεπτικού συστήματος, καθώς επίσης και κατά της αρθρίτιδας. Στον χοίρο κατά των λοιμώξεων του αναπνευστικού, πεπτικού και του ουροποιητικού συστήματος. Στον σκύλο και στη γάτα κατά των λοιμώξεων του αναπνευστικού, ουροποιητικού και του γεννητικού συστήματος, καθώς επίσης και σε περιπτώσεις αρθρίτιδας και ωτίτιδας.

### *Αντενδείξεις*

Δεν πρέπει να χορηγείται σε ζώα με αντιδράσεις υπεραισθησίας, σε ζώα με νεφρική ανεπάρκεια και κατά την περίοδο της κνοφορίας.

### *Ανεπιθύμητες Ενέργειες*

Από τη χρήση μπορεί να προκληθούν αντιδράσεις υπεραισθησίας, βλάβη των νεφρών, μείωση της ακοής έως και κώφωση, αύξηση των τρανσαμινάσεων και της αλκαλικής φωσφατάσης, καθώς επίσης και νευρομυϊκή καταστολή.

## **2.5.5. ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ**

Είναι συνθετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες με μικροβιοκτόνο δράση. Η πρώτη

κινολόνη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1964. Πρόκειται για το ναλιδιξικό οξύ που αποτέλεσε την βάση σύνθεσης μιας σειράς νέων αντιμικροβιακών ουσιών με παραπλήσια χημική δομή αλλά και σημαντικά καλύτερες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες. Σήμερα ταξινομούνται με βάση τον χρόνο εμφάνισης τους και τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες σε δύο γενιές, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

<b>ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ Α' ΓΕΝΕΑΣ</b>	<b>ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ Β' ΓΕΝΕΑΣ</b>
Δραστικές έναντι Gram αρνητικών. Εξαιρεση αποτελεί το Οξολινικό οξύ που δρά κατά των Σταφυλοκοκκων.	Διαθέτουν ευρύ φάσμα που συμπεριλαμβάνει κατά Gram αρνητικά και θετικά βακτήρια, ψευδομονάδα και μυκοπλάσματα.
Nalidixic acid Flumequine Oxolinic acid	Enrofloxacin Danofloxacin Norfloxacin Ofloxacin Temafoxacin Feroxacin Amifloxacin Enoxacin Lemofloxacin Pefloxacin Spafloxacin Tosufloxacin

*Φαρμακοκινητικές Ιδιότητες*

Οι λιπόφιλες ιδιότητες εξασφαλίζουν στις κινολόνες πολύ καλή απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Ο όγκος κατανομής (Vd) των κινολόνων πρώτης γενιάς θεωρείται μέτριος, σε αντίθεση με τις κινολόνες δεύτερης γενιάς, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλο όγκο κατανομής.

Το ναλιδιξικό οξύ μεταβολίζεται σε ενεργό υδροξυναλιδιξικό οξύ και αποβάλλεται κυρίως με τα ούρα. Μέρος του ναλιδιξικού οξέος μεταβολίζεται στο ήπαρ και αποβάλλεται ως αδρανής μεταβολίτης. Ο βαθμός πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι πολύ υψηλός (93-97%). Οι κινολόνες τελευταίας γενιάς παρουσιάζουν μικρότερο βαθμό μεταβολισμού.

### *Φαρμακοδυναμικές Ιδιότητες*

Οι κινολόνες δρουν ως αναστολείς της σύνθεσης του DNA. Συγκεκριμένα αναστέλλουν τη δράση του μικροβιακού ενζύμου DNA-γυράση, το οποίο είναι απαραίτητο στη διαδικασία αναδιπλασιασμού του DNA. Η δράση των κινολόνων είναι μικροβιοκτόνος. Ο θάνατος των βακτηρίων επέρχεται μέσα σε 30 λεπτά, μετά την επαφή τους με την απαιτούμενη συγκέντρωση των κινολονών. Η Ελάχιστη Συγκέντρωση Ανάσχεσης (MIC) των φθοριοκινολόνων είναι πολύ χαμηλή συγκριτικά με των υπόλοιπων αντιμικροβιακών.

Είναι χαρακτηριστικό ότι μετά την πτώση της συγκέντρωσης των κινολονών κάτω του MIC παρατηρείται υπολειμματική μικροβιοκτόνος δράση έναντι μερικών βακτηρίων όπως *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, που διαρκεί 4-8 ώρες.

Αντίθετα η αύξηση της συγκέντρωσης των κινολόνων (κυρίως αυτών της πρώτης γενιάς) πάνω από τα θεραπευτικά όρια (0,1-10μg / ml) μειώνει αισθητά τη μικροβιοκτόνο δράση τους έναντι των ευαίσθητων σε αυτές βακτηρίων.

Η αλόγιστη χρήση των κινολόνων στην κτηνιατρική προκαλεί την ανάπτυξη των ανθεκτικών στελεχών. Το φαινόμενο αυτό, που οφείλεται στην τροποποίηση του ενζύμου DNA-γυράση, είναι ιδιαίτερα συχνό στην περίπτωση κινολονών πρώτης γενιάς. Πρέπει να τονιστεί ότι παρατηρείται διασταυρούμενη αντοχή μεταξύ των κινολονών. Αυτός είναι ο κυριότερος λόγος για την διστακτικότητα του FDA να προτείνει την έγκριση και χρήση των νεώτερων φθοριοκινολονών στην κτηνιατρική.

Οι κινολόνες δεν πρέπει να συνδυάζονται με τετρακυκλίνες και με το συνδυασμό σουλφοναμίδη-τριμεθοπρίμη και τα νιροφουράνια. Οι σημαντικότερες κινολόνες στην κτηνιατρική είναι: η ενροφλοξασίνη, το οξολινικό οξύ και η φλουμεκίνη.

## **2.6. ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ**

Η ταυτόχρονη χορήγηση δύο ή περισσότερων αντιβιοτικών αποτελεί ένα πολύπλοκο πρόβλημα, το οποίο πρέπει να αντιμετωπίζεται με ιδιαίτερη προσοχή. Η ανάγκη συνδυασμού δύο ή περισσότερων αντιβιοτικών πηγάζει από τις εξής σκοπιμότητες :

- Την αντιμετώπιση μικτών λοιμώξεων, όπου όλοι οι λοιμογόνοι παράγοντες δεν είναι ευαίσθητοι σε ένα μεμονωμένο αντιμικροβιακό.
- Την επίτευξη δυναμικής συνεργικής δράσης για την αντιμετώπιση ιδιαίτερα ανθεκτικών στελεχών (π.χ. ο συνδυασμός τριμεθοπρίμης-σουλφοναμίδων.)
- Την πρόληψη εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών (π.χ. ο συνδυασμός αμοξικιλίνης-κλαβουλανικού οξέος.)
- Την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας εμφάνισης τοξικών παρενεργειών μέσω της μείωσης της δόσης των συστατικών του συνδυασμού.

### **2.6.1. ΚΑΝΟΝΕΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ**

Δεν υπάρχει γενικός κανόνας συνδυασμού αντιβιοτικών. Υπάρχουν ωστόσο σημαντικές κλινικές παρατηρήσεις που εντοπίζουν τόσο τους επιθυμητούς συνδυασμούς (δυναμική συνεργιστική αλληλεπίδραση), όσο και τους ανεπιθύμητους συνδυασμούς, οι οποίοι καταλήγουν σε εξουδετέρωση της φαρμακολογικής δράσης ή ακόμη προκαλούν σοβαρές τοξικές παρενέργειες.

Με βάση την κατάταξη των αντιβιοτικών σε βακτηριοστατικά και βακτηριοκτόνα θα μπορούσαν να διατυπωθούν οι παρακάτω γενικές αρχές συνδυασμών τους:

- Μπορεί να γίνει συνδυασμός μεταξύ αντιβιοτικών που ανήκουν στην ίδια ομάδα, βακτηριοστατικών με βακτηριοστατικά ή βακτηριοκτόνα με βακτηριοκτόνα.
- Όταν συνδυάζονται βακτηριοκτόνα μεταξύ τους, μπορούμε να περιμένουμε αθροιστική δράση ή στην χειρότερη περίπτωση, ουδέτερη δράση αλλά ποτέ δεν παρατηρείται ασυμβατότητα.
- Όταν συνδυάζονται βακτηριοστατικά αντιβιοτικά μεταξύ τους, μπορεί να παρατηρηθεί αθροιστική ή ουδέτερη δράση αλλά ποτέ ανταγωνιστική.

Γενικά θεωρείται ότι η δραστηριότητα των βακτηριοκτόνων μειώνεται αισθητά από την ταυτόχρονη χρήση τους με βακτηριοστατικά. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι τα βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά για να εκδηλώσουν την δράση τους χρειάζονται βακτηριακά κύτταρα που βρίσκονται σε έντονη φάση πολλαπλασιασμού και πρωτεϊνοσύνθεσης τη στιγμή που είναι γνωστό ότι τα βακτηριοστατικά αναστέλλουν τις δύο αυτές μικροβιακές φάσεις.

Έτσι λοιπόν είναι γνωστό ότι τα βακτηριοστατικά αντιμικροβιακά όπως: τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη και μακρολίδια, των οποίων ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού κυττάρου, ανταγωνίζονται την δράση των πενικιλινών και των αμινογλυκοσίδων, των οποίων ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού τοιχώματος και της ριβοσωμιακής πρωτεϊνοσύνθεσης.

Παρ' όλα αυτά έχουν παρατηρηθεί και κάποιες εξαιρέσεις όπως: η χλωραμφαινικόλη (βακτηριοστατική) εμποδίζει την παραγωγή των αδρανοποιητικών ενζύμων β-λακταμάσες τα οποία παράγονται από μερικούς μικροοργανισμούς και εξουδετερώνουν τη δράση των πενικιλινών. Έτσι, η χλωραμφαινικόλη ενισχύει τη δράση των πενικιλινών όταν συνδυάζεται μαζί τους.

## 2.6.2. ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στις περιπτώσεις όπου ο συνδυασμός αντιμικροβιακών μεταξύ τους ή με άλλες ουσίες προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί



να εκδηλωθούν με μορφή ελαφρών ή σοβαρών τοξικών φαινομένων.

<b>ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΑΠΟ ΜΕΡΙΚΟΥΣ ΑΣΥΜΒΑΤΟΥΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ</b>	
ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ + ΦΟΥΡΟΣΕΜΙΔΗ	Αύξηση νεφροτοξικότητας και ωτοτοξικότητας Νευρομυϊκός αποκλεισμός
ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ + ΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΑ Ή ΑΝΤΙΠΥΡΕΤΙΚΑ	Παράταση της δράσης των συνδυαζόμενων φαρμάκων
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ + ΜΥΟΧΑΛΑΡΩΤΙΚΑ	Νευρομυϊκός αποκλεισμός

### 2.6.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα αντιβιοτικά είναι αντιβακτηριακά φάρμακα που παρεμβάλλονται σε δομές ή λειτουργίες απαραίτητες για την επιβίωση ή ανάπτυξη των βακτηρίων χωρίς όμως να βλάπτουν τον ξενιστή. Αρχικά για την αντιμετώπιση της παθογόνου δράσης των βακτηρίων είχαν χρησιμοποιηθεί απολυμαντικά βασισμένα σε μεταλλικά στοιχεία (κυρίως υδράργυρο) καθώς και απολυμαντικά που περιείχαν φαινόλη ή παράγωγα της. Η αποτελεσματικότητά τους όμως ήταν πολύ περιορισμένη.

Το 1928 ο Αλέξανδρος Φλέμινγκ ανακαλύπτει την πενικιλίνη και από τότε και έως το 1970 ένα πλήθος ουσιών ανακαλύπτονται και ονομάζονται «αντιβιοτικά.» Τα πιο πολλά είναι φυσικές ουσίες που παράγονται από μύκητες ή άλλους μικροοργανισμούς. (φυσικά αντιβιοτικά). Πέρα όμως από αυτά πολλά έχουν σχεδιαστεί και παραχθεί από ερευνητές των φαρμακευτικών εταιρειών (συνθετικά αντιβιοτικά). Μάλιστα τα τελευταία χρόνια πολλά αποτελούν χημικές παραλλαγές των παλαιότερων αντιβιοτικών.

Σήμερα, περισσότερες από 150 ουσίες είναι γνωστές για την αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή ή αντιϊική τους δράση. Παράλληλα όμως και τα μικρόβια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντοχής στη δράση αυτών των μικροβιακών ουσιών με αποτέλεσμα τα υπάρχοντα αντιβιοτικά να μην είναι αποτελεσματικά στα ανθεκτικά παθογόνα στελέχη.

### 3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

#### 3.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ένα βακτήριο παρουσιάζεται ανθεκτικό σε ένα αντιμικροβιακό φάρμακο όταν η συγκέντρωση του αντιμικροβιακού φαρμάκου στην εστία της λοίμωξης δεν είναι αρκετά υψηλή ώστε είτε να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου, είτε και να προκαλέσει τη θανάτωσή του (Schwarz και Chaslus-Dancla, 2001).

Αυτός ο ορισμός δείχνει ότι η ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα δεν αφορά μόνο το μικροοργανισμό, αλλά περιλαμβάνει φαρμακοδυναμικές-φαρμακοκινητικές και κλινικές πτυχές. Η αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα ή αντοχή είναι μια ιδιαίτερα ευμετάβλητη ικανότητα των βακτηρίων, η οποία εξαρτάται τόσο από το αντιμικροβιακό φάρμακο, όσο και από το βακτήριο και τον τρόπο απόκτησης ή μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας. Έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα βακτήρια. Σε ότι αφορά την αντοχή στα αντιμικροβιακά φάρμακα, τα βακτήρια μπορεί να εμφανίζουν ευαισθησία, εγγενή ή επίκτητη ανθεκτικότητα.

Η *εγγενής αντοχή* είναι ένα φυσικό φαινόμενο, το οποίο εκδηλώνεται από τα μέλη όλων των ειδών των βακτηρίων και αποτελεί λειτουργία της φυσιολογικής ή βιοχημικής τους σύνθεσης. Η *εγγενής αντοχή* χαρακτηρίζεται από την έλλειψη υποδοχέων ή την ύπαρξη μη προσβάσιμων υποδοχέων στα αντιμικροβιακά φάρμακα (Aleksium και Levy, 2000; Bennett, 1995). Για παράδειγμα τα μέλη των *Enterococcus* spp. παρουσιάζουν εγγενή ανθεκτικότητα στις κεφαλοσπορίνες εξαιτίας της μειωμένης ικανότητας σύνδεσης με τις πρωτεΐνες σύνδεσης των πενικιλινών (PBPs-Penicillin Binding Proteins) (Williamson, et al., 1985).

Η *εγγενής αντοχή* δεν αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά φάρμακα τόσο στην Ιατρική του ανθρώπου, όσο και των ζώων κατά συνέπεια δεν παρουσιάζει ιδιαίτερο κλινικό ή επιδημιολογικό ενδιαφέρον.

Η *επίκτητη αντοχή*, η οποία παρουσιάζει ενδιαφέρον στην κλινική πράξη αποτελεί μια

ειδική ικανότητα του βακτηριακού στελέχους και οφείλεται είτε στις μεταλλάξεις ορισμένων χρωμοσωμικών γονιδίων «housekeeping genes<sup>7</sup>» που ενεργούν ως στόχοι για τα αντιμικροβιακά φάρμακα, είτε στην απόκτηση κινητών γενετικών στοιχείων που φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας.

Υπάρχουν τρεις σημαντικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα:

1. η ενζυματική αδρανοποίηση,
2. η μειωμένη ενδοκυτταρική συσσώρευση των αντιμικροβιακών φαρμάκων και
3. η *τροποποίηση των κυτταρικών υποδοχέων στόχων* (Alekshtum και Levy, 2000; Quintiliani et al., 1999; Schwarz και Noble, 1999).

### **3.1.1. ENZYMATΙΚΗ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ**

Γίνεται με δύο τρόπους: είτε με την ενζυματική τροποποίηση των αντιβιοτικών φαρμάκων είτε με την ενζυματική υδρόλυση τους.

Στην πρώτη κατηγορία τα ένζυμα προσθέτουν ακετυλικές, αδενολικές ή φωσφορικές ομάδες σε συγκεκριμένες περιοχές των αντιβιοτικών, με αποτέλεσμα αυτά να χάνουν την αντιμικροβιακή δράση τους. Ο σπουδαιότερος μηχανισμός ενζυματικής τροποποίησης των αντιμικροβιακών φαρμάκων είναι η ακετυλίωση (Wright, 2005).

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν ένζυμα που προκαλούν υδρόλυση του μορίου του αντιβιοτικού, με αποτέλεσμα αυτό να χάνει την δράση του. Στα ένζυμα αυτά ανήκουν οι β-λακταμάσες (που προκαλούν την υδρόλυση της αμινοομάδας του λακταμικού δακτυλίου των β-λακταμών), οι υδρολάσες και οι εστεράσες.

Έχει βρεθεί ότι μια παραλλαγή της ακετυλοτρανσφεράσης των αμινογλυκοσιδών (AAC6Ib) που κωδικοποιείται από ένα πλασμίδιο, προκαλεί και την ακετυλίωση των φθοριοκινολονών με αποτέλεσμα να μειώνεται η δραστηριότητά τους (Robicsek et al., 2006). Αυτό το πλασμίδιο φαίνεται ότι λειτουργεί επίσης ως παράγοντας επιλογής για πολλαπλή ανθεκτικότητα.

### 3.1.2. ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Γίνεται με δύο διαφορετικούς τρόπους: τη μειωμένη είσοδο ή την αυξημένη απέκκριση των φαρμάκων.

Η μειωμένη είσοδος των αντιμικροβιακών φαρμάκων συνήθως δεν οφείλεται στην ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας. Η εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων αποτελεί φραγμό για ορισμένα αντιβιοτικά (Salyers και Whitt, 1994). Είναι γνωστό ότι διάφορες μεταλλάξεις γονιδίων προκαλούν μειωμένη σύνθεση, δομική αλλαγή ή ακόμα και απώλεια πορινών Omp, μέσα από τις οποίες τα αντιμικροβιακά φάρμακα εισέρχονται στο βακτηριακό κύτταρο (Quintiliani et al., 1999).

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (Outer membrane proteins, Omps) σχηματίζουν κανάλια εισόδου μορίων (πορίνες) από τις οποίες διέρχονται και τα αντιμικροβιακά φάρμακα. Η διέλευση των ουσιών αυτών από τις πορίνες εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους.

Έχει βρεθεί ότι στην *E. coli* υπάρχουν πορίνες που συμβολίζονται ως OmpF, OmpC, και OmpE. Απώλεια της λειτουργίας σε μια από αυτές τις πορίνες, εξαιτίας μετάλλαξης, μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά. Ειδικότερα η πορίνη OmpF είναι το κύριο κανάλι της *E. coli* διαμέσου, του οποίου διέρχονται πολλά μόρια και η τροποποίηση αυτής της πορίνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ευαισθησία σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα (Goodtz, 2006). Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα.

Η ενεργητική μεταφορά ή ενεργητική απέκκριση (*active efflux*) μέσω μιας πρωτεΐνης (ειδικού μεταφορέα) ενός αντιμικροβιακού φαρμάκου έξω από το βακτηριακό κύτταρο, είναι ένας ενεργοεξαρτώμενος μηχανισμός τον οποίο διαθέτουν τα βακτήρια, προκειμένου να μειώσουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Οι αντλίες της ενεργητικής

απέκκρισης (active efflux pumps) εντοπίζονται τόσο στα ευαίσθητα, όσο και στα ανθεκτικά βακτήρια (Piddock, 2006).

Στα Gram-αρνητικά βακτήρια οι αντλίες της ενεργητικής απέκκρισης κωδικοποιούνται χρωμοσωμικά. Τα περισσότερα βακτηριακά στελέχη φέρουν γενετικούς καθοριστές για πολλές αντλίες, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα επίπεδο εγγενούς αντοχής για πολλά αντιβιοτικά.

Μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά γονίδια είναι υπεύθυνες για αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών απέκκρισης, ή για αντικαταστάσεις των αμινοξέων τους, με τελικό αποτέλεσμα η πρωτεΐνη απέκκρισης να γίνεται περισσότερο αποτελεσματική στην απομάκρυνση των αντιμικροβιακών φαρμάκων από το εσωτερικό του κυττάρου. Επίσης, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός multidrug μεταφορέων (multidrug transporters) που είναι γνωστός τόσο στα Gram-θετικά, όσο και στα Gram-αρνητικά βακτήρια, οι περισσότεροι από τους οποίους εξάγουν ένα ευρύ φάσμα δομικά ετερογενών τοξικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων και των αντιμικροβιακών φαρμάκων (Paulsen et al., 1996; Putman et al., 2000)

Το *multidrug efflux system* ή *multidrug efflux pump* είναι ένας πολύ σπουδαίος μηχανισμός ανθεκτικότητας, δεδομένου ότι προσφέρει στο βακτηριακό κύτταρο ανθεκτικότητα απέναντι σε ένα μεγάλο αριθμό αντιμικροβιακών φαρμάκων.

### 3.1.3. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Χημική τροποποίηση της περιοχής στόχου-υποδοχέα, π.χ. μεθυλίωση του 23S RNA της υπομονάδας 50S του ριβοσώματος του βακτηρίου, μειώνει την δυνατότητα σύνδεσης των μακρολιδίων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτή την ομάδα αντιμικροβιακών (Leclercq et al., 1991). Κάλυψη των περιοχών στόχων, όπως είναι το ριβόσωμα, από ειδικές και συγκεκριμένες προστατευτικές πρωτεΐνες που θεωρούνται ότι εμποδίζουν τη σύνδεση των αντιμικροβιακών φαρμάκων, έχει αναφερθεί σχετικά με την ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες (Roberts, 1996).

Η αντικατάσταση των υποδοχέων στόχων από νέους στόχους που εμφανίζουν

μειωμένη συγγένεια με τα αντιμικροβιακά φάρμακα, αντιπροσωπεύουν τον μηχανισμό με τον οποίο τα βακτήρια αποκτούν ανθεκτικότητα (Quintiliani et al., 1999). Παράδειγμα αποτελεί η εμφάνιση τροποποιημένων πρωτεϊνών σύνδεσης πενικιλινών (PBPs) οι οποίες σχετίζονται με την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων στις β-λακτάμες. Επιπλέον, έχουν μελετηθεί μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τους στόχους-υποδοχείς με αποτέλεσμα την αντοχή στα αντιβιοτικά.

Τέλος, εκτός από τους προαναφερόμενους μηχανισμούς ανθεκτικότητας έχει ανακαλυφθεί και ένας ακόμη μηχανισμός που τα βακτήρια αποκτούν εναλλακτικούς μεταβολικούς δρόμους από αυτούς που αναστέλλονται από τα αντιμικροβιακά φάρμακα (McDermott, et al., 2003.): π.χ. βακτήρια ανθεκτικά στις σουλφοναμίδες δε συνθέτουν πλέον φολικό οξύ αλλά το προσλαμβάνουν με την τροφή τους όπως συμβαίνει με τα θηλαστικά.

## **3.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

### **3.2.1. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ**

Οι τετρακυκλίνες που κυρίως χρησιμοποιούνται στα ζώα είναι οξυτετρακυκλίνη, η χλωροτετρακυκλίνη, η τετρακυκλίνη και η δοξυκυκλίνη. Σύμφωνα με μία έρευνα της FEDESA που έγινε το 1997, οι τετρακυκλίνες αποτελούσαν τα 2/3 του συνολικού ποσού των αντιμικροβιακών φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν στα ζώα, γεγονός που εξηγεί την ευρεία εμφάνιση -ανθεκτικών στις τετρακυκλίνες - στελεχών βακτηρίων παθογόνων για τα ζώα.

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στις τετρακυκλίνες οφείλεται κυρίως στην απόκτηση tet γονιδίων, (μια ενημερωμένη βάση δεδομένων που περιλαμβάνει τα μέχρι τώρα γνωστά tet γονίδια καθώς και τα βακτήρια στα οποία αυτά εμφανίστηκαν). Έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας έναντι των τετρακυκλινών, μεταξύ των οποίων η ενεργητική

απέκκριση και η προστασία των ριβοσωμάτων είναι οι επικρατέστεροι μηχανισμοί μεταξύ των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών παθογόνων βακτηρίων (Roberts, 1996). Πιο συγκεκριμένα:

α) **Σύστημα ενεργητικής απέκκρισης** : αποτελείται από δύο τύπους διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες ανταλλάσσουν ένα πρωτόνιο για κάθε σύμπλεγμα τετρακυκλίνης-κατιόντος (Roberts, 1996). Με βάση τα πειράματα υβριδοποίησης, τουλάχιστον 14 διαφορετικές κατηγορίες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών απέκκρισης έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα (Levy, et al., 1999). Οι περισσότερες μελετημένες κατηγορίες είναι οι A, B, C, D, H, K, και L. Γονίδια tet που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη K και L (Tet K, Tet L) υπάρχουν κυρίως στα Gram-θετικά βακτήρια.

Η επαγωγή της έκφρασης από τις τετρακυκλίνες (tetracycline inducible expression) ρυθμίζεται από ένα μηχανισμό γνωστό ως «εξασθένηση της μετάφρασης» (translation attenuation). Τα γονίδια tet(K) και tet(L) βρίσκονται συχνά σε μικρά πλασμίδια που σε σπάνιες περιπτώσεις μπορούν να ενσωματωθούν μέσα σε άλλα πλασμίδια ή στο χρωμοσωμικό DNA. Επίσης, μπορεί να υποβληθούν σε διαπλασμιδιακό επανασυνδυασμό με άλλα πλασμίδια ανθεκτικότητας.

Αντίθετα, στα Gram-αρνητικά βακτήρια, έχουν αναγνωριστεί τα γονίδια tet (A, E, G, H) και tet (J), τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες απέκκρισης των τετρακυκλινών και στα οποία έχει προσδιορισθεί η ακολουθία των αμινοξέων. Κάθε ένα από τα δομικά γονίδια tet συνοδεύεται από ένα συγκεκριμένο κατασταλτικό tet γονίδιο. Οι τετρακυκλίνες προκαλούν επαγωγή της έκφρασης των δομικών γονιδίων tet γιατί προκαλούν αναστολή των κατασταλτικών tet γονιδίων, επάγοντας τη σύνδεση του συμπλέγματος τετρακυκλίνης-Mg<sup>2+</sup> στο tet γονίδιο καταστολής (Roberts, 1996).

Τα γονίδια tet των κατηγοριών C, E, και G βρίσκονται συχνά σε πλασμίδια ενώ εκείνα των κατηγοριών A, B, D, και H συνδέονται με μη-συζευκτικά τρανσποζόνια ή στοιχεία παρόμοια με τα τρανσποζόνια που μπορούν επίσης να εδρεύουν σε πλασμίδια.

β) Οι **προστατευτικές των ριβοσωμάτων πρωτεΐνες** που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα είναι σε μεγάλο βαθμό ομόλογες με τους παράγοντες επιμήκυνσης των ριβοσωμάτων, και εμφανίζουν



GTPase δραστηριότητα (Taylor και Chau, 1996).

Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με τα ριβοσώματα προκαλεί αποδιοργάνωση των σημείων σύνδεσης των ριβοσωμάτων (υπομονάδα 30S) με τις τετρακυκλίνες, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των τετρακυκλινών από τα ριβοσώματα (Connell, et al., 2003).

Μέχρι σήμερα είναι γνωστές οκτώ διαφορετικές κατηγορίες γονιδίων tet που κωδικοποιούν τις προστατευτικές πρωτεΐνες των ριβοσωμάτων M, O, P, Q, S, T, W, καθώς επίσης και otr (A) (Levy, et al., 1999). Η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων tet (M) και tet (O) από τις τετρακυκλίνες γίνεται στο στάδιο της μεταγραφής τους. Το γονίδιο tet (M) βρίσκεται συνήθως σε συζευκτικά τρανσποζόνια που δείχνουν μια εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία βακτηρίων ξενιστών. Κατά συνέπεια τα γονίδια tet(M) είναι γνωστό ότι εμφανίζονται τόσο στα Gram-θετικά, όσο και στα Gram-αρνητικά βακτήρια (Roberts, 1996).

Γονίδια tet (O) έχουν ανιχνευθεί κυρίως στο *Campylobacter* spp., τον *Streptococcus* spp. τον *Enterococcus* spp., ενώ γονίδια της κατηγορίας S παρατηρούμε στην *Listeria* και στον *Enterococcus* sp. Το γονίδιο tet(Q) αποτελεί κομμάτι των μεγάλων συζευκτικών τρανσποζονίων του *Bacteroides* spp. και στα συγγενικά του γένη. Μέχρι τώρα, το γονίδιο tet(T) έχει ανιχνευθεί μόνο στον *Streptococcus pyogenes* ενώ το tet(W) στο *Butyrivibrio fibrisolvens* και σε άλλα βακτήρια των μηρυκαστικών. Το γονίδιο otr(A) που προέρχεται από τον παραγωγό της τετρακυκλίνης *Streptomyces* spp. βρέθηκε επίσης σε *Mycobacterium* spp. (Roberts, 1996).

**γ) Η αδρανοποίηση των τετρακυκλινών μέσω ενζύμων :** Κωδικοποιείται από γονίδια, tet (X), tet(37) και tet(34). Το γονίδιο tet (X) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TetX, η οποία αντιπροσωπεύει μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που *in vitro* τροποποιεί χημικά τις τετρακυκλίνες παρουσία οξυγόνου και NADPH. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, το γονίδιο tet(X) δεν έχει βρεθεί σε άλλα βακτήρια εκτός από τα αναερόβια *Bacteroides* spp., όπου η πρωτεΐνη TetX είναι ανενεργή λόγω απουσίας οξυγόνου (Roberts, 1996 ; Speer et. al., 1992).

Το γονίδιο tet (37) ενώ έχει βρεθεί σε γενετικό υλικό της στοματικής κοιλότητας ανθρώπων, δεν έχει βρεθεί σε κανένα βακτήριο. Τέλος το γονίδιο tet (34) έχει ανιχνευθεί σε

στελέχη του *Vibrio cholerae* (Nonaka και Suzuki, 2002).

δ) **Οι multidrug μεταφορείς** : Επιφέρουν ανθεκτικότητα τόσο στην τετρακυκλίνη όσο και σε άλλες ενώσεις με τελείως διαφορετική δομική σύσταση. Το παραπάνω φαινόμενο παρατηρείται στην *Escherichia coli* (EmrE), *Salmonella* (AcrAB/TolC) και *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB/OprM MexCD/OprJ) (Paulsen et al., 1996; Putman et al., 2000).

ε) **Μειωμένη διαπερατότητα** : Χρωμοσωμικές μεταλλάξεις προκαλούν μείωση των πορινών OmpF της εξωτερικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την χαμηλή αντοχή στις τετρακυκλίνες (Quintiliani, et. al., 1999). Επιπλέον στην *Escherichia coli* και στη *Salmonella* και στη *Shigella*, έχει εντοπιστεί ένας γενετικός τύπος που ονομάζεται MAR (multiple antibiotic resistance), ο οποίος προσδίδει υψηλή αντοχή και σε άλλα αντιβιοτικά όπως πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, φλουοροκινολόνες και ναλιξιδικό οξύ. Η μείωση της πορίνης OmpF αποτελεί ένα μόνο μέρος του μηχανισμού αντοχής. Πιθανώς το οπερόνιο MAR να επάγει την ενεργό εκροή τετρακυκλίνης και χλωραμφαινικόλης.

### 3.2.2. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ

Οι κινολόνες και φθοριοκινολόνες χρησιμοποιούνται ευρέως στα παραγωγικά ζώα. Κυρίως χρησιμοποιούνται οι φθοριοκινολόνες, όπως η ενροφλοξακίνη, η δανοφλοξακίνη, η σαραφλοξακίνη, η μαρβοφλοξακίνη, η ορβιφλοξακίνη και η διφλοξακίνη.

Ο μηχανισμός δράσης των κινολονών και φθοριοκινολονών βασίζεται στην αναστολή της αντιγραφής του βακτηριακού DNA. Έτσι η ανθεκτικότητα σε αυτά τα φάρμακα βασίζεται είτε στις μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν την DNA τοποϊσομεράση, είτε στη μειωμένη ενδοκυτταρική συσσώρευση των φαρμάκων αυτών (Everett και Piddock, 1998; Hooper, 1999).

α) **Αλλάγη των γονιδίων στόχων λόγω μετάλλαξης** : Περιλαμβάνει τα γονίδια *gyrA*, *gyrB* τα

οποία κωδικοποιούν την υπομονάδα A της DNA-γυράσης ή τοποϊσομεράσης II και *parC* και *parE* τα οποία κωδικοποιούν την DNA τοποϊσομεράση IV. Μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων παρατηρείται στα παραπάνω γονίδια στόχους πολλών Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Όλες οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrA* έχουν εντοπιστεί σε μια περιοχή μεγέθους 130 bp (Cloeckaert και Chaslus-Dancla, 2001), η οποία ονομάζεται περιοχή καθορισμού-ανθεκτικότητας στις κινολόνες (Quinolone Resistance Determining Region, QRDR).

Από τις μεταλλάξεις αυτές που έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της DNA-γυράσης, η αντικατάσταση της σερίνης στη θέση 83 με αλανίνη, τυροσίνη, ή η αντικατάσταση του ασπαραγινικού οξέος στη θέση 87 με γλυκίνη ή τυροσίνη. Σε όλες τις περιπτώσεις οι αμινοξικές υποκαταστάσεις σ' αυτή την θέση έχουν σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση μιας υδροξυλικής ομάδας από μία υδρόφοβη, γεγονός που προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση και το φορτίο της περιοχής που δεσμεύονται οι κινολόνες.

Σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *gyrA* προσδίδει αντοχή στο ναλιδιζικό οξύ, ενώ πρόσθετες μεταλλάξεις στο *gyrA* ή σε επιπλέον γονίδια των τοποϊσομερασών της DNA γυράσης προσδίδουν αντοχή στις φθοριοκινολόνες. (Jones et al., 2000).

**β) Αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών σύνθετων μηχανισμών ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στις φθοριοκινολόνες** μπορεί να αυξήσει το επίπεδο της ανθεκτικότητάς τους όχι μόνο στις κινολόνες, αλλά και σε άλλα φάρμακα, όταν παρουσιάζεται μειωμένη δραστηριότητα των αντλιών ενεργητικής απέκκρισης και μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Everett et al., 1996).

Για παράδειγμα σε στελέχη της *E. coli* που εμφανίζουν *in vitro* ανθεκτικότητα παρατηρήθηκαν 2 αμινοξικές υποκαταστάσεις δηλαδή στην αρχή τα στελέχη αυτά εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο *gyrA*, στη συνέχεια εμφανίζουν αυξημένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την αντλία ενεργητικής απέκκρισης και τέλος εμφανίζουν επιπλέον μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις τοποϊσομεράσες.

Τέλος, αναφέρεται ότι στην περίπτωση αδρανοποίησης της αντλίας ενεργητικής απέκκρισης οι μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις τοποϊσομεράσες δεν επαρκούν

για ικανοποιητικού βαθμού ανθεκτικότητα στις φθοριοκινολόνες αλλά ενισχύουν 4 έως 8 φορές την αντοχή που οφείλεται σε μεταλλάξεις της DNA γυράσης.

Το παραπάνω γεγονός έχει παρατηρηθεί σε στελέχη της *E. coli*, *P. aeruginosa* και *S. enterica Salmonella typhimurium* (P. Quintiliani Jr και p. Courvalin, 1997).

γ) **Τα multidrug efflux συστήματα**, τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως στην *P. aeruginosa* (MexAB/OprM, MexCD/OprJ), στον *S. aureus* (NorA), στον *S. pneumoniae* (PmrA), στον *B. subtilis* (Blt), στην *E. coli* και στην *Salmonella* (AcrAB/TolC).

Πολλά από αυτά τα efflux συστήματα αντιπροσωπεύουν multidrug μεταφορείς που είναι σε θέση να εξάγουν εκτός από τις κινολόνες, και ένα ευρύ φάσμα άλλων τοξικών ουσιών από το βακτηριακό κύτταρο (Cloeckaert και Chaslus- Dancla, 2001; Poole, 2000).

Δεδομένου ότι το βασικό επίπεδο έκφρασης αυτών των efflux συστημάτων είναι χαμηλό, απαιτείται αύξηση των επιπέδων της έκφρασής τους (upregulation) για να παρέχουν ανθεκτικότητα στις φθοριοκινολόνες και τα άλλα αντιμικροβιακά φάρμακα. Έτσι για παράδειγμα, στην *E. coli* μεταλλάξεις στα γονίδια *marRAB*, *soxRS*, *acrR* που κωδικοποιούν την αντλία ενεργητικής απέκκρισης (efflux pump), έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση των γονιδίων αυτών και κατά συνέπεια υπερ-παραγωγή της AcrAB/TolC efflux pump με αποτέλεσμα την παραγωγή φαινοτύπου πολλαπλής ανθεκτικότητας της *E. coli*.

δ) **Μειωμένη διαπερατότητα** : Η μειωμένη είσοδος φαρμάκων στα Gram-αρνητικά βακτήρια οφείλεται στην υπορρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή πορίνης OmpF, με αποτέλεσμα την εμφάνιση του φαινότυπου της πολλαπλής ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα (Multiple Antibiotic Resistance, MARφαινότυπος: χαρακτηρίζεται από μειωμένη ευαισθησία σε πολλά αντιμικροβιακά φάρμακα λόγω απώλειας πορινών και/ή αυξημένη έκφραση του συστήματος ενεργητικής απέκκρισης (active efflux systems) (Quintiliani, et. al., 1999).

Η OmpF είναι μια σημαντική πορίνη για την είσοδο κινολονών και φθοριοκινολονών μέσα στο βακτηριακό κύτταρο. Επιπλέον, μεταλλάξεις σε διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους (*cfxB*, *norB*, *nfxB*, *norC* ή *nalB*) έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη διαπερατότητα των

μικροοργανισμών στις κινολόνες και φθοριοκινολόνες (Hooper et al., 1992).

Οι μεταλλάξεις por B και por C προσδίδουν αντοχή στη νορφλοξασίνη, ενώ η cfx B σχετίζεται τόσο με την αντοχή στη νορφλοξασίνη όσο και στη χλωραμφαινικόλη, καθώς και με μείωση της πορίνης OmpF ( Martinez-Jacoby , et. al., 1998 ) .

ε) **Η προστασία του ενζύμου DNA-γυράση** : Βασιζεται στην παραγωγή ενός γονιδίου που ονομάζεται Qnr. Το Qnr γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 218 αμινοξέα, η οποία προστατεύει την DNA-γυράση από την ανασταλτική δράση των κινολονών και φθοριοκινολονών. Εδρεύει σε ένα πλασμίδιο που αυξάνει την αντοχή στο ναλιδιξικό οξύ, τη σιπροφλοξασίνη και άλλες φθοριοκινολόνες

Το Qnr γονίδιο εντοπίστηκε αρχικά σε πλασμίδια πολυανθεκτικών στελεχών των *K. pneumoniae* και *E. coli* (Ruiz, 2003).

στ) **Ενζυματική αδρανοποίηση** : Παρατηρήθηκε πρόσφατα και βασίζεται σε μία παραλλαγή της ακετυλοτρανσφεράσης των αμινογλυκοσιδών (AAC6Ib) που κωδικοποιείται από ένα πλασμίδιο, το οποίο προκαλεί ακετυλίωση των φθοριοκινολονών και μείωση της δραστηριότητάς τους (Robicsek, et al., 2006).

### 3.2.3. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ

Από τις αμινογλυκοσίδες που χρησιμοποιούνται στα ζώα αλλά και στον άνθρωπο είναι η γενταμικίνη, η καναμυκίνη, η νεομυκίνη και η στρεπτομυκίνη, ενώ από τις αμινοκυκλιτόλες η σπεκτινομυκίνη και η απραμυκίνη χορηγείται αποκλειστικά στα ζώα.

Ο κυρότερος μηχανισμός επίκτητης αντοχής στις αμινογλυκοσίδες βασίζεται στην ενζυμική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού (Shaw, et al.1993). Άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας είναι η μειωμένη είσοδος αμινογλυκοσιδών και η τροποποίηση υποδοχέων μέσω χρωμοσωμικών μεταλλάξεων, οι οποίες προσδίδουν υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα

στη στρεπτομυκίνη (Quintiliani et al., 1999).

α) **Ενζυματική αδρανοποίηση** : Οφείλεται στην δράση 3 κατηγοριών αδρανοποιητικών ενζύμων (Shaw, et al., 1993) τα οποία είναι τα εξής :

1. N-ακετυλοτρανσφεράσες (AACs), που ακετυλιώνουν αμινο-ομάδες. Μέχρι τώρα έχουν βρεθεί τέσσερις ομάδες N-ακετυλοτρανσφερασών (AACs), οι οποίες ακετυλιώνουν τις αμινο-ομάδες στις θέσεις 1, 3, 2' και 6' (Wright, 1999). Στις ομάδες αυτές ανήκουν 40 διαφορετικές AACs η πλειοψηφία των οποίων βρέθηκε σε Gram-αρνητικά βακτήρια (Schwarz, et al., 2006). Η ανθεκτικότητα στην απραμυκίνη και γενταμικίνη οφείλεται στο ένζυμο AAC(3)-IV, ενώ το γονίδιο που κωδικοποιούσε το ένζυμο αυτό εμφανίστηκε μετά την εισαγωγή της απραμυκίνης στην κτηνιατρική κλινική πράξη. Αρχικά το παραπάνω γονίδιο ανιχνεύθηκε σε στελέχη *Salmonella* και *E. coli* από ζώα και στη συνέχεια βρέθηκε και σε στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από ανθρώπους (Chaslus-Dancla, et al., 1986). Ένα δι-λειτουργικό ένζυμο που κωδικοποιεί τις δραστηριότητες της ακετυλοτρανσφεράσης AAC(6') και της φωσφοτρανσφεράσης APH(2'') εντοπίστηκε στο τρανσποζόνιο Tn4001, που είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο μεταξύ *Staphylococcus*, *Streptococcus* και *Enterococcus* spp. (Rouch, et. al., 1989).

2. Οι O-αδενυλοτρανσφεράσες (ANTs), που αδενυλιώνουν υδροξυλομάδες. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 5 κατηγορίες από τις O-αδενυλοτρανσφεράσες (ANTs) που ενεργούν στις θέσεις 6, 9, 4'', 2'', και 3'' και οι οποίες περιλαμβάνουν περισσότερες από 20 διαφορετικές ANTs (Davies και Wright, 1997; Wright, 1999). Οι διαφορετικές ANTs παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε ότι αφορά το φάσμα των υποστρωμάτων τους.

3. Οι O-φωσφοτρανσφεράσες (APHs), που φωσφορυλιώνουν υδροξυλομάδες. Ανάμεσα στις φωσφοτρανσφεράσες (APHs) που φωσφορυλιώνουν τις ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 4, 6, 3' 2'', και 3'' των αμινογλυκοσιδών έχουν βρεθεί τουλάχιστον 25 παραλλαγές που διαφέρουν ως προς το φαινότυπο της ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες. Τα

περισσότερα aac, ant και aph γονίδια που κωδικοποιούν αντίστοιχα τις AACs, ANTs και APHs βρίσκονται σε πλασμίδια, τρανσποζόνια ή ιντεγκρόνια/γονιδιακές κασέτες (Sandvang και Aarestrup, 2000).

Παρά τον μεγάλο αριθμό των μέχρι σήμερα γνωστών ενζύμων και των γονιδίων που αυτά κωδικοποιούν και παρά τις προσπάθειες ταξινόμησης τους που έχουν γίνει από τους μελέτητες, δεν υπάρχει μία βάση δεδομένων που να περιέχει όλα τα γνωστά αδρανοποιητικά ένζυμα των αμινογλυκοσιδών και αμινοκυκλιτολών (Schwarz, et al., 2006).

Ένα ακόμη πρόβλημα είναι ότι δεν υπάρχει ενιαίος τρόπος ονομασίας, δηλαδή για το γονίδιο που κωδικοποιεί το ίδιο ένζυμο υπάρχουν τουλάχιστο δύο ονόματα-ορισμοί. Για παράδειγμα οι ορισμοί aph (3'')-Ib και str(A) αφορούν το ίδιο ένζυμο. Ο πρώτος ορισμός γίνεται με βάση τον τύπο της ενζυματικής αδρανοποίησης (δηλ. aph), τη θέση που δρά το ένζυμο (δηλ. 3'') και τον υπότυπο του γονιδίου (δηλ. Ib) ενώ ο δεύτερος ορισμός βασίζεται στον φαινότυπο της ανθεκτικότητας, δηλαδή ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη και στον υπότυπο του γονιδίου (A).

**β) Μειωμένη διαπερατότητα :** Είναι μηχανισμός αντοχής και βασίζεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τις φωσφορικές ομάδες του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης ή σε αλλαγή στο φορτίο του LPS στην *Escherichia coli* και στην *Pseudomonas aeruginosa*, αντίστοιχα (Salyers και Whitt, 1994).

Επίσης σε προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς, η μειωμένη εισροή αμινογλυκοσιδών από την κυτταροπλασματική μεμβράνη οφείλεται σε διαταραχή του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων, που απαιτεί κατανάλωση ενέργειας και οξυγόνου (Quintiliani, et al., 1999).

**γ) Τροποποίηση υποδοχέων μέσω μεταλλάξεων :** Εντοπίζονται στο γονίδιο gpsL που είναι ο στόχος του αντιβιοτικού και κωδικοποιεί την ριβοσωματική πρωτεΐνη S12 και έχει ως αποτέλεσμα ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στη στρεπτομυκίνη (Quintiliani, et al., 1999).

Αποτέλεσμα των ριβοσωμικών αυτών μεταλλάξεων είναι η τροποποίηση του υποδοχέα σύνδεσης της στρεπτομυκίνης στο ριβόσωμα. Αντικατάσταση μιας μόνο βάσης σε διαφορετικές θέσεις του rrs γονιδίου που κωδικοποιεί το 16S rRNA στα *Mycobacterium* spp. έχει ως αποτέλεσμα ανθεκτικότητα τους στην αμικασίνη, στην καναμυκίνη, στη γενταμικίνη, στην τοβραμυκίνη, στη νεομυκίνη, αλλά όχι στη και στη στρεπτομυκίνη (Prammanaman, et al., 1998).

δ) **Τροποποίηση υποδοχέων μέσω μεθυλίωσης** : Πραγματοποιούνται στο 16S rRNA στη θέση G-1405 ή A- 1408 των ριβοσωμάτων των μικροοργανισμών έχει ως αποτέλεσμα ανθεκτικότητα στη γενταμικίνη και στην καναμυκίνη ή στην καναμυκίνη και στην απραμυκίνη, αντίστοιχα.

Οι υπεύθυνες για την μεθυλίωση του 16S rRNA μεθυλάσες έχουν βρεθεί στους μικροοργανισμούς που παράγουν τις αμινογλυκοσίδες δηλαδή στους *Streptomyces* sp. και *Micromonospora* spp. και πιστεύεται ότι αποτελούν μηχανισμούς αυτοάμυνας των μικροοργανισμών αυτών κατά των ουσιών που οι ίδιοι παράγουν (Beauclerk και Cundliffe, 1987).

ε) **Efflux συστήματα ή συστήματα ενεργητικής απέκκρισης** : Πολύ πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι οι αντλίες AcrD ή MdfA στην *Escherichia coli* (Rosenberg, et al., 2000), και MexXY στην *Pseudomonas aeruginosa* (Aires, et al., 1999) μπορούν να δεσμεύουν αμινογλυκοσίδες στον περιπλασματικό χώρο και να τις αποβάλλουν από τους μικροοργανισμούς. (Aires JR, Nikaido H, 2005).

### **3.2.4. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ**

Οι σουλφοναμίδες, η τριμεθοπρίμη και ο συνδυασμός τους χρησιμοποιούνται στα παραγωγικά ζώα χωρίς περιορισμό. Οι σουλφοναμίδες και η τριμεθοπρίμη «μπλοκάρουν» διαφορετικά ενζυματικά στάδια της βιοσύνθεσης του τετραϋδροφολικού οξέος.



Συγκεκριμένα, οι σουλφοναμίδες είναι δομικά ανάλογα του π-αμινοβενζοϊκού οξέος (PABA) και αναστέλλουν ανταγωνιστικά το ένζυμο διϋδροπτεροϊκή συνθετάση (Dihydropteroic acid Synthase, DHPS), ενώ η τριμεθοπρίμη αναστέλλει ανταγωνιστικά τη διϋδροφολική αναγωγή (Dihydrofolate Reductase, DHFR).

Διαφορετικοί μηχανισμοί εγγενούς και επίκτητης ανθεκτικότητας στις σουλφοναμίδες και στην τριμεθοπρίμη έχουν βρεθεί σε παθογόνα βακτήρια (Huoninen,2001). Ενώ μερικά βακτήρια εμφανίζουν εγγενή ανθεκτικότητα, η επίκτητη ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται στην τροποποίηση ενζύμων-στόχων μέσω χρωμοσωμικών μεταλλάξεων ή σε κωδικοποιημένα από πλασμίδια ένζυμα DHPS ή DHFR που είναι ανθεκτικά στις σουλφοναμίδες και στην τριμεθοπρίμη, αντίστοιχα (Aleksium και Levy, 2000; Quintiliani et al., 1999).

α) **Μειωμένη διαπερατότητα από την εξωτερική μεμβράνη** και στις δύο ενώσεις έχει παρατηρηθεί στην *Pseudomonas aeruginosa*. Αρχικά θεωρούταν ότι αποτελούσε τον μοναδικό μηχανισμό της εγγενούς ανθεκτικότητας του βακτηρίου αυτού, στη συνέχεια όμως διαπιστώθηκε ότι η ανθεκτικότητα της *Pseudomonas aeruginosa* στις σουλφοναμίδες και στην τριμεθοπρίμη οφείλεται στους multidrug μεταφορείς όπως το σύστημα εξαγωγής MexAB-OprM (Kohler et al., 1996).

β) **Ένζυμα DHFR από τη φύση τους ανθεκτικά στη δράση της τριμεθοπρίμης** έχουν βρεθεί σε διάφορα βακτηριακά γένη όπως *Clostridium*, *Neisseria*, *Brucella*, *Bacteroides* και *Moraxella* καθιστώντας τα εγγενώς ανθεκτικά στην τριμεθοπρίμη (Quintiliani, et al., 1999).

Βακτήρια που έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν εξωγενές φολικό οξύ όπως *Enterococci* spp. και *Lactobacilus* spp. επίσης παρουσιάζουν εγγενή ανθεκτικότητα στην τριμεθοπρίμη και τις σουλφοναμίδες.

γ) **Τροποποίηση των ενζύμων-στόχων (DHPS, DHFR)** οφείλεται σε χρωμοσωμικές μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά. Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα DHPS και DHFR μπορεί να μειώσουν τη συγγένεια των ενζύμων αυτών για τις σουλφοναμίδες και την τριμεθοπρίμη, αντίστοιχα. Τέτοιες μεταλλάξεις έχουν

βρεθεί στα βακτηριακά είδη *E. coli*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, και *S. pneumoniae*.

Επιπλέον, αδρανοποίηση της θυμιδικής συνθετάσης, λόγω μετάλλαξης των υπεύθυνων γονιδίων που προκαλεί (thymine auxotrophy) έχει ως αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στις σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη που αναστέλλουν τη σύνθεση του φολικού, άρα και της θυμίνης (Quintiliani, et. al., 1999).

**δ) Η αντικατάσταση των ευαίσθητων ενζύμων από ανθεκτικά ένζυμα** προκαλεί συνήθως υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα (Huoninen, et al., 1995). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί στα Gram-αρνητικά βακτήρια τρία ανθεκτικά DHPS ένζυμα που κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα γονίδια *sul1*, *sul2* και *sul3* (Huoninen, et al., 1995; Quintiliani, et al., 1999).

Το γονίδιο *sul1* αποτελεί τμήμα της συντηρημένης περιοχής 3' των ενσωματωμένων της κατηγορίας I, ενώ επίσης βρίσκεται σε τρανσποζόνια (π.χ. το Tn21) και σε συζευκτικά πλασμίδια. Το *sul2* γονίδιο εμφανίζεται μαζί τα γονίδια ανθεκτικότητας στη στρεπτομυκίνη (*strA-strB*) σε συζευκτικά ή μη-συζευκτικά πλασμίδια (Huoninen, et. al., 1995). Το *sul3* γονίδιο αρχικά βρέθηκε σε ένα συζευκτικό πλασμίδιο στελέχους της *Escherichia coli* που απομονώθηκε από χοίρους, ενώ στη συνέχεια απομονώθηκε και από στελέχη της *Escherichia coli* σε ανθρώπους και άλλα ζώα, καθώς και από στελέχη της *Salmonella enterica* σε ανθρώπους και τρόφιμα (Grape, et al., 2003; Guerra, et al., 2004).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 25 διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν την διϋδροφολική αναγωγή (dhfr γονίδια), τα οποία υποδιαιρούνται με βάση τη δομή τους σε δύο ομάδες τα *dhfrA* και *dhfrB* (Schwarz, et al., 2006). Τα *dhfrA* γονίδια κωδικοποιούν DHFR ένζυμα που αποτελούνται από 152 έως 189 αμινοξέα, ενώ τα *dhfrB* γονίδια κωδικοποιούν DHFR ένζυμα που αποτελούνται μόνο από 78 αμινοξέα.

Γονίδια ανθεκτικότητας στην τριμεθοπρίμη έχουν βρεθεί σε διάφορα Gram-αρνητικά βακτήρια. Αρκετά από αυτά τα γονίδια είναι μέρος πλασμιδίων, τρανσποζονίων ή γονιδιακών κασετών (Huoninen et al., 1995). Πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει τη σχέση μεταξύ των διαφορετικών *dhfr* γονιδίων. Στους σταφυλόκοκκους, το τρανσποζόνιο Tn4003 έχει ταυτοποιηθεί σε διάφορα πλασμίδια πολλαπλής ανθεκτικότητας (Rouch et al., 1989).

Το Tn4003 αποτελείται από ένα κεντρικό *dhfrA* γονίδιο, το οποίο βρίσκεται ανάμεσα από αντίγραφα του IS257 (insertion sequence 257). Γονίδια ανθεκτικότητας στην τριμεθοπρίμη έχουν βρεθεί και σε άλλα gram-θετικά βακτήρια, όπως στο *S. haemolyticus*, *S. epidermitis*, *L. monocytogenes*, και *Bacillus subtilis* (Charpentier και Courvalin, 1997).

### 3.2.5. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ

Οι β-λακτάμες που κυρίως χρησιμοποιούνται στα ζώα είναι: α) πενικιλίνες, β) πενικιλίνες σε συνδυασμό με αναστολείς των β-λακταμασών, και γ) κεφαλοσπορίνες. Αντίθετα, οι μονοβακτάμες και καρβαπενέμες δεν έχουν ως σήμερα εγκριθεί για κτηνιατρική χρήση.

Η ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες οφείλεται κυρίως στην αδρανοποίηση τους από β-λακταμάσες (Aleksium και Levy, 2000; Bush et al., 1995; Livermore, 1995; Theuretzbacher, 1998) και στη μειωμένη ικανότητα σύνδεσης τους με τις τροποποιημένες πρωτεΐνες σύνδεσης των πενικιλινών (PBPs) τόσο των Gram-αρνητικών, όσο και των Gram-θετικών βακτηρίων, λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν τις PBPs (Georgeparadaku, 1993; Hackbath και Chambers, 1989).

Άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας είναι η μειωμένη διείσδυση των β-λακταμών λόγω των αλλαγών στην εξωτερική μεμβράνη ή η αυξημένη απέκκριση τους από τους multidrug μεταφορείς (Paulsen, et al., 1996; Quintiliani, et al., 1999).

**α) Ενζυματική αδρανοποίηση των β-λακταμών:** Επιτυγχάνεται από τις β-λακταμάσες, οι οποίες υδρολύουν την αμινομάδα του λακταμικού δακτυλίου των συγκεκριμένων αντιμικροβιακών φαρμάκων (Aleksium και Levy, 2000; Bush et al., 1995; Livermore, 1995; Theuretzbacher, 1998).

Οι β-λακταμάσες ταξινομούνται με βάση την ακολουθία των αμινοξέων τους, σε τέσσερις κλάσεις τις A,B,C και D (Ambler, 1980). Με βάση το φάσμα των υποστρωμάτων τους και την ευαισθησία τους στους αναστολείς των β- λακταμασών (όπως το κλαβουλανικό

οξύ), οι β-λακταμάσες ταξινομούνται επίσης σε τέσσερις κατηγορίες (1-4), μια από τις οποίες, η κατηγορία 2, αποτελείται από οκτώ υποκατηγορίες (Bush-Jacoby-Medeiros, 1995).

Είναι αξιοσημείωτο ότι αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές του φάσματος των υποστρωμάτων τους. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες β-λακταμάσες είναι εκείνες των κατηγοριών 1, 2a, 2b, και 2be. Οι β-λακταμάσες της κατηγορίας 1 (π.χ. AmpC), αντιπροσωπεύουν τις κεφαλοσπορινάσες που είναι ανθεκτικές στην αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ και είναι ευρέως διαδεδομένες στα Gram-αρνητικά βακτήρια.

Τα αντίστοιχα amp(C) γονίδια για τις β-λακταμάσες της κατηγορίας 1 βρίσκονται σε πλασμίδια ή στο χρωμόσωμα. Οι β-λακταμάσες των κατηγοριών 2a, 2b (π.χ. TEM-1, TEM-2, SHV-1, ROB-1) και 2be (π.χ. TEM-3-TEM 20, 27·SHV-2 -7 ·K1) υδρολύουν είτε πενικιλίνες, είτε πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες, ή πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και μονοβακτάμες, αντίστοιχα.

Ειδικά οι β-λακταμάσες της υποκατηγορίας 2be αντιπροσωπεύουν τις β-λακταμάσες ευρέως φάσματος (Extended Spectrum-Beta Lactamases, ESBLs). Οι περισσότερες ESBLs ανήκουν στις TEM, SHV, CTX-M, ή OXA οικογένειες των β-λακταμασών. Τα μέλη αυτών των τριών υποκατηγοριών δηλ. 2a, 2b, 2be είναι ευαίσθητα στην αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ, και τα bla γονίδια τους βρίσκονται κυρίως σε πλασμίδια. Οι β-λακταμάσες της κατηγορίας 2c αντιπροσωπεύουν καρβενικιλινάσες ευαίσθητες στο κλαβουλανικό οξύ όπως CARB-1 ή BRO-1.

Οι β-λακταμάσες της κατηγορίας 2d (π.χ. OXA-1 έως OXA- 10) δείχνουν σχετική ανθεκτικότητα στο κλαβουλανικό οξύ και είναι σε θέση να υδρολύουν πενικιλίνες (οξακιλλίνη, κλοξακιλλίνη). Οι β-λακταμάσες της κατηγορίας 2e και 2f αντιπροσωπεύουν κεφαλοσπορινάσες (π.χ. CepA) ή σερίνη-καρβαπεναμάσες (π.χ. SME-1, IMI-1), που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Οι β-λακταμάσες της κατηγορίας 1 και 2 έχουν ένα υπόλειμμα σερίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ενώ οι β-λακταμάσες της κατηγορίας 3 έχουν ένα μόριο δισθενούς μετάλλου π.χ. Zn<sup>2+</sup> και ονομάζονται μεταλλο-β-λακταμάσες (π.χ. IMP-1, VIM-1). Οι β-λακταμάσες της κατηγορίας 4 περιλαμβάνουν όλες τις β-λακταμάσες που δεν μπορούν να ταξινομηθούν στις υπόλοιπες κατηγορίες.

Μόνο οι β-λακταμάσες της κατηγορίας 2a εντοπίζονται στα Gram-θετικά βακτήρια,

καθώς όλες οι άλλες β-λακταμάσες βρίσκονται κυρίως μεταξύ των Gram- αρνητικών βακτηρίων. Με εξαίρεση μερικά ένζυμα της κατηγορίας 1, οι περισσότερες β-λακταμάσες των Gram-αρνητικών βακτηρίων εκφράζονται συνεχώς ενώ οι β- λακταμάσες της κατηγορίας 2α των Gram-θετικών βακτηρίων εκφράζονται συνήθως επαγωγικά (Quintiliani et al., 1999).

**β) Οι τροποποιημένες πρωτεΐνες σύνδεσης πενικιλινών (PBPs):** Σχετίζονται με την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων στις β-λακτάμες λόγω μειωμένης σύνδεσης των β-λακταμών στα βακτήρια αυτά.

Οι PBPs αποτελούν τρανσπεπτιδάσες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και υπάρχουν στα περισσότερα βακτήρια που έχουν κυτταρικό τοίχωμα. Η απόκτηση μιας καινούργιας τροποποιημένης-ανθεκτικής πρωτεΐνης σύνδεσης πενικιλινών (PBP2a) που αντικαθιστά την ευαίσθητη στις β-λακτάμες PBP είναι η αιτία της ανθεκτικότητας στη μεθυκυλλίνη του *Staphylococcus aureus* (Georgeopapadaku, 1993; Hackbath και Chambers, 1989).

Τα στελέχη του Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) είναι ανθεκτικά όχι μόνο σε όλες τις πενικιλίνες, αλλά και στις κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, και μονοβακτάμες.

Το *mec(A)* γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθεκτική PBP2a στις β- λακτάμες βρίσκεται σε ένα γενετικό στοιχείο 52 kbp που ονομάζεται *Staphylococcus cassette chromosome mec* (SSCmec) (Katayama, et al., 2000). PBPs που εμφανίζουν μικρή ικανότητα σύνδεσης με τις β-λακτάμες έχουν ανιχνευθεί επίσης στο *Streptococcus pneumoniae* (PBP1a,-2a,-2b), στη *Neisseria* spp. (PBP1a,-2a,-2b), και στα είδη *Enterococcus faecium* και *E. faecalis* (PBP3) (Quintiliani et al., 1999; Georgeopapadaku, 1993).

**γ) Μειωμένη είσοδος των β-λακταμών:** Οφείλεται σε μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης ή και σε έλλειψη ορισμένων πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία αποτελεί το πρώτο εμπόδιο που συναντούν τα αντιβιοτικά στην πορεία τους για το βακτηριακό κύτταρο.

Έχουν περιγραφεί σε διάφορα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas* spp. Στην *Escherichia coli* και στην *Klebsiella pneumoniae* η μειωμένη είσοδος

των β-λακταμών μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πορίνες ή στη δομική αλλαγή των πορινών OmpF και OmpK38, από τις οποίες οι β-λακτάμες περνούν στο βακτήριο μέσω της εξωτερικής μεμβράνης. (Quintiliani, et al., 1999).

δ) **Οι multidrug μεταφορείς** : Το σύστημα εξαγωγής AcrAB-TolC στη *Salmonella* και την *E. coli* (Putman, et al., 2000), προκαλούν την αυξημένη απέκκριση των β-λακταμών από το βακτηριακό κύτταρο.

### **3.2.6. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ, ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ ΚΑΙ ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΙΝΕΣ (ΜΛΣ)**

Διάφορα μακρολίδια όπως η ερυθρομυκίνη, η σπιραμυκίνη, η τυλοσίνη και η τιλμικοσίνη καθώς και λινκοσαμίδες, όπως η κλιτανμυκίνη και η λινκομυκίνη είναι εγκεκριμένα για χρήση στα ζώα. Αντίθετα μετά την απαγόρευση της χρήσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων ως αυξητικών παραγόντων καμία στρεπτογραμίνη δεν είναι εγκεκριμένη για κτηνιατρική χρήση.

Πολλά Gram-αρνητικά βακτήρια εμφανίζουν εγγενή ανθεκτικότητα στις θεραπευτικά επιτεύξιμες συγκεντρώσεις των μακρολιδίων και των λινκοσαμιδών, η οποία οφείλεται στη μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων σε αυτές τις ουσίες (Quintiliani, et al., 1999).

Οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα μακρολίδια, στις λινκοσαμίδες και στις στρεπτογραμίνες, έχουν μέχρι τώρα παρατηρηθεί κυρίως μεταξύ των Gram-θετικών βακτηρίων και περιλαμβάνουν την τροποποίηση στόχων-υποδοχέων, την ενεργητική απέκκριση και την ενζυματική αδρανοποίηση (Leclercq et al., 1991; Leclercq και Courvalin, 1991; Roberts et al., 1999).

α) **Η τροποποίηση των στόχων-υποδοχέων από τις rRNA μεθυλάσες** : Έχει ανιχνευθεί σε μια ευρεία ποικιλία Gram-θετικών, αλλά και μερικών Gram-αρνητικών βακτηρίων. Οφείλεται

συνήθως στην έκφραση διαφόρων *erm* γονιδίων που βρίσκονται σε πλασμίδια ή τρανσποζόνια, των οποίων γονιδίων τα προϊόντα μεθυλιώνουν ένα συγκεκριμένο υπόλειμμα αδερίνης (A2058 στην *E.coli*) σε μια συγκεκριμένη περιοχή του 23S rRNA (Leclercq και Courvalin, 1991; Weisblum, 1995).

Αυτή η μεθυλίωση παρέχει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα έναντι μακρολιδίων, λινκοσαμιδών και στρεπτογραμινών (ΜΛΣ αντιβιοτικά).

Τουλάχιστον 22 διαφορετικές κατηγορίες γονιδίων *erm* έχουν προσδιοριστεί, τέσσερις από τις οποίες - A, B, C, και F -διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των παθογόνων βακτηρίων των ζώων (Roberts et. al., 1999). Τα γονίδια της κατηγορίας A και B είναι μέρος των μη-συζευκτικών ή συζευκτικών τρανσποζονίων, ενώ τα γονίδια της κατηγορίας C, είναι συνήθως τοποθετημένα σε μικρά πλασμίδια μέχρι 4 kbp (Roberts et. al., 1999).

Το γονίδιο της κατηγορίας F έχει περιγραφεί ως τμήμα συζευκτικών τρανσποζονίων σε είδη του γένους *Bacteroides* (Rasmussen, et. al., 1986).

Επίσης μια έρευνα που έγινε με αντικείμενο την κατανομή και την ακολουθία ξενιστών του γονιδίου *erm*(F), έδειξε ότι αυτό το γονίδιο κατανέμεται ευρέως μεταξύ Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων ιατρικής και κτηνιατρικής σημασίας όπως π.χ. *Staphylococcus aureus* (Chung et. Al, 1999).

**β) Συστήματα απέκκρισης (efflux pumps) :** Παρέχουν ανθεκτικότητα στα μέλη της ομάδας των ΜΛΣ αντιμικροβιακών φαρμάκων, τέσσερα από τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί μεταξύ των *Staphylococcus* sp. και άλλων Gram-θετικών παθογόνων βακτηρίων, ενώ τα υπόλοιπα έξι έχουν ανιχνευθεί σε βακτήρια του εδάφους του γένους *Streptomyces* (Roberts et al., 1999).

Αυτά τα συστήματα απέκκρισης διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά το φάσμα υποστρωμάτων τους. Το γονίδιο *erp*(A) συμμετέχει στην ενεργητική απέκκριση των μακρολιδίων με 14μελή και 15μελή δακτύλιο. Το γονίδιο *msr*(A) και οι στενοί συγγενείς του *msr*(SA), *msr*(SA)' και *msr*(B) κωδικοποιούν πρωτεΐνες απέκκρισης των στρεπτογραμινών και των μακρολιδίων με 14μελή δακτύλιο. Τα γονίδια *vga*(A) και *vga*(B) επίσης κωδικοποιούν πρωτεΐνες που απεκκρίνουν τις στρεπτογραμίνες.

Τα περισσότερα από τα παραπάνω γονίδια εδρεύουν σε πλασμίδια. Εκτός από τα

παραπάνω γονίδια, άλλα δύο στενά συγγενικά γονίδια, το *mef(A)* και *mef(E)*, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες απέκκρισης των μακρολιδίων, έχουν ανιχνευτεί σε μέλη των γενών *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* και *Corynebacterium* (Roberts et al., 1999).

γ) **Ενζυματική αδρανοποίηση** : Προκαλείται από διάφορα ένζυμα, δεκαεπτά στο σύνολο τους, κάθε ένα από τα οποία επιδεικνύει ένα περιορισμένο φάσμα δράσης (Leclercq και Courvalin, 1991; Roberts et. al., 1999).

Τρεις διαφορετικοί τύποι αδρανοποιητικών ενζύμων είναι γνωστοί: οι εστεράσες, οι υδρολάσες και οι τρανσφεράσες.

Γονίδια που κωδικοποιούν τις εστεράσες, τα *ere(A)* και *ere(B)* γονίδια, εμφανίζονται κυρίως στα εντεροβακτήρια. Υδρολάσες της λακτόνης, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *vgb(A)* και *vgb(B)* αδρανοποιούν τις στρεπτογραμίνες. Ακετυλοτρανσφεράσες, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *vat(A-E)*, αδρανοποιούν τις στρεπτογραμίνες, ενώ οι νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσες που κωδικοποιούνται από το *lnu(A)* και το *lnu(B)* αδρανοποιούν τις λινκοσαμίδες.

Φωσφοτρανσφεράσες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mph(A)* και *mph(B)* έχουν ανιχνευθεί στην *Escherichia coli*, ενώ η φωσφοτρανσφεράση που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mph(C)* αρχικά βρέθηκε στον *Staphylococcus* sp., ενώ τώρα έχει ανιχνευθεί και στο Gram-αρνητικά είδος *S. maltophilia*.

Τα περισσότερα από τα γονίδια που κωδικοποιούν αδρανοποιητικά ένζυμα βρίσκονται σε πλασμίδια.

δ) **Μεταλλάξεις στο 23S rRNA** : Σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα μακρολίδια είχαν περιγραφεί αρχικά σε μέλη του γένους *Mycobacterium* (Meier et al., 1994), ενώ σήμερα έχουν περιγραφεί και στον ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη *Streptococcus pyogenes*, στον *S. pneumoniae*, στο *Campylobacter coli*, στο *Campylobacter jejuni*, και στον *Haemophilus influenzae* (Harrow et al., 2004; Hasman και Aarestrup, 2005).



### 3.2.7. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ

Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντοχής στην χλωραμφαινικόλη είναι :

α) **Ενζυμική απενεργοποίηση**: Οφείλεται κυρίως στην παραγωγή ενζύμων, όπως οι νιτροαναγωγάσες, οι οποίες ανάγουν την νιτροομάδα του βενζολικού δακτυλίου και οι ακετυλοτρανσφεράσες, οι οποίες ακετυλιώνουν 2 υδροξυλικές ομάδες της πλάγιας αλυσίδας του αντιβιοτικού.

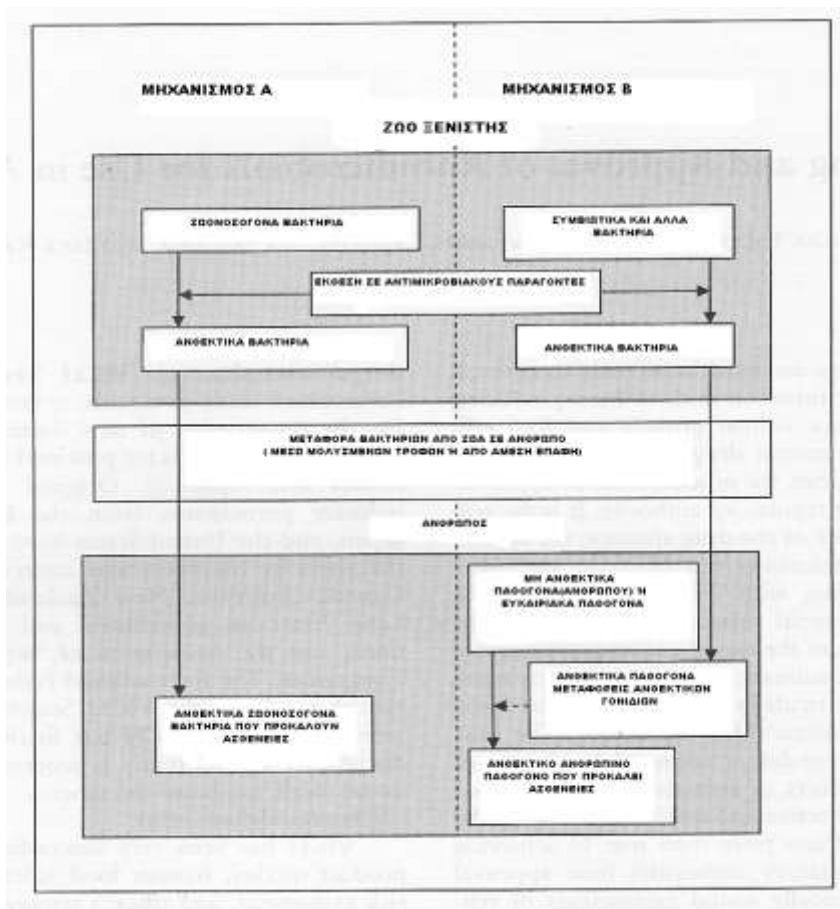
Τα μόνο- και δισ- ακετυλιωμένα παράγωγα της χλωραμφαινικόλης δεν μπορούν να δεσμεύσουν την υπομονάδα 50S του ριβοσώματος και κατ'έκταση αναστέλουν την πρωτεϊνοσύνθεση. Τα γονίδια της αντοχής εδρεύουν κυρίως σε πλασμίδια ή μεταθετά στοιχεία (catA , B, C, D, F και Q).

β) **Μειωμένη διαπερατότητα** : Στην *Salmonella typhimurium*, υψηλή αντοχή στη χλωραμφαινικόλη οφείλεται σε έλλειψη της πορίνης OmpF.

## 4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΗΣ «ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ» ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

### 4.1. ΓΕΝΙΚΑ

Είναι γεγονός ότι η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά φάρμακα πρέπει να αξιολογείται, λαμβάνοντας υπόψη την επίπτωσή της στην υγεία των ζώων κυρίως όμως την επίπτωσης στη Δημόσια Υγεία. Σημασία έχει η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν τα παθογόνα βακτήρια που μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο (ζωονοσογόνα-zoonotic bacteria), όσο και τα κοινά βακτήρια ζωικής προέλευσης (indicator bacteria), τα οποία μπορούν να μεταφέρουν σε βακτήρια του ανθρώπου γενετικό υλικό που κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα (Tollefson et al., 2006). Οι δύο μηχανισμοί της μετάδοσης της «ανθεκτικότητας» στον άνθρωπο απεικονίζονται στην εικόνα .



Εικόνα 1 - Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ζωνοσογόνα παθογόνα βακτήρια (μηχανισμός A) και σε κοινά βακτήρια που προέρχονται από τα ζώα (μηχανισμός B) (Tollefson et. al., 2006)

Ο μηχανισμός A αποτελεί το σενάριο εκείνο σύμφωνα με το οποίο τα ζώα υπόκεινται σε θεραπεία με αντιμικροβιακά φάρμακα και τα ζωνοσογόνα βακτήρια που μπορεί να υπάρχουν στο γαστρεντερικό σωλήνα τους, όπως είδη του γένους *Salmonella*, *Campylobacter*, κλπ αναπτύσσουν ανθεκτικότητα. Οι άνθρωποι εκτίθενται στα βακτήρια αυτά (μέσω μολυσμένης τροφής ή με άμεση επαφή με τα ζώα) με αποτέλεσμα τον αποικισμό και πιθανόν την ανάπτυξη νόσου που δεν ανταποκρίνεται ικανοποιητικά στη θεραπεία με αντιμικροβιακά φάρμακα. Η σημασία του μηχανισμού A είναι ευρέως γνωστή μέσω των προγραμμάτων επιτήρησης που έχουν καταρτισθεί σε όλο τον ανεπτυγμένο κόσμο (Μεθενίτου, 2004), ενώ ο ρόλος του μηχανισμού B δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως.

Ο μηχανισμός Β αποτελεί περισσότερο πολύπλοκο σενάριο, σύμφωνα με το οποίο τα ζώα υπόκεινται σε θεραπεία με αντιμικροβιακά φάρμακα και τα κοινά βακτήρια πχ *E. coli* ή είδη του γένους *Enterococcus*, αναπτύσσουν ανθεκτικότητα. Ως κοινά βακτήρια ορίζονται τα μη παθογόνα βακτήρια που υπάρχουν στα ζώα (δέρμα ή και γαστρεντερικό σωλήνα) και τα οποία είναι τα ίδια με αυτά που υπάρχουν στους ανθρώπους και για αυτό μπορεί να αποικίσουν τον άνθρωπο (Tollefson et. al, 2006). Τα κοινά αυτά ανθεκτικά βακτήρια είναι ικανά να μεταφέρουν το γενετικό τους υλικό που κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα σε άλλα βακτήρια κοινά ή παθογόνα των ανθρώπων.

Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη παθογόνων ή κοινών βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά φάρμακα στα ζώα αποτελεί κίνδυνο, όχι μόνο για την υγεία των ζώων, αλλά επηρεάζει και τη Δημόσια Υγεία, όταν αυτά μεταφέρονται στον άνθρωπο ως σιτιογενείς μολυσματικοί παράγοντες (Στέρης και Ιωσηφίδου, 2004).

Είναι γνωστό ότι πολλά παθογόνα και κοινά βακτήρια ανθρώπου και ζώων παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται συνήθως στην κλινική πράξη, συμπεριλαμβανομένων των κεφαλοσπορινών 3ης και 4ης γενιάς, των αμινογλυκοσιδών και των φθοριοκινολονών.

Τα σπουδαιότερα βακτήρια ζωικής προέλευσης που μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο και να προκαλέσουν νοσήματα είναι το *Campylobacter* spp. και η *Salmonella* spp. (τροφολοιμώξεις), τα βακτήρια που υπάρχουν φυσιολογικά στην εντερική χλωρίδα ζώων όπως είναι η *E. coli* και τέλος τα βακτήρια που αποικίζουν το δέρμα και τους βλεννογόνους της πεπτικής, αναπνευστικής και ουρογεννητικής οδού θηλαστικών και πτηνών με σπουδαιότερο εκπρόσωπο τον *Staphylococcus aureus*.

## **4.2. ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΘΕΤΟΥΝ ΣΕ ΚΙΝΔΥΝΟ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

### **4.2.1. *Escherichia coli***

Η *E. coli* είναι ένα κοινό βακτήριο που βρίσκεται στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων, αποτελώντας το κυρίαρχο προαιρετικά αναερόβιο μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας, ενώ συχνά βρίσκεται στο έδαφος, στο νερό και σε τρόφιμα μη ζωικής προέλευσης, ως αποτέλεσμα της μόλυνσής τους από κόπρανα ζώων ή της μόλυνσης τους από απόβλητα σφαγείων (μολυσμένα υγρά απόβλητα). Στο παρελθόν θεωρούταν ότι έχει μικρή λοιμογόνο δύναμη και ευεργετική επίδραση στον ξενιστή, ωστόσο σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν παθογόνα στελέχη της *E. coli* που προκαλούν μια ποικιλία ασθενειών στα ζώα και στον άνθρωπο, αποτελώντας συχνό αίτιο τροφολοιμώξεων.

Στα νεαρά ζώα (πουλερικά, χοίροι, μικρά και μεγάλα μηρυκαστικά) η λοίμωξη από παθογόνα στελέχη της *E. coli* εκδηλώνεται κυρίως με εντερίτιδα και σηψαιμία, ενώ στα ενήλικα ζώα η λοίμωξη εντοπίζεται στη μήτρα, στο ουροποιητικό σύστημα και στους μαστούς (White, 2006). Ειδικά η κολιβακίλλωση των πτηνών αποτελεί το κύριο αίτιο θνησιμότητας στην εκτροφή πουλερικών και επιμόλυνσης των σφάγιων παγκοσμίως. Η προσπάθεια αντιμετώπισής της με τη χρήση παραδοσιακών αντιμικροβιακών φαρμάκων (σουλφοναμίδες, τετρακυκλίνες), είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών από το 1960, ενώ η εισαγωγή των φθοριοκινολονών στην θεραπευτική των πουλερικών ακολουθήθηκε από το φαινόμενο της ανθεκτικότητάς τους σε αυτές. (White et al., 2000). Επίσης έχουν απομονωθεί στελέχη της *E. coli* από πουλερικά που εμφάνιζαν πολλαπλή ανθεκτικότητα σε πέντε διαφορετικές ομάδες αντιμικροβιακών φαρμάκων.

Στα βοοειδή διαφορετικοί ορότυποι της *E. coli* θεωρούνται ως κύριο αίτιο της διάρροιας των μόσχων και είναι στην πλειοψηφία τους εντεροτοξινογόνα στελέχη. Από τη δεκαετία του 1960 έχουν βρεθεί από διάφορους ερευνητές στελέχη της *E. coli* ανθεκτικά σε αντιμικροβιακά φάρμακα, όπως τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, στρεπτομυκίνη, αμπικιλίνη, νεομυκίνη, χλωραμφαινικόλη, (Hinton, 1986) καθώς και φθοριοκινολόνες (Meunier et al., 2004). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη λοιμογόνο δύναμη των στελεχών αυτών αποτελεί μια διαρκώς αυξανόμενη απειλή για την επιτυχή θεραπεία των βοοειδών και επομένως για την Δημόσια Υγεία.

Στους χοίρους έχουν βρεθεί επίσης ανθεκτικά στελέχη κυρίως εντεροτοξινογόνα της *E. coli* στις τετρακυκλίνες, στις σουλφοναμίδες, στην αμπικιλίνη, στη σπεκτινομυκίνη και

στην ενροφλοξακίνη.

Στοιχεία από διαφορετικές μελέτες αποδεικνύουν ότι η συχνή χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων στις εκτροφές των χοίρων για την πρόληψη των σχετικών με την *E. coli* νοσημάτων (διάρροιες νεογέννητων και απογαλακτισμένων, νόσος οιδήματος) σχετίζεται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα κοινά και στα παθογόνα στελέχη της *E. coli* (Bischoff et al., 2002; Choi et al., 2002).

Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στο στέλεχος O157 (Shiga toxin-producing) της *E. coli* που ονομάζεται έτσι γιατί παράγει “Shiga like” τοξίνες (SLT I και SLT II) δηλαδή τοξίνες που μοιάζουν με την τοξίνη της *Shigella*. Ειδικά οι ορότυποι O157: H7 και O157:NM (ακίνητο) είναι πολύ σημαντικοί για τη Δημόσια Υγεία, δεδομένου ότι αποτελούν τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες της αιμορραγικής κολίτιδας (Hemorrhagic Colitis, HC) και του αιμολυτικού-ουραιμικού συνδρόμου (Hemolytic- Uremic Syndrome, HUS) στον άνθρωπο, που ειδικά στα παιδιά μπορεί να αποβεί θανατηφόρο (Thielman και Guerrant, 1999). Εκτιμάται ότι στις Η.Π.Α. ετησίως η *E. coli* O157: H7 προκαλεί 73.400 περιστατικά και 60 θανάτους (Mead, et al. 1999). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα της *E. coli* O157: H7 έχει ανοδική πορεία. Τα παραγωγικά ζώα και ειδικά τα ενήλικα βοοειδή τα οποία θεωρούνται ασυμπτωματικοί φορείς της *E. coli* O157 όταν εκτεθούν σε αντιμικροβιακά φάρμακα κατά τη διάρκεια της εκτροφής τους, μπορεί να λειτουργήσουν ως δεξαμενή ανθεκτικών βακτηρίων (Schroeder, et al., 2002).

Πολλοί ερευνητές (Zhao et al., 2001; Schroeder et al., 2002) διαπίστωσαν ότι ανάμεσα σε διάφορα στελέχη *E. coli* O157 που απομονώθηκαν από ζώα υπήρξε υψηλός επιπολασμός ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνες, σουλφαμεθοξαζόλη, κεφαλοθίνη και αμπικιλλίνη. Τα ανθεκτικά αυτά στελέχη μπορεί να μεταφερθούν από τα παραγωγικά ζώα στους ανθρώπους μέσω της τροφικής αλυσίδας, με την άμεση επαφή ή με τα απόβλητα νερά των εκτροφών των ζώων.

Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι βρέθηκαν στον άνθρωπο στελέχη ανθεκτικά στις τετρακυκλίνες, αντιμικροβιακά φάρμακα τα οποία πολύ σπάνια χρησιμοποιούνται στους ανθρώπους σε αντίθεση με τα ζώα. Επειδή τα βοοειδή αποτελούν τη δεξαμενή της *E. coli*

O157 η χρήση τετρακυκλινών και σουλφοναμιδών μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας επιλογής για τη δημιουργία ανθεκτικότητας μεταξύ των στελεχών αυτών. Επίσης, οι Schroeder και συνεργάτες του (2002), διαπίστωσαν ότι υψηλότερος επιπολασμός ανθεκτικότητας εμφανίστηκε μεταξύ των στελεχών O157 που απομονώθηκαν από χοίρους. Περισσότερα από το 50% των στελεχών εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στη σουλφαμεθοξαζόλη, κεφαλοθίνη ή τετρακυκλίνη και περισσότερα από 20% στην αμπικιλίνη ή γενταμυκίνη. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι η ανθεκτικότητα εμφανίζονταν σε αντιμικροβιακά φάρμακα που ήταν εγκεκριμένα για χρήση στους χοίρους, υποδηλώνει ότι η χρήση των φαρμάκων αυτών μπορεί να αποτελεί έναν παράγοντα αύξησης της ανθεκτικότητας της *E. coli* O157. Το σημαντικότερο όμως είναι ότι τα παραπάνω αντιμικροβιακά φάρμακα αποτελούν θεραπευτικές επιλογές για τις εντερικές λοιμώξεις του ανθρώπου. Επομένως η ανεύρεση ανθεκτικών στελεχών στους χοίρους αποτελεί πρόβλημα για τη Δημόσια Υγεία.

Δεδομένου ότι η αύξηση της ανθεκτικότητας στην *E. coli* O157 που ανευρίσκεται στα παραγωγικά ζώα είναι δυνατόν να μεταφερθεί στους ανθρώπους, χρειάζεται συνεχής επιτήρηση, προκειμένου να διασφαλισθεί η Δημόσια Υγεία.

#### **4.2.2. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)**

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα από τα πιο σπουδαία παθογόνα βακτήρια στον άνθρωπο και στα ζώα με αποτέλεσμα η επιδημιολογία, η παθολογία και η ανθεκτικότητα του στα αντιμικροβιακά φάρμακα να έχει μελετηθεί εκτενώς. Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα από τα πρώτα βακτήρια στα οποία παρατηρήθηκε η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα (Aarestrup και Schwarz, 2006).

Σε μια πρόσφατη μελέτη ανθεκτικότητας ανάμεσα σε 4.065 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από 21 εργαστήρια νοσοκομείων 19 χωρών βρέθηκε ότι ο επιπολασμός της ανθεκτικότητας κυμαινόταν από 0 ως 63% για την μεθικιλίνη, από 1 ως 70% για την ερυθρομυκίνη και 1 ως 73% για τις τετρακυκλίνες (Zinn, et al., 2004).

Ιδιαίτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία έχει ο MRSA (Methicillin-Resistant

*Staphylococcus aureus*). Το πρώτο MRSA στέλεχος εμφανίστηκε λίγο μετά την εισαγωγή στην κλινική πράξη των ανθεκτικών στις β-λακταμάσες πενικιλινών, όπως η μεθικιλίνη στις αρχές του 1960. Εως τα τέλη της δεκαετίας του 1970 στελέχη MRSA απομονώθηκαν από όλα τα νοσοκομεία παγκοσμίως (Jansen et al., 2006). Τα τελευταία 20 χρόνια στελέχη MRSA αποτελούν μία από τις κύριες αιτίες ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων.

Εκτός όμως από τα νοσοκομειακά στελέχη (hospital-acquired MRSA strains ή HA-MRSA) ανακαλύφθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1990 και στελέχη στο ευρύτερο κοινωνικό περιβάλλον (community-acquired MRSA strains ή CA-MRSA) που παρουσίαζαν αυξητικές τάσεις δημιουργώντας έτσι περαιτέρω δυσκολία στη θεραπεία των λοιμώξεων από MRSA.

Στην Ευρώπη ο επιπολασμός του MRSA κυμαίνεται από <1% στη Βόρεια Ευρώπη μέχρι >40% στη Νότια και Δυτική Ευρώπη (Tiemersma et al., 2004). Τα MRSA στελέχη προκαλούν λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών ιστών, νεκρωτική πνευμονία, βακτηριαμία, σηψαιμία και θάνατο.

Η ανθεκτικότητα του MRSA οφείλεται σε τροποποίηση των PBPs πρωτεϊνών και κυρίως της PBP2a, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *mec-A*. Παλαιότερα πιστεύονταν πως ο MRSA προερχόταν από μια μοναδική γενετική διαδικασία κατά την οποία γονιδιακή κασέτα (staphylococcal cassette chromosome, SCCmec) μεταφερόταν από έναν κοαγκουλάση-αρνητικό σταφυλόκοκο στο γονιδίωμα του *Staphylococcus aureus* και ενσωματωνόταν κοντά στην *oriF* (origin of replication) περιοχή. Σήμερα είναι φανερό ότι αυτή η διαδικασία έχει συμβεί πολλές φορές και σε ένα μεγάλο αριθμό περιπτώσεων (Grundmann, et al., 2006).

Ο MRSA σπάνια απομονώνεται από τα ζώα αν και έχουν απομονωθεί στελέχη MRSA από βοοειδή, ορνιθοειδή, άλογα, σκύλους και γάτες. Τα περισσότερα στελέχη από τα παραπάνω που έχουν απομονωθεί οφείλονται σε μόλυνση ζώων από ανθρώπους. Η πρώτη απομόνωση του MRSA από ζώα αναφέρθηκε το 1972 από μαστίτιδα σε αγελάδες (Devriese et al., 1972). Αυτό το στέλεχος απομονώθηκε από 20 διαφορετικές εκτροφές γαλακτοπαραγωγών αγελάδων, και ήταν πιθανόν ο ίδιος κλώνος. Μελέτες ευαισθησίας στελεχών του *S. aureus*, που απομονώθηκαν από περιστατικά μαστίτιδας γαλακτοπαραγωγών αγελάδων και συλλέχθηκαν από διάφορες χώρες έδειξαν ότι ανθεκτικότητα σε οξακιλλίνη ή



μεθυκυλλίνη εμφανίζεται σε χαμηλή συχνότητα στις χώρες αυτές, πράγμα που σημαίνει ότι στελέχη MRSA ανευρίσκονται ανάμεσα σε στελέχη του *S. aureus* που απομονώνονται από εκτροφές γαλακτοπαραγωγών αγελάδων.

Στις παραπάνω μελέτες παρόλο που δεν διερευνήθηκε το γενετικό υπόβαθρο της ανθεκτικότητας, παρουσιάζεται μια τάση αύξησης της εμφάνισης του MRSA στις εκτροφές βοοειδών καταδεικνύοντας την ανάγκη παρακολούθησης του βαθμού εξάπλωσής του.

Άλλωστε ο MRSA που ανευρίσκεται σε αγελαδινό γάλα μπορεί εύκολα να μεταδοθεί στους ανθρώπους, ιδίως με την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος. Μετά από το περιστατικό του 1972 δεν υπήρχαν άλλες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία με εξαίρεση μια πρόσφατη μελέτη, στην οποία αναφέρεται η απομόνωση 12 στελεχών MRSA από αγελαδινό γάλα στη Νότια Κορέα (Lee, 2003).

Επίσης στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι απομονώθηκαν στελέχη MRSA και από ορνιθοειδή. Η γενετική ανάλυση των στελεχών που απομονώθηκαν από βοοειδή και ορνιθοειδή ήταν πανομοιότυπη με τα στελέχη MRSA που απομονώθηκαν από ανθρώπους στα νοσοκομεία.

Το 2007 απομονώθηκε στην Ολλανδία από τους χοίρους ένα νέο στέλεχος MRSA, το MRSA sequence type 398 (MRSA ST398), το οποίο μπορεί να μεταφερθεί στους ανθρώπους. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τον σπουδαίο ρόλο που παίζει το περιβάλλον και τα παραγωγικά ζώα στην επιδημιολογία του MRSA (Gaze et al., 2008).

#### **4.2.3. *Campylobacter* spp.**

Το καμπυλοβακτηρίδιο (*Campylobacter* spp.) ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1973 ως παθογόνος αιτιολογικός παράγοντας σε περιστατικά οξείας διάρροιας σε ανθρώπους, ενώ σήμερα αποτελεί το βακτήριο που διαγιγνώσκεται πιο συχνά σαν αίτιο της βακτηριακής γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο παγκοσμίως. Συνήθως η μόλυνση από *Campylobacter* spp. στον άνθρωπο δεν απαιτεί θεραπεία, καθώς αυτοπεριορίζεται και είναι

κλινικά ήπια. Ωστόσο σε ορισμένες σοβαρές περιπτώσεις εντερίτιδας, σηψαιμίας και άλλων μη εντοπισμένων στο έντερο λοιμώξεων απαιτείται αντιμετώπιση με αντιμικροβιακά φάρμακα κυρίως μακρολίδια, φθοριοκινολόνες και αμινογλυκοσίδες, ενώ στην περίπτωση ανθεκτικών στελεχών χρησιμοποιούνται άλλα αντιμικροβιακά.

Η συνηθέστερη πηγή μόλυνσης του ανθρώπου είναι τα μολυσμένα τρόφιμα και κυρίως το κρέας ορνιθοειδών που αποτελεί δεξαμενή του *Campylobacter* sp. Επομένως η παρουσία ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά φάρμακα στελεχών στην τροφική αλυσίδα αποτελεί μεγάλο κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία (Engberg, et al., 2004).

Στα παραγωγικά ζώα το *Campylobacter jejuni* βρίσκεται κυρίως στα βοοειδή, στα παχυνόμενα ορνίθια και στις γαλοπούλες, ενώ το *Campylobacter coli* βρίσκεται συχνότερα στους χοίρους.

Το *Campylobacter* παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιμικροβιακά, όπως μακρολίδια, κινολόνες, τετρακυκλίνες, β-λακτάμες, αμινογλυκοσίδες, τριμεθοπρίμη (ειδικά στην τριμεθοπρίμη παρουσιάζει εγγενή ανθεκτικότητα), ενώ έχουν βρεθεί και στελέχη με πολλαπλή ανθεκτικότητα (MDR:Multiple drug resistance). Ειδικά η ανθεκτικότητα του *Campylobacter* spp. στις κινολόνες και στα μακρολίδια, έχει δημιουργήσει μεγάλο πρόβλημα στη Δημόσια Υγεία.

Συγκεκριμένα τα μακρολίδια αποτελούν το φάρμακο εκλογής για την εντερίτιδα που προκαλείται από το *Campylobacter jejuni* και *Campylobacter coli*, ενώ οι φθοριοκινολόνες αποτελούν την πρώτη επιλογή για την συμπτωματική θεραπεία μιας πιθανής βακτηριακής γαστρεντερίτιδας των ανθρώπων. Η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών του *Campylobacter* στα παραπάνω αντιμικροβιακά φάρμακα έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία της θεραπευτικής αγωγής στον άνθρωπο, με επακόλουθο να τίθεται σε κίνδυνο η Δημόσια Υγεία.

Η πρώτη μελέτη που απέδειξε ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ της χρήσης φθοριοκινολονών στα παραγωγικά ζώα και την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του *Campylobacter* spp. έγινε στην Ολλανδία (Endtz, et al., 1991). Το 1987 άρχισε η κτηνιατρική χρήση της ενροφλοξακίνης στην Ολλανδία, οπότε πριν το 1987 δεν είχαν απομονωθεί στελέχη του *Campylobacter* spp. ανθεκτικά στις φθοριοκινολόνες, ούτε από τα πουλερικά και τα παράγωγα τους, ούτε από τους ανθρώπους. Μέσα στην ίδια χρονιά όμως βρέθηκε ότι σε

ποσοστό 8,4% στελέχη του *Campylobacter* spp. που απομονώθηκαν από παράγωγα πουλερικών ήταν ανθεκτικά στην ενροφλοξακίνη, ενώ το 1993 το ποσοστό αυξήθηκε στο 29%. Ταυτόχρονα αυξήθηκαν και τα ποσοστά των ανθεκτικών στελεχών που προκαλούν λοίμωξη στον άνθρωπο από 8% το 1988 στο 29% το 1997 (Endtz et al., 1991; Talsma et al., 1999). Σε ορισμένες χώρες η αύξηση του ποσοστού των ανθεκτικών στελεχών είναι σταθερή, ενώ σε άλλες ραγδαία όπως π.χ στο Hong-Kong όπου το 86% των στελεχών *Campylobacter jejuni* που απομονώθηκαν από τους ανθρώπους ήταν ανθεκτικά στις κινολόνες (Engberg et al., 2006).

Η μόλυνση του ανθρώπου από το *Campylobacter* spp. σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες οφείλεται κυρίως στην κατανάλωση ατελώς ψημένου κρέατος κοτόπουλου (το οποίο μολύνεται από το εντερικό περιεχόμενο κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του σφάγιου), ενώ σε μικρότερο βαθμό στην επαφή με κατοικίδια ζώα, πόσιμο νερό, γάλα κ.λπ.

Το γεγονός ότι τα πουλερικά αποτελούν την κυριότερη πηγή μόλυνσης επιβεβαιώνεται από ότι κατά τη διάρκεια της κρίσης με τις διοξίνες στο Βέλγιο που αποσύρθηκαν προϊόντα πουλερικών από την αγορά παρατηρήθηκε μείωση κατά 40% της μόλυνσης από το *Campylobacter* spp. (Vellinga και Van Loock., 2002). Επιπλέον, η χρήση φθοριοκινολονών στα παραγωγικά ζώα δεν είναι η μοναδική πίεση επιλογής που ασκείται στα *Campylobacter* sp. προκειμένου να επιλεγούν ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη του, δεδομένου ότι και η χρήση των φαρμάκων αυτών στον άνθρωπο επίσης δρά επιλεκτικά για τη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών. Από έρευνες με βάση μοριακές μεθόδους (PCR) εξέτασης των ανθεκτικών στελεχών του *Campylobacter jejuni* που απομονώθηκαν από ανθρώπους και πουλερικά στις Η.Π.Α., αποδείχθηκε ότι πρόκειται για ίδια στελέχη (Smith, et al., 1999).

Στις Η.Π.Α. η χρήση ενροφλοξακίνης στα πουλερικά απαγορεύτηκε από τον Σεπτέμβριο του 2005, ενώ στον Καναδά υπήρχε απαγόρευση κτηνιατρικής χρήσης φθοριοκινολονών από το 1997. Η απόφαση αυτή των Η.Π.Α. βασίστηκε στα παρακάτω συμπεράσματα της αρμόδιας επιτροπής (Davidson, 2004) :

- 1) Η χρήση ενροφλοξακίνης στα πουλερικά συνιστά πίεση επιλογής για την αύξηση και τη διάδοση ανθεκτικών στις φθοριοκινολόνες στελεχών του *Campylobacter* spp.

2) Υπάρχουν αποδείξεις ότι τα ανθεκτικά αυτά στελέχη μπορεί να μεταδοθούν από τα πουλερικά στον άνθρωπο και να προκαλέσουν τροφολοιμώξεις.

Οι λοιμώξεις από στελέχη του *Campylobacter* ανθεκτικά στις φθοριοκινολόνες έχουν δυσμενή επίπτωση στην υγεία του ανθρώπου.

Πρέπει να τονισθεί ότι λοιμώξεις του ανθρώπου από στελέχη του *Campylobacter* ανθεκτικά στις φθοριοκινολόνες και στα μακρολίδια μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές επιπλοκές ή ακόμα και το θάνατο σε σύγκριση με τα ευαίσθητα στελέχη (Helms, et al., 2005). Άρα είναι φανερό πόσο μεγάλη σημασία για τη Δημόσια Υγεία έχουν τα ανθεκτικά στελέχη του *Campylobacter* spp. δεδομένης της σύνδεσης τους με τη χρήση ειδικά των φθοριοκινολονών στα παραγωγικά ζώα (κυρίως πουλερικά). Επομένως επιβάλλεται η χρήση των φθοριοκινολονών να γίνεται με μεγάλη σύνεση και να χρησιμοποιούνται μόνο στις περιπτώσεις που έχει αποτύχει η θεραπεία με άλλα αντιμικροβιακά φάρμακα.

#### 4.2.4. Ορότυποι της *Salmonella*

Ορότυποι της *Salmonella enterica* είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση αποικίζοντας ποικιλία ξενιστών άμεσα, όπως θηλαστικά, πτηνά, αμφίβια, ερπετά, και έντομα και έμμεσα τα φυτά. Στις ανεπτυγμένες χώρες τα παραγωγικά ζώα και τα προϊόντα τους (κρέας, αυγά, και σε μικρότερο βαθμό γάλα, τυρί) καθώς επίσης και τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν τη κύρια πηγή μόλυνσης του ανθρώπου (Gomez, et al., 1997). Η αναλογία των λοιμώξεων από ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα στελέχη οροτύπων της *Salmonella* έχει αυξηθεί με σταθερό ρυθμό παγκοσμίως και σήμερα αντιπροσωπεύει το 20% έως 40% των λοιμώξεων του ανθρώπου (Centers for Disease Control and Prevention, 2001: *Salmonella* Surveillance, Annual Summary, 2000). Η συμβολή των παραγωγικών ζώων στην μόλυνση του ανθρώπου από ανθεκτικά στελέχη *Salmonella* έχει διερευνηθεί σε πολλές μελέτες. Οι Holberg και συνεργάτες (1984) μελέτησαν την εκδήλωση μιας επιδημίας τροφολοιμώξης που εμφανίστηκε σε πολλές πολιτείες των Η.Π.Α. και οφείλονταν σε

ανθεκτικό στέλεχος του οροτύπου *Salmonella newport*, το οποίο έφερε ένα κοινό πλασμίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη. Τα επιδημιολογικά στοιχεία έδειξαν ως πηγή το μολυσμένο κρέας από το οποίο παρασκευάστηκαν κρεατοσκευάσματα (hamburger) και το οποίο προέρχονταν από μια εκτροφή στην Νότια Ντακότα. Σημαντικό ρόλο επίσης στη μετάδοση ανθεκτικών στελεχών της *Salmonella*, αλλά και των περισσότερων μικροοργανισμών παίζουν τα απόβλητα νερά ή η κοπριά των ζώων που χρησιμοποιούνται για την λίπανση των χωραφιών. Το παραπάνω έχει ως επακόλουθο τη μόλυνση των φυτικών αγροτικών προϊόντων με ανθεκτικά στελέχη μικροοργανισμών.

Από μελέτες η επίκτητη ανθεκτικότητα της *Salmonella* οφείλεται:

- 1) σε μεταλλάξεις χρωμοσωμικών γονιδίων (δομικών και ρυθμιστικών) και
- 2) σε απόκτηση εξωγενών γονιδίων ανθεκτικότητας που μεταφέρονται μέσω πλασμιδίων, ενσωματωμένων και τρανσποζονίων (οριζόντια μεταφορά γονιδίων), και η οποία αποτελεί και το σημαντικότερο τρόπο εξέλιξης των ορότυπων της *Salmonella* για την απόκτηση ανθεκτικότητας (Mc Dermott, 2006).

Η λοίμωξη του ανθρώπου από *Salmonella* είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη αλλά σε περιπτώσεις ασθενών υψηλού κινδύνου χρησιμοποιούνται διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα, όπως αμπικιλίνη, χλωραμφενικόλη και τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη. Η αυξανόμενη όμως ανθεκτικότητα στα παραπάνω αντιμικροβιακά φάρμακα ή τα σοβαρά κλινικά περιστατικά έκαναν αναγκαία τη χρήση φθοριοκινολονών ή κεφαλοσπορινών 3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> γενιάς. Επομένως, η αύξηση της ανθεκτικότητας στα φάρμακα αυτά που αποτελούν σημαντικό όπλο στην αντιμετώπιση της σαλμονέλλωσης, είναι καίριας σημασίας. Από μελέτες προκύπτει ότι η μόλυνση του ανθρώπου από ανθεκτικά στελέχη *Salmonella* είναι κλινικά βαρύτερη από ότι η μόλυνση με ευαίσθητα στελέχη, και συχνά παρουσιάζονται υποτροπές της νόσου, βακτηραιμία, θεραπευτική αποτυχία και θάνατος (Barza, 2002; Glynn, et al., 2004). Θα πρέπει να τονιστεί ότι η σχέση μεταξύ λοιμογόνου δύναμης και ανθεκτικότητας είναι πολύπλοκη και ασαφής, στοιχεία από κλινικές μελέτες δείχνουν ότι στελέχη της *Salmonella typhimurium* (definitive type 104, DT 104) παρουσιάζουν ταυτόχρονα με την ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα και αυξημένη λοιμογόνο

δύναμη (Travers και Barza, 2002). Πάντως η πιθανότητα η έκθεση στα αντιμικροβιακά φάρμακα να λειτουργεί ταυτόχρονα και ως παράγοντας επιλογής για αυξημένη λοιμογόνο δύναμη, δεν έχει κατανοηθεί πλήρως (Guerra, et al., 2002).

Η *Salmonella typhimurium* έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών και μπορεί να βρεθεί σε μεγάλο αριθμό οικόσιτων και άγριων ζωικών ειδών. Από τους 2500 και πλέον ορότυπους της *Salmonella* μόνο δύο οι *enteritidis* και *typhimurium* θεωρούνται ότι εμπλέκονται στην πλειοψηφία των σαλμονελώσεων του ανθρώπου. Στοιχεία από την επιδημιολογική επιτήρηση που πραγματοποιείται σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες (Threlfall et al., 2003) έδειξαν ότι για το έτος 2000 το 54% των λοιμώξεων του ανθρώπου οφείλονται σε *Salmonella enteritidis* και το 25% στη *Salmonella typhimurium*. Από τα δύο αυτά στελέχη η *Salmonella typhimurium* είναι αυτή που εμφανίζει συχνότερα το φαινόμενο της πολλαπλής φαρμακευτικής ανθεκτικότητας (Multi-Drug-Resistance, MDR). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των επιδημικών εκρήξεων που προκαλούνται από *Salmonella typhimurium* MDR είναι η αύξηση και η ευρεία διασπορά, και στη συνέχεια η εξασθένηση διαφόρων λυσίτυπων (phage types) κατά τη διάρκεια των χρόνων.

Στο Ηνωμένο Βασίλειο το στέλεχος DT 29 (definitive type 29) κυριάρχησε στα τέλη του 1960 προκαλώντας λοιμώξεις στα βοοειδή κυρίως μόσχους, αλλά και στους ανθρώπους και ακολούθησε το DT 204 στη δεκαετία του 1970 και το DT 193 στη δεκαετία του 1980.

Στην αρχή της δεκαετίας του 1990 οι σαλμονελώσεις οφείλονταν στο στέλεχος *Salmonella typhimurium* variant DT 104 R-(ACSSuT). Το στέλεχος αυτό παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε πέντε αντιμικροβιακά: την αμπικιλίνη (A), τη γλωραμφαινικόλη ή φλορφαινικόλη (C), τη στρεπτομυκίνη (S), τις σουλφοναμίδες (Su) και την τετρακυκλίνη (T) -ACSSuT.

Το στέλεχος αυτό πρωτοεμφανίστηκε σε γλάρους και βοοειδή στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1984, ενώ πιστεύεται ότι προήλθε από γλάρους και εξωτικά πτηνά που εισήχθηκαν από την Ινδονησία και το Hong-Kong (Threlfall, 2000). Με εξαίρεση μια μικρή επιδημία στη Σκωτία στα μέσα του 1980, στους ανθρώπους δεν είχε απομονωθεί το DT 104 μέχρι το 1989, αν και είχε μεταδοθεί σε όλο το βόρειο πληθυσμό του Ηνωμένου Βασιλείου. Στα επόμενα πέντε χρόνια το στέλεχος DT 104 έγινε επιδημικό στον πληθυσμό των βοοειδών

ταυτόχρονα όμως εντοπίστηκε και σε πουλερικά (ειδικά γαλοπούλες), χοίρους και πρόβατα, σε αντίθεση με τους προηγούμενους τύπους DT 29, 204, 193 που εντοπίζονταν μόνο σε βοοειδή. Από τότε το στελέχος MDR DT 104 έχει διαδοθεί σε πολλές περιοχές του κόσμου και έχει απομονωθεί από διάφορα είδη ζώων, ενώ η μετάδοση του στον άνθρωπο γίνεται κυρίως με την κατανάλωση μολυσμένων ζωικών προϊόντων και λιγότερο με την επαφή με τα παραγωγικά ζώα. Είναι γεγονός ότι σε ορισμένες χώρες το DT 104 έχει γίνει ο κυρίαρχος τύπος της *Salmonella typhimurium*, ενώ σε άλλες χώρες παραμένει σπάνιο.

Η ανθεκτικότητα του DT 104 τύπου στα αντιμικροβιακά, όπως επίσης και η εμφανής ικανότητά του να προκαλεί σοβαρή νόσο που πολλές φορές σχετίζεται με την εντόπισή του εκτός του γαστρεντερικού σωλήνα αποτελεί αντικείμενο ανησυχίας. Ωστόσο σε μελέτη που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο διαπιστώθηκε ότι το MDR DT 104 δεν είναι περισσότερο λοιμογόνο από ότι οι άλλοι κοινοί ορότυποι και λυσίτυποι (Threlfall et al., 1998). Ωστόσο χρειάζονται περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες για να διερευνηθεί η λοιμογόνος του δύναμη όσον αφορά τον άνθρωπο. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι στελέχη του DT 104 έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα και σε άλλα αντιμικροβιακά φάρμακα όπως στη τριμεθοπρίμη, στο συνδυασμό τριμεθοπρίμης με σουλφοναμίδη, στο ναλιδιξικό οξύ, στη σιπροφλοξακίνη και στις κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> γενεάς. Έχει διατυπωθεί (Threlfall et al., 1997) ότι η ανθεκτικότητα στην τριμεθοπρίμη προέκυψε από τη χρήση της στα βοοειδή για την αντιμετώπιση των DT 104 R-(ACSSuT) στελεχών, ενώ η χρήση των κινολονών στα βοοειδή και στα πουλερικά για θεραπεία και προφύλαξη πυροδότησε την έναρξη ανθεκτικότητας στη σιπροφλοξακίνη και στο ναλιδιξικό οξύ.

Πάντως πρέπει να τονισθεί ότι ενώ η σιπροφλοξακίνη αποτελεί το φάρμακο εκλογής για σοβαρές λοιμώξεις με στελέχη DT 104, η παρουσία στελεχών ανθεκτικών σε αυτή εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους για τη Δημόσια Υγεία (Danielsen, 2003; Molbak, 2006).

Το γενετικό υπόβαθρο που καθορίζει την πολλαπλή ανθεκτικότητα των στελεχών DT 104 της *Salmonella typhimurium* έχει μελετηθεί αρκετά καλά. Η πλειοψηφία των στελεχών που έχουν απομονωθεί διαθέτουν μια ευδιάκριτη χρωμοσωμική ομάδα γονιδίων (gene cluster) που κωδικοποιεί το πλήρες φάσμα ανθεκτικότητάς τους στα πέντε αντιμικροβιακά φάρμακα

(ACSSuT).

Ο γενετικός τύπος αποτελείται από τα floR (ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη/φλορφαινικόλη) και tetG (ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες) γονίδια που πλευρικά τους έχουν δύο ενσωματόνια κλάσης 1, τα οποία στην περιοχή 3' φέρουν το γονίδιο sul1 (ανθεκτικότητα στις σουλφοναμίδες) και στην κεντρική περιοχή τους φέρουν τις κασέτες γονιδίων aadA2 (ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη και σπεκτινομυκίνη) και pse- (ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη). Έχει αναφερθεί ότι τα ενσωματόνια ενώ εντοπίζονται κυρίως στα χρωμοσώματα συχνά έχουν εντοπισθεί και σε πλασμίδια, επομένως και αυτά με τη σειρά τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση της ανθεκτικότητας.



## 5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Οι μέθοδοι ελέγχου ευαισθησίας και αντοχής βακτηρίων στα αντιβιοτικά είναι οι εξής:

- Μέθοδος διάχυσης στο άγαρ από δισκία χαρτιού εμποτισμένα με αντιβιοτικά και μέθοδος αραιώσης στο άγαρ.
- Μέθοδοι προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής (MIC) και μικροβιοκτόνου (MBC) συγκέντρωσης του αντιβιοτικού. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων και μέθοδος τελικού σημείου (breakpoint).
- Μέθοδοι προσδιορισμού συνδυασμού αντιβιοτικών.
- Μέθοδοι προσδιορισμού στάθμης του αντιβιοτικού στο αίμα.

Εκτός αυτών υπάρχουν και άλλες ειδικότερες μέθοδοι όπως ανοχής, επαγωγικής αντοχής κ.ά. Στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη εφαρμόζονται οι δύο πρώτες μέθοδοι, με τις οποίες επιδιώκεται η γρήγορη και ασφαλής αναγνώριση του βακτηρίου που απομονώνεται και τα αντιβιοτικά που μπορούν να χορηγηθούν. Μετά από πολλές και μακροχρόνιες μελέτες έγινε γενικά παραδεκτό ότι η μέθοδος που ενδείκνυται για ταχεία ανάγνωση αποτελεσμάτων είναι αυτή της διάχυσης στο άγαρ από δισκία χαρτιού εμποτισμένα με αντιβιοτικά ή Kirby-Bauer. Η προτυποποίηση αφορά στην επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού υλικού, σε σύνθεση και σε ποσότητα κατά τρυβλίο, την προτύπωση του ενοφθαλμίσματος και ιδιαίτερα τη σχέση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC).

Πιο ακριβής και με στενότερη σχέση με την MIC είναι η μέθοδος αραιώσεως στο άγαρ. Σ' αυτήν ενσωματώνονται αραιώσεις αντιβιοτικού μέσα στο άγαρ που φέρεται σε τρυβλία. Σε κάθε τρυβλίο μπορούν να δοκιμαστούν πολλά βακτήρια. Η μέθοδος είναι δύσκολη στην εκτέλεση και την ερμηνεία της και εφαρμόζεται σε Ειδικά Κέντρα ή Βιομηχανικά Εργαστήρια παραγωγής αντιβιοτικών, όπου δοκιμάζονται πολλά στελέχη και είδη μικροβίων.

## 5.1. ΜΕΘΟΔΟΣ KIRBY-BAUER ή ANTIBIOΓΡΑΜΜΑ

Είναι η μέθοδος εκλογής για την δοκιμασία ευαισθησίας των αερόβιων και ταχείας ανάπτυξης μη απαιτητικών βακτηρίων. Με αυτήν διαχωρίζονται τα μικρόβια σε ευαίσθητα, μέτρια ευαίσθητα, και ανθεκτικά.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ : Είναι μέθοδος διάχυσης του αντιβιοτικού σε στερεό υλικό από δισκία διηθητικού χαρτιού εμποτισμένα με αντιβιοτικά. Η διαφορά της από τις υπόλοιπες μεθόδους είναι ότι είναι προτυποποιημένη. Η προτυποποίηση γίνεται συνεχώς από την NCCLS. Αυτό σημαίνει ότι εφόσον τηρηθούν όλες οι τεχνικές οδηγίες, τότε το μέγεθος της διαμέτρου αναστολής ανάπτυξης του μικροοργανισμού που σχηματίζεται γύρω από το δισκίο είναι ανάλογο με την MIC του αντιβιοτικού.

Μετά την παρασκευή του ενοφθαλμίσματος, τη σπορά, την τοποθέτηση των δισκίων και την επώαση γίνεται η ανάγνωση των αποτελεσμάτων κατά την οποία μετρούνται οι ζώνες αναστολής ανάπτυξης γύρω από κάθε δισκίο με την πιο δυνατή ακρίβεια. Από την έκταση της ζώνης γίνεται ο χαρακτηρισμός του μικροβίου σαν ευαίσθητο, μέτρια ευαίσθητο ή ανθεκτικό βάσει των ειδικών πινάκων στους οποίους αναγράφεται η έκταση των ζωνών αναστολής που αναμένεται να έχουν τα ταχείας ανάπτυξης μη απαιτητικά μικρόβια , βάσει της οποίας θα χαρακτηριστούν ως:

1. ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ : Το βακτήριο καταστρέφεται από τις συνήθεις δόσεις του αντιβιοτικού.
2. ΜΕΤΡΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ : Το βακτήριο είναι ευαίσθητο και μπορεί να ανασταλεί με τις θεραπευτικές δόσεις, αλλά μπορεί και όχι. Είναι προτιμότερο να χορηγηθεί άλλο αντιβιοτικό.
3. ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ : Χαρακτηρίζεται το μέτρια ευαίσθητο βακτήριο έναντι αντιβιοτικών με στενό θεραπευτικό φάσμα. Επίσης όταν η ζώνη αναστολής δεν έχει σαφή όρια για να χαρακτηριστεί σαν ευαίσθητο, όπως αυτό μπορεί να συμβεί στον σταφυλόκοκκο.
4. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ: Το συγκεκριμένο αντιβιοτικό δεν χορηγείται σαν φάρμακο

μονοθεραπείας. Σε ορισμένες περιπτώσεις χορηγείται σε συνδυασμό με αντιβιοτικό προς το οποίο το βακτήριο είναι ευαίσθητο (π.χ. ενδοκαρδίτιδες).

### **ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ Kirby-Bauer**

1. Είναι τεχνική απλή και δίνει γρήγορα αποτελέσματα.
2. Έχει μεγάλη επαναληψιμότητα.
3. Είναι σχετικά φτηνή.
4. Δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό.
5. Προσφέρει μεγάλη ευελιξία στην επιλογή αντιβιοτικών.

### **ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ Kirby-Bauer**

- Είναι προτυποποιημένη μόνο για ορισμένα βακτήρια
- Απαιτεί αυστηρή εφαρμογή του πρωτοκόλλου
- Απαιτείται προσδιορισμός MIC

## **5.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ή MIC**

**ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ :** Σε σειρά διαδοχικών αραιώσεων του αντιβιοτικού προστίθεται προτυποποιημένο (γνωστής περιεκτικότητας σε cfu/ml) εναιώρημα του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Η τελευταία αραιώση του αντιβιοτικού στην οποία παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού αντιπροσωπεύει την MIC. Η δοκιμή αυτή εκτελείται σε πλακες μικροτιτλοποίησης (μικρομέθοδος) και σε δοκιμαστικούς σωλήνες (μακρομέθοδος). Η μικρομέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι οι μικροπλάκες με αραιώσεις αντιβιοτικών σε κατάσταση αφυδάτωσης στα βυθίσματα προσφέρονται έτοιμες στο εμπόριο, σε αντίθεση με τη μακρομέθοδο στην οποία οι αραιώσεις των αντιβιοτικών πραγματοποιούνται στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας μητρικά διαλύματα καθαρών ουσιών.

**ΤΕΧΝΙΚΗ :** Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης υπάρχουν 4,5,6 ή 8 διαφορετικά αντιβιοτικά

σε αραιώση. Τα ενοφθαλμίσματα παρασκευάζονται από 4-5 καθαρές αποικίες 18ώρου, σε διάλυμα Muller-Hinton και ρυθμίζεται η θολερότητα στο 0,5 της κλίμακας McFarland. Η σπορά του ενοφθαλμίσματος στα βυθίσματα με τις αραιώσεις των αντιβιοτικών γίνεται με αυτόματη πιπέτα σε όγκους 0,005-0,1 ml. Η πλάκα καλύπτεται με ελαστική αυτοκόλλητη μεμβράνη και επωάζεται στους 35 C για 16-20 ώρες.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου σε κάθε μικροπλάκα τοποθετούνται οι ακόλουθοι μάρτυρες :

**ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ :** Σε ένα βύθισμα τοποθετείται το βακτηριακό ενοφθαλμίσμα χωρίς αντιβιοτικό

**ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑΣ :** Σε ένα βύθισμα τοποθετείται μόνο ο ζωμός. Παράλληλα γίνεται καλλιέργεια του ενοφθαλμίσματος σε ένα τρυβλίο με αιματούχο άγαρ, για τον έλεγχο της καθαρότητας του ενοφθαλμίσματος.

**ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ :** Με γυμνό οφθαλμό αξιολογείται ο βαθμός θολερότητας στα βυθίσματα αρχίζοντας από το πρώτο με την μεγαλύτερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού και συγκρίνοντας με τον αρνητικό (διαυγή) μάρτυρα. Η πρώτη αραιώση του αντιβιοτικού στην οποία δεν παρατηρείται ανάπτυξη του μικροοργανισμού που ενοφθαλμίστηκε (διαυγές) αντιπροσωπεύει την MIC.

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (MBC- Minimal Bacteriocidal Concentration) :** Η τελευταία από τις διαδοχικές αραιώσεις του αντιβιοτικού όπου θανατώνεται το 99,9% των βακτηρίων του εναιωρήματος γνωστής περιεκτικότητας σε cfu/ml, καλείται MBC.

### **5.3. ΕΤΟΙΜΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ**

Διακρίνονται σε συστήματα δια χειρός, ημί- και πλήρως αυτοματοποιημένα. Η υπηρεσία Food and Drug Administration (FDA) των ΗΠΑ όρισε ορισμένα κριτήρια για την κυκλοφορία στο εμπόριο και εφαρμογή τους σε κλινικά εργαστήρια των έτοιμων συστημάτων ελέγχου ευαισθησίας.

Προϋπόθεση για το παραπάνω είναι τα αποτελέσματα τους από τουλάχιστον 100 κλινικά στελέχη να συγκρίνονται με τη μέθοδο αραιώσεων σε ζωμό (μέθοδος αναφοράς) και για να θεωρηθούν ικανοποιητικά, πρέπει τα πολύ μεγάλα σφάλματα να είναι <1,5%, τα μεγάλα σφάλματα να είναι <3% και η συμφωνία με την μέθοδο αναφοράς ( ±1 αραιώση ) να είναι σε ποσοστό ≥90% των αποτελεσμάτων της μεθόδου αναφοράς.

### **5.3.1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑ ΧΕΙΡΟΣ: E-Test (AB Biodisk)**

Πρόκειται για μέθοδο κλιμακωτής (gradient) διάχυσης. Οι ταινίες E-Test (strips) έχουν περίπου 15 διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Ενοφθαλμίζεται συγκεκριμένο μικροβιακό εναιώρημα σε ΜΗ άγαρ και τοποθετείται η ανάλογη ταινία. Μετά την επώαση δημιουργείται ζώνη αναστολής σε σχήμα έλλειψης. Το σημείο εκείνο της ταινίας που συναντά την έλλειψη αντιπροσωπεύει την MIC του αντιβιοτικού που εξετάζεται. Το εναιώρημα, ο ενοφθαλμισμός και η επώαση πραγματοποιούνται όπως στην μέθοδο Kirby-Bauer. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ο προσδιορισμός της MIC σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* ).

### **5.3.2. ΗΜΙΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ**

#### **ATB system (bioMerieux)**

Πρόκειται για ταινία με 22 βυθίσματα τα οποία περιέχουν τα αντιβιοτικά σε αποξηραμένη μορφή. Το κάθε αντιβιοτικό περιλαμβάνεται σε δύο κρίσιμες συγκεντρώσεις (μικρή και μεγάλη). Γίνεται προσθήκη του βακτηριακού εναιωρήματος και μετά από επώαση 18-24 ωρών γίνεται ανάγνωση των αποτελεσμάτων σε ειδικό μηχάνημα: ανάπτυξη ( εμφάνιση θολερότητας) και στις δύο συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού σημαίνει αντοχή, καμία ανάπτυξη σημαίνει ευαισθησία και ανάπτυξη μόνο στη μικρή συγκέντρωση ενδιάμεση ευαισθησία. Η

ανάγνωση μπορεί να γίνει και απευθείας με γυμνό οφθαλμό .

### **MICROSCAN, AUTOSCAN-4 (DABE BEHRING)**

Αποτελείται από έτοιμες πλάκες μικροτιτλοποίησης για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της MIC ή breaking points (BP) των Gram(+) και Gram(-) μικροβίων. Το σύστημα εξασφαλίζει πραγματικές MIC ή BP τιμές ανεξάρτητες από την ταυτοποίηση του βακτηρίου, έχει δυνατότητα ταυτόχρονης ταυτοποίησης και MIC ή BP, ελαχιστοποιεί την ανάγκη για έλεγχο επιπλέον ιδιοτήτων , δίνει αποτελέσματα ταυτοποίησης και MIC ή BP σε 16-18 ώρες για τα Gram(-) και Gram(+), έχει εύκολο και γρήγορο εμβολιασμό κάθε ομάδας δοκιμασιών με μία μόνο κίνηση με την βοήθεια ειδικού εξαρτήματος (RENOK ). Δίνει τη δυνατότητα ανάγνωσης των δοκιμασιών με γυμνό οφθαλμό και διαθέτει ένα πολύ αναπτυγμένο λογισμικό για την διαχείριση και την αποθήκευση των πληροφοριών.

### **Wider I σύστημα (Francisco Soria Melguizo, S.A.)**

Πρόκειται για ημιαυτόματο σύστημα, το οποίο επεξεργάζεται εικόνα για την ταυτοποίηση και έλεγχο ευαισθησίας σε πλάκες με συγκεκριμένες αραιώσεις αντιβιοτικών, σύμφωνα με την CLSI. Το σύστημα διαθέτει λογισμικό για την ψηφιακή επεξεργασία των απεικονίσεων και μετατροπή τους σε αριθμητικές τιμές , εξελιγμένο πρόγραμμα «expert rules» σύμφωνα με τους κανόνες της CLSI με δυνατότητα συνεχούς ενημέρωσης με τα νεότερα δεδομένα, προγράμματα αρχειοθέτησης, αναζήτησης και ελέγχου ποιότητας των αποτελεσμάτων.

## **5.4. ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ**

Πρόκειται για μέθοδο μικροαραιώσης με τη χρησιμοποίηση 64- μικροϋποδοχών, μία υποδοχή ελέγχου ανάπτυξης βακτηρίου και υποδοχές προμετρημένων ποσοτήτων 19-20 αντιμικροβιακών παραγόντων σε συνδυασμό με υλικό καλλιέργειας. Αφού γίνει το εναιώρημα συγκεκριμένης θολερότητας, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, η πλήρωση, το σφράγισμα της κάρτας και η τοποθέτηση της στη μονάδα επώασης και ανάγνωσης του οργάνου γίνεται αυτοματοποιημένα. Γίνεται παρακολούθηση ανάπτυξης σε κάθε υποδοχή της κάρτας ανά 15 min (φθορισμός, θολερότητα, χρώμα) και προσδιορίζεται η MIC σε 4-18 ώρες. Μπορεί να γίνει επαγωγή αποτελεσμάτων για 4-10 επιπλέον αντιβιοτικά, έτσι ώστε να δίνονται αποτελέσματα για 23-30 αντιβιοτικά συνολικά ανά κάρτα. Συνοδεύεται από ειδικό σύστημα, για την ερμηνεία και διόρθωση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τους κανόνες του CLSI.

#### **5.4.1. Phoenix σύστημα (BD Diagnostics Systems)**

Πρόκειται για μακρομέθοδο. Περιλαμβάνει σειρά ιδιοτήτων ταυτοποίησης και αντιβιογράμματος. Για το αντιβιογράμμα, περιλαμβάνει 84 βυθίσματα και ένα βύθισμα ως μάρτυρα ανάπτυξης. Υπάρχουν τουλάχιστον 3 αραιώσεις ανά αντιβιοτικό. Ο τρόπος ανάγνωσης είναι διπλός: θολερότητα ως δείκτης ανάπτυξης και χρώμα ως αντίδραση μικροβιακού μεταβολισμού. Γίνεται μέτρηση ανάπτυξης κινητικής μορφής ανά 20 min. Με το σύστημα γίνεται προσδιορισμός της MIC. Συνοδεύεται από το σύστημα BDxpert TM για την ερμηνεία και διόρθωση των αποτελεσμάτων, σύμφωνα με τους κανόνες του CLSI.

#### **5.4.2. Microscan WalkAway σύστημα (Dade Behring)**

Είναι ανάλογο σύστημα με το Microscan, Autoscan-4 με την διαφορά ότι η επώαση και ανάγνωση των πλακών γίνεται αυτοματοποιημένα.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Κύριος στόχος αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση της μικροβιακής αντοχής σε στελέχη *E.coli* , - η οποία αποτελεί κοινό βακτήριο στα παραγωγικά ζώα και στον άνθρωπο - σε κόπρανα χοίρων πάχυνσης, πτηνών και εργατών στις αντίστοιχες κτηνοτροφικές μονάδες.

Για την υλοποίηση της μελέτης πραγματοποιήθηκαν :

- Δειγματοληψία κοπράνων ζώων και εργατών από διάφορες κτηνοτροφικές μονάδες της Κεντρικής και Στερεάς Ελλάδας. Ως σημεία δειγματοληψίας ορίστηκαν επιλεγμένα σφαγεία ή οργανωμένες κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις .
- Εργαστηριακές εξετάσεις για την απομόνωση και την ταυτοποίηση της *E.coli*. Για την απομόνωση της *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλοι μέθοδοι, ενώ ο προσδιορισμός της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά έγινε με τον προσδιορισμό της ελάχιστης δόσης αναστολής (MIC) σε μικροπλάκα, όπως προτείνεται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας. Οι εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## 1. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά τους εαρινούς μήνες του 2008. Συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων από ζώα 37 κτηνοτροφικών μονάδων της ευρύτερης περιοχής της Θεσσαλίας, της Βορείου και Στερεάς Ελλάδας, καθώς και από εργαζόμενους των ίδιων κτηνοτροφικών μονάδων. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν δείγματα από 7 νομούς:

- Νομός Πιερίας (3 δείγματα)
- Νομός Θεσσαλονίκης (11 δείγματα)
- Νομός Φθιώτιδας (17 δείγματα)
- Νομός Καρδίτσας (3 δείγματα)
- Νομός Λάρισας (1 δείγμα)
- Νομός Φωκίδας (2 δείγματα)

Σκοπός αυτού του τρόπου δειγματοληψίας είναι να δημιουργηθούν ζεύγη δειγμάτων έτσι ώστε να γίνει η σύγκριση της αντιβιοαντοχής των στελεχών *E.coli* που θα απομονωθούν από αυτά. Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας έγινε παράλληλη καταγραφή επιδημιολογικών στοιχείων, στα οποία περιλαμβάνονται το είδος του ζώου από το οποίο έγινε λήψη δείγματος κοπράνων και η ηλικία του, καθώς και το φύλο και η ηλικία του εργάτη που έδωσε το δείγμα κοπράνων. Τα παραπάνω συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.(βλέπε Παράρτημα- Πίνακας 1)

Κατά την δειγματοληψία εκτός από την συλλογή δειγμάτων- κοπράνων από τα ζώα συμπληρώθηκε και ερωτηματολόγιο όπου καταγράφονταν στοιχεία που αφορούσαν:

- Το είδος του ζώου
- Την ηλικία του
- Το φύλο
- Τη διατροφή του
- Τον τόπο εκμετάλλευσης

- Τον αριθμό ζώων της μονάδας
- Την περιοχή προέλευσης του ζώου
- Ιστορικό φαρμακευτικής αγωγής του

Ο αριθμός των δειγματοληψιών που έγιναν, καθορίστηκε με βάση τα εξής κριτήρια:

- Επιλογή των κτηνοτροφικών μονάδων από διαφορετικές περιοχές της Ηπειρωτικής Ελλάδας, ώστε το σύνολο των δειγμάτων να είναι όσο γίνεται πιο αντιπροσωπευτικό της γεωγραφικής περιοχής που εξετάστηκε.
- Επιλογή των κτηνοτροφικών μονάδων από τις συγκεκριμένες περιοχές, όπου ανατρέφονται διαφορετικά είδη ζώων, ώστε το σύνολο των δειγμάτων να μην αναφέρεται σε μία κατηγορία ζώων.

Κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες προέκυψαν ορισμένα εμπόδια που δεν επέτρεψαν τη συλλογή περισσότερων δειγμάτων και επιδημιολογικών στοιχείων, με αποτέλεσμα στα αρχικά κριτήρια να προστεθούν τα εξής:

- Η πρόθεση των εργαζομένων στις κτηνοτροφικές μονάδες να συνεργαστούν κατά την συλλογή δειγμάτων κοπράνων ανθρώπινης προέλευσης, έχοντας υπόψη ότι στόχος της δειγματοληψίας είναι να δημιουργηθούν ζεύγη δειγμάτων (ζώο-άνθρωπος).
- Η χρονική διάρκεια των δειγματοληψιών.
- Αδυναμία συνεργασίας με τους εργαζόμενους στις κτηνοτροφικές μονάδες λόγω άγνοιας ή απροθυμίας τους να δώσουν στοιχεία σχετικά με τη διατροφή των ζώων και τη χορήγηση φαρμάκων σε αυτά.
- Πολλά από τα δείγματα των εργατών δεν παραδόθηκαν την ίδια ημέρα.
- Αδυναμία συνεργασίας σε αρκετές περιπτώσεις για την ολοκληρωμένη συμπλήρωση των ερωτηματολογίων που είχαν ετοιμαστεί.

Τα δείγματα των κοπράνων των ζώων συλλέχθηκαν ακολουθώντας τους απαραίτητους κανόνες υγιεινής (γάντια, μάσκα). Τόσο τα ζωικά όσο και τα ανθρώπινα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους περιέκτες και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό ψύξη μέσα σε ισόθερμα δοχεία σε λιγότερο από 24 ώρες από την παραλαβή τους.



ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ :  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΗΛ: 2410 565250

**ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΖΩΩΝ  
(ΧΟΙΡΟΙ-ΠΤΗΝΑ)**

A/A/ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ :

1.ΕΙΔΟΣ ΖΩΟΥ :

2.ΦΥΛΟ :

3.ΗΛΙΚΙΑ :

4.ΔΙΑΤΡΟΦΗ :

5.ΜΕΓΕΘΟΣ ΕΚΜΕΤΑΛΛΕΥΣΗΣ :

6.ΤΟΠΟΣ ΕΚΜΕΤΑΛΛΕΥΣΗΣ :

7.ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΝΩΤΙΟΥ (ΓΙΑ ΧΟΙΡΟΥΣ) :

8. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ :

9. ΜΗΤΡΩΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ

10.ΑΝ ΥΠΑΡΧΕΙ, ΕΙΝΑΙ ΕΝΗΜΕΡΩΜΕΝΟ : ΝΑΙ

ΟΧΙ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ:

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ :

[101]

## ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ:

Από το σύνολο των δειγμάτων (37 ζεύγη δειγμάτων ), τα 18 προέρχονταν από πτηνοτροφικές μονάδες και τα 19 ζεύγη από χοιροτροφικές. Η ηλικία των πτηνων ήταν εως 6 μηνών, των χοίρων εώς 2,5 ετών και των εργατών από 27 εώς 70 ετών.

Στον πίνακα 1 του Παραρτήματος παρουσιάζονται συνοπτικά οι ηλικίες των εργατών, των χοιρων και των πτηνών καθώς και η γεωγραφική περιοχή της κάθε εκμετάλλευσης

## 1.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε μέσα σε 24 ώρες από την ώρα άφιξης τους στο εργαστήριο. Τα στάδια επεξεργασίας που ακολουθήθηκαν είναι:

### 1.2.1. Δημιουργία εναιωρήματος των κοπράνων

Σε στείρο σωληνάριο χωρητικότητας 15ml (Falcon 15ml), προστέθηκαν 10ml αποστειρωμένου νερού και 2μl κοπράνων, κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Κατόπιν, έγινε έντονη ανάδευση με τη βοήθεια μηχανικού αναδευτήρα (vortex), ώστε να δημιουργηθεί εναιώρημα.

### 1.2.2. Ενοφθαλμισμός σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα

Μεταφέρθηκαν ασηπτικά 10μl του εναιωρήματος πάνω στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος MacConkey Agar (MAC) και με τη βοήθεια στείρου κρίκου έγινε η επίστρωση , κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 ώρες σε αερόβιες

συνθήκες.

Το *MacConkey Agar*: Εκλεκτικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, περιέχει λακτόζη, αναστέλλει την ανάπτυξη πολλών Gram + μικροοργανισμών, χωρίς να αναστέλλει την ανάπτυξη των εντεροβακτηριοειδών και ελέγχει τη ζύμωση της λακτόζης (“Biolife”). Η παρασκευή του υποστρώματος έγινε με διάλυση 55 g του αφυδατωμένου υποστρώματος σε 1000 ml απιονισμένου νερού.

Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος μέχρι βρασμού και αποστείρωση του στους 121 °C για 15 min. Μετά το πέρας της αποστείρωσης και ψύξη έως τους 45-50 °C, το υγρό υπόστρωμα μοιράστηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri υπό στείρες συνθήκες, όπου και στερεοποιήθηκε. Τα έτοιμα τρυβλία με το SMAC αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



**Εικόνα 2 – E. coli σε MacConkey Agar**

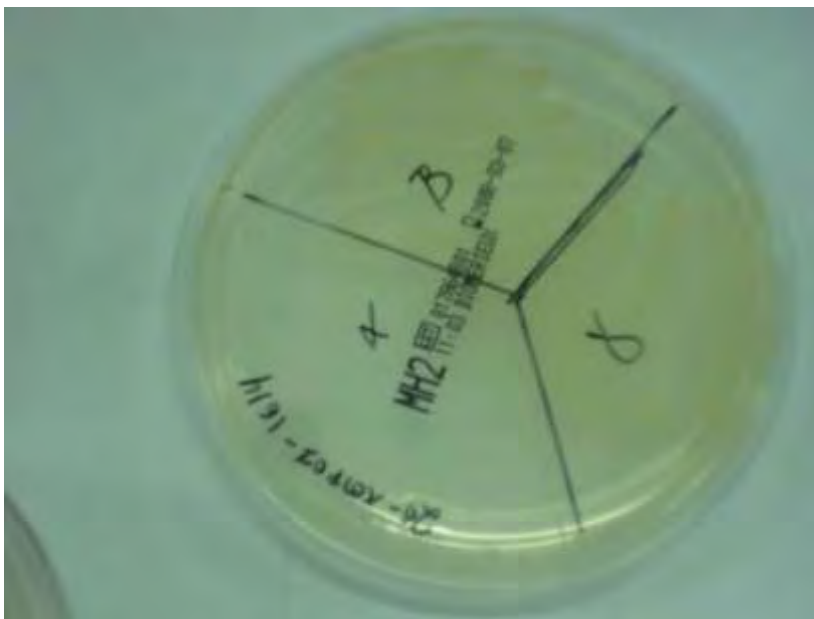
**ΣΥΝΘΕΣΗ *MacConkey Agar***

[103]

Peptone	17 g/l
Peptocomplex	3 g/l
Lactose	10 g/l
Bile Salt	5 g/l
Sodium Chloride(NaCl)	5 g/l
Neutral Red	0,05 g/l
Agar	15 g/l

### 1.2.3. Ανακαλλιέργεια αποικιών σε Nutrient agar (NA)

Οι ύποπτες αποικίες ανακαλλιεργήθηκαν σε NA. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Το NA χωρίστηκε σε 3 τμήματα (α, β, γ) ώστε σε κάθε τμήμα να καλλιεργηθεί μία αποικία για παραπέρα απομόνωση της *E.coli*.



**Εικόνα 3 – Ανακαλλιέργεια σε Nutrient Agar**



## 1.3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

### 1.3.1. Δοκιμή οξειδάσης

Για κάθε αποικία που απομονώθηκε έγινε δοκιμή οξειδάσης. Η δοκιμή οξειδάσης έγινε ως εξής: 2-3 σταγόνες από το διάλυμα Oxidase Reagent της εταιρείας Bio Merieux τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί. Μικρή ποσότητα ύποπτης αποικίας επιστρωνόταν με κρίκο εμβολιασμού πάνω στο διηθητικό χαρτί. Η εμφάνιση ιώδους χρώματος σήμαινε θετικό αποτέλεσμα (παρουσία ενζύμου της κυτόχρωμου οξειδάσης).

### 1.3.2. Δοκιμή ινδόλης

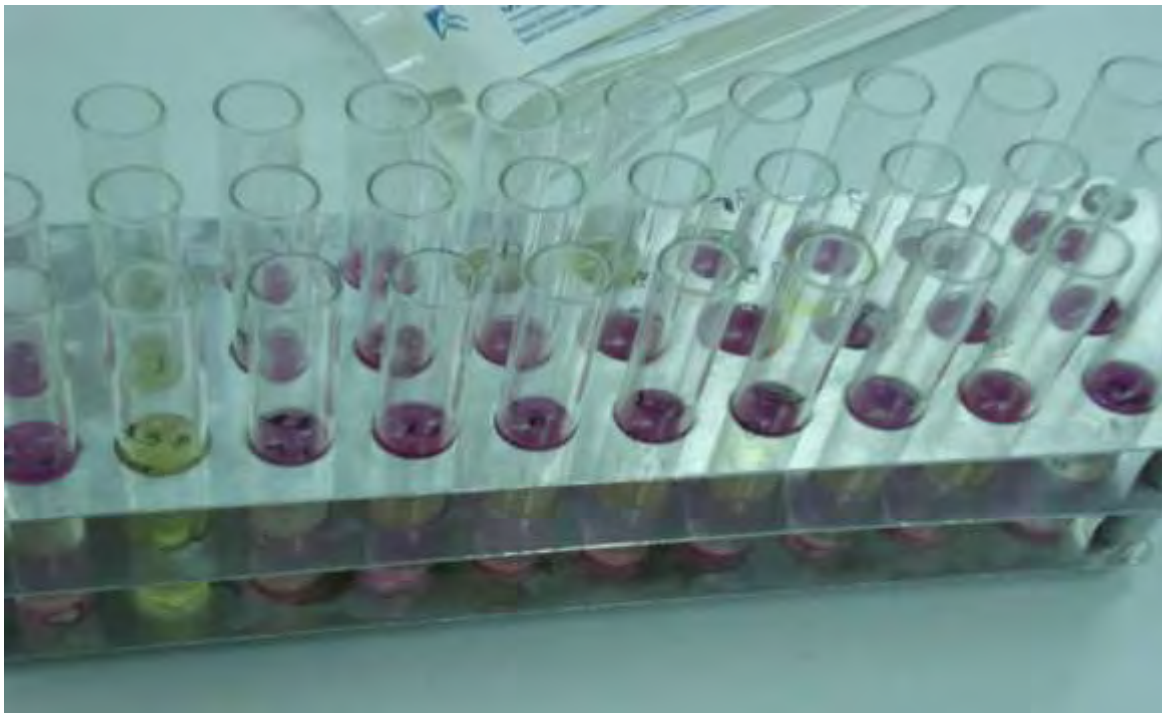
Τα οξειδάση θετικά βακτήρια απορρίφθηκαν. Αυτά που ήταν αρνητικά στην οξειδάση τοποθετήθηκαν σε *Tryptone Water* και ακολούθησε επώαση τους στους 44,5°C για 24 ώρες. ***Tryptone (tryptofane) ζωμός της Bio Merieux*** : Παρασκευάστηκε διάλυμα τρυπτόνης 1%. Η παρασκευή του διαλύματος έγινε με 15 g της αφυδατωμένης ουσίας σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 min.

Μετά την επώαση ακολούθησε η δοκιμή της INΔΟΛΗΣ. Η δοκιμή αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της *E.coli* να οξειδώνει την τρυπτοφάνη παρουσία οξυγόνου προς ινδόλη.

Η δοκιμή βασίζεται στην προσθήκη σταγόνων του αντιδραστηρίου Kovac's στον σωλήνα με το Tryptone Water. Παρουσία ινδόλης σχηματίζεται κόκκινος δακτύλιος στην επιφάνεια του υγρού, ενώ απουσία της ο δακτύλιος είναι κίτρινος.



**Εικόνα 4 - Μετά την επώαση και πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου Kovac's.**

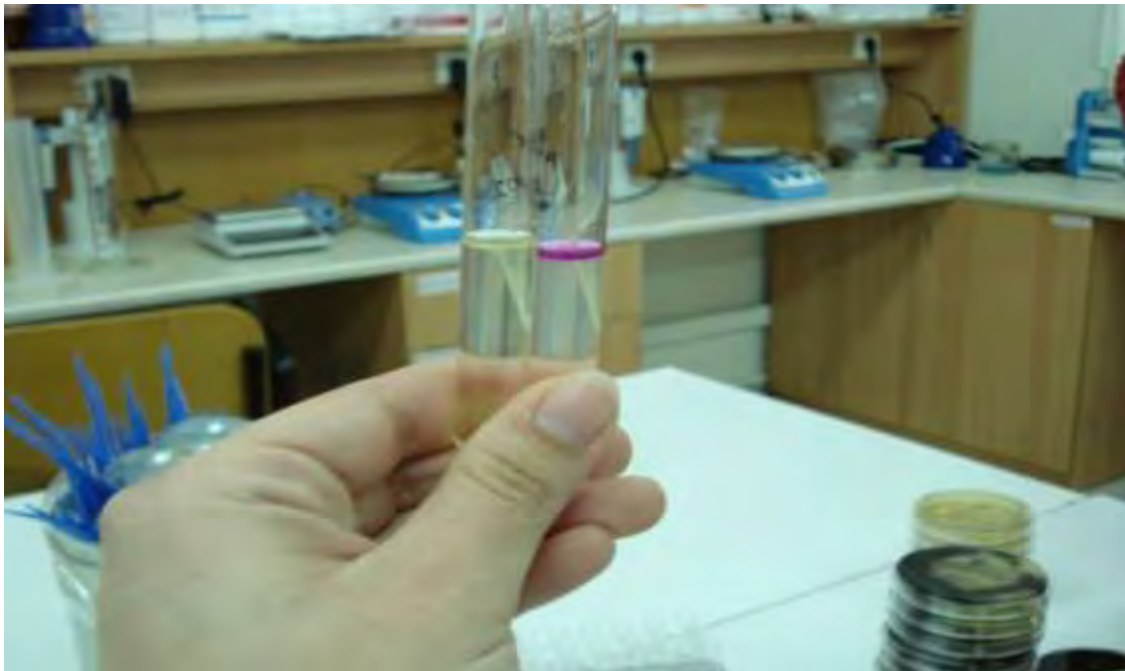


**Εικόνα 5 - Μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου Kovac's. Στα ινδόλη (+) σχηματισμός ροζ δακτυλίου στην επιφάνεια**

[106]



**Εικόνα 6 - Ινδόλη (+) και Ινδόλη (-)**



**Εικόνα 7 - Ινδόλη(+), δεξιά και Ινδόλη (-), αριστερά**

[107]

### 1.3.3. API 20E-TEST

Τα ινδόλη θετικά στελέχη ελέγχθηκαν, όσον αφορά τις βασικές βιοχημικές τους ιδιότητες με το test API 20E (Bio Merieux , France). Το API 20E που χρησιμοποιήθηκε, παρασκευάστηκε από την εταιρεία Bio Merieux. Η ταινία API 20E είναι ένα προτυποποιημένο σύστημα, αποτελείται από 20 μικροσωλήνες που περιέχουν αφυδατωμένα υποστρώματα για την εκδήλωση ενζυμικής δραστηριότητας ή την ζύμωση σακχάρων. Οι μικροσωλήνες ενοφθαλμίζονται με πυκνό εναιώρημα μικροοργανισμών που δημιουργείται από μια καθαρή καλλιέργεια. Σε κάθε μικροσωληνίσκο έγινε ενοφθαλμισμός με βακτηριακό εναιώρημα που προκάλεσε ανασύσταση των υλικών. Κατά την διάρκεια της επώασης 34-38 °C για 18-24 ώρες, ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών προκάλεσε χρωματικές μεταβολές που είτε ήταν αυτόματες, είτε αποκαλύφθηκαν με την προσθήκη ειδικών αντιδραστηρίων.

Έγινε σύγκριση των χρωματικών αλλαγών που παρατηρήθηκαν σε κάθε ταινία API 20E, με τις αντίστοιχες που ήταν καταχωρημένες σε βάση δεδομένων και από τα αποτελέσματα της σύγκρισης έγινε ταυτοποίηση του είδους του μικροοργανισμού που εξετάστηκε. Οι βιοχημικές εξετάσεις του API 20E είναι οι εξής :

- Παραγωγή ινδόλης (IND: +)
- Ζύμωση της γλυκόζης (MR : +)
- V.P. = Voges-Proskauer. Παραγωγή ακετυλο-μεθυλοκαρβινόλης.
- Κιτρικά. Ανάπτυξη σε υλικό που έχει σαν μοναδική πηγή άνθρακα το κιτρικό νάτριο (Simmons Citrate Agar)
- KCN: Ανάπτυξη σε υλικό που έχει κυανιούχα νάτριο.
- Αναγωγή νιτρικών
- Παραγωγή υδρόθειου στο υλικό TSI ή στο Klinger
- Διάσπαση της ουρίας

- Απαμίνωση της φαινυλαλανίνης
- Ζύμωση της λακτόζης
- Παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης
- Αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης
- Αποκαρβοξυλίωση της Ορνιθίνης
- Παραγωγή οξειδάσης.

Εκτός από τις παραπάνω βασικές βιοχημικές ιδιότητες η *E. coli* ζυμώνει και διάφορα σάκχαρα εκτός της γλυκόζης και της λακτόζης, όπως τη μαλτόζη, τη μαννιτόλη και αρκετά στελέχη ζυμώνουν την σουκρόζη και τα περισσότερα τη σορβιτόλη.

Παράγει ινδόλη από την οξείδωση του αμινοξέος τρυπτοφάνη. Οι τέσσερις δοκιμές δοκιμασία παραγωγής ινδόλης, η δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου, η δοκιμασία των κιτρικών αναφέρονται διεθνώς ως δοκιμασίες IMVC (Indole, Methyl-red, Voges-Proskauer, Citrate). Οι δοκιμασίες αυτές για την *E. coli* είναι IMVC :+ + - -.



Εικόνα 8 - API 20E- test





**Εικόνα 9 - API 20E -test**

Τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *E.coli* διατηρήθηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) σε γλυκερόλη για περαιτέρω έλεγχο της αντιβιοαντοχής τους.

#### **1.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. coli* ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ**

Η αντιβιοαντοχή των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη έγινε με τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) στα εξής αντιβιοτικά: αμπικιλίνη (AM), χλωραμφαινικόλη (CHL), γενταμυκίνη (GE), νεομυκίνη (NE), σουλφομεθαξόλη (SUL), τετρακυκλίνη (TE), ναλιδιξικό οξύ (NAL). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή των διαδοχικών αραιώσεων, σε πλάκες μικροτιτλοποίησης. Σύμφωνα μ' αυτήν τα στάδια που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

### 1.4.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι πρότυπες ουσίες, η προμήθεια των οποίων έγινε από τις παρασκευάστριες εταιρείες ή εταιρείες χημικών προϊόντων, και στην ετικέτα τους αναγράφεται η περιεκτικότητα σε δραστική ουσία ή δραστικότητα τους (μg/mg ή UI/mg) και η ημερομηνία λήξης τους. Η φύλαξη τους έγινε στους < 20 °C .

Από την πρότυπη ουσία παρασκευάστηκε το μητρικό διάλυμα (stock solution). Για την παρασκευή του ακολουθήθηκε σταθερή διαδικασία όπως άνοιγμα φιαλιδίου αφού πάρει θερμοκρασία δωματίου ( για να μην υπάρξει συμπύκνωση υδρατμών με αποτέλεσμα να καταστρέφονται κάποια αντιβιοτικά π.χ. β-λακταμικά, ή για να μην υπάρχει αύξηση του βάρους των υγροσκοπικών ουσιών), προστασία από μεγάλη έκθεση στο φως και δημιουργία διαλύματος συγκέντρωσης 1000μg/ ml ή 10πλάσιας της μεγαλύτερης συγκέντρωσης που θα χρησιμοποιηθεί .

Οι ποσότητες των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και από το βάρος υπολογίστηκε, σύμφωνα με τους παρακάτω τύπους ο όγκος του διαλυτικού μέσου που θα προστεθεί, ο οποίος καθορίζεται αναλόγως του αντιβιοτικού από τις οδηγίες του NCCLS.

$$\text{ΟΓΚΟΣ} = \frac{\text{ποσότητα που ζυγίσαμε (mg)} \times \text{δραστικότητα (μg/mg)}}{\text{Επιθυμητή συγκέντρωση (μg/ml)}}$$

$$\text{ΒΑΡΟΣ} = \frac{\text{όγκος (mL)} \times \text{συγκέντρωση (μg/ml)}}{\text{Δραστικότητα (μg/mg)}}$$

Το μητρικό διάλυμα έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής προκειμένου να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση. Το μητρικό διάλυμα διαμοιράστηκε σε μικρές ποσότητες σε σωληνάρια με ασφαλές πώμα, από πολυπροπυλένιο, αιθυλένιο ή στυρένιο για την αποφυγή προσρόφησης του αντιμικροβιακού φαρμάκου από τα τοιχώματα τους και συντηρήθηκε έως [112]



και 6 μήνες σε βαθιά κατάψυξη.(-70 °C ).

Αντιβιοτικά, όπως η αμπικιλίνη και η τριμεθοπρίμη πρέπει να αναδεύονται καλά πριν την χρήση τους γιατί δημιουργούν ίζημα.

Οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν είναι συνάρτηση των κρίσιμων συγκεντρώσεων (breakpoints, BP), έτσι όπως αυτές ορίζονται από το CLSI και καταγράφονται ανάλογα με το είδος του κάθε μικροοργανισμού.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν όπως προαναφέρθηκε στην μέθοδο MIC ήταν τα παρακάτω:

1. ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ (SIGMA-A 9393-25 GR)
2. ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ (FLUKA 23275 Pr.no :C 0378)
3. ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ (SIGMA G3632-5gr)
4. ΣΟΥΛΦΑΜΕΘΟΞΟΛΗ (SIGMA S 7507-10gr)
5. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ (FLUKA 87128-25gr)
6. ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ (SIGMA-N5285)
7. ΝΑΛΙΔΙΕΙΚΟ ΟΞΥ (FLUKA 70162-5 GR.)

<b>ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΜΗΤΡΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ (STOCK SOLUTION)</b>	
ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ	PBS (ph 7) : ΣΤΑ 100ml νερού ,1 tab PBS
ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ	ΝΕΡΟ
ΣΟΥΛΦΟΜΕΘΟΞΟΛΗ	½ όγκος χλιαρού νερού και ½ όγκος 2,5 mol/L NaOH
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	ΝΕΡΟ
ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ	ΝΕΡΟ
ΝΑΛΙΔΙΕΙΚΟ ΟΞΥ	ΝΕΡΟ

ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ	Αιθανόλη 95%
-----------------	--------------

<b>ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ WORKING SOLUTION</b>	
ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ	PBS (ph 7) : ΣΤΑ 100ml νερού ,1 tab PBS
ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ	ΝΕΡΟ
ΣΟΥΛΦΟΜΕΘΟΞΟΛΗ	ΝΕΡΟ
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	ΝΕΡΟ
ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ	ΝΕΡΟ
ΝΑΛΙΔΙΞΙΚΟ ΟΞΥ	ΝΕΡΟ
ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ	ΝΕΡΟ

<b>ΚΡΙΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ E. COLI (BREAKPOINTS , BP )</b>	
ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ	>8
ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ	>8
ΣΟΥΛΦΟΜΕΘΟΞΟΛΗ	>256
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	>8
ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ	>8
ΝΑΛΙΔΙΞΙΚΟ ΟΞΥ	>16
ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ	>16

Αναλυτικότερα: για την **αμπικικιλίνη, γενταμυκίνη, τετρακυκλίνη και νεομυκίνη** (BP>8) απαιτήθηκε διάλυμα εργασίας (working solution) με συγκέντρωση 512 µg/ml και για τον λόγο αυτό δημιουργήθηκε μητρικό διάλυμα (stock solution) συγκέντρωσης 5120 µg/ml .

- Για την **αμπικικιλίνη**: Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος (**stock solution**) διαλύθηκε 1 tab PBS (10ml) σε 100 ml αποσταγμένου νερού. Ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 51,2 mg αμπικικιλίνης και προστέθηκαν 10 ml του διαλύματος PBS που είχε δημιουργηθεί. Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας (**working solution**): στα 9 ml διαλύματος PBS προστέθηκαν 1 ml από το μητρικό διάλυμα.
- Για την **γενταμυκίνη**: Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος (**stock solution**) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 51,2 mg γενταμυκίνης και προστέθηκαν 10 ml αποσταγμένου νερού. Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας (**working solution**): στα 9 ml αποσταγμένου νερού προστέθηκαν 1 ml από το μητρικό διάλυμα.
- Για την **τετρακυκλίνη**: Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος (**stock solution**) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 51,2 mg τετρακυκλίνης και προστέθηκαν 10 ml αποσταγμένου νερού. Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας (**working solution**) : στα 9 ml αποσταγμένου νερού προστέθηκαν 1 ml από το μητρικό διάλυμα.
- Για την **νεομυκίνη**: Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος (**stock solution**) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 51,2 mg νεομυκίνης και προστέθηκαν 10 ml αποσταγμένου νερού. Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας (**working solution**) : στα 9 ml αποσταγμένου νερού προστέθηκαν 1 ml από το μητρικό διάλυμα.

Για το **ναλιδιξικό οξύ** και την **χλωραμφαινικόλη** (BP>16), απαιτήθηκε διάλυμα εργασίας (working solution) με συγκέντρωση 1024 µg/ml ή 1,024 mg/ml και για τον λόγο αυτό δημιουργήθηκε μητρικό διάλυμα (stock solution) συγκέντρωσης 10240 µg/ml ή 10,24 mg/ml.

- Για το **ναλιδιξικό οξύ**: Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος (**stock solution**) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 102,4 mg ναλιδιξικού οξέος και προστέθηκαν 10 ml αποσταγμένου νερού. Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας (**working**

**solution**): στα 9 ml αποσταγμένου νερού προστέθηκαν 1 ml από το μητρικό διάλυμα.

- Για την **χλωραμφαινικόλη**: Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος (**stock solution**) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 102,4 mg χλωραμφαινικόλης και προστέθηκαν 10 ml αιθανόλης 95%. Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας (**working solution**): στα 9 ml αποσταγμένου νερού προστέθηκαν 1 ml από το μητρικό διάλυμα.

Τέλος για την **σουλφαμεθοζόλη** (BP>256) απαιτήθηκε διάλυμα εργασίας (working solution) με συγκέντρωση 4096  $\mu\text{g/ml}$  ή 4,096 mg/ml και για τον λόγο αυτό δημιουργήθηκε μητρικό διάλυμα (stock solution) συγκέντρωσης 40960  $\mu\text{g/ml}$  ή 409,60mg/ml. Εδώ την MIC περιμένουμε να βρίσκεται στην 4<sup>η</sup> αραιώση σε αντίθεση με τα υπόλοιπα αντιβιοτικά που θα βρίσκεται στην 6<sup>η</sup>.

- Για την **σουλφαμεθοζόλη**: Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος (**stock solution**) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 409,6 mg σουλφαμεθοζόλης και προστέθηκαν 5 ml χλιαρού αποσταγμένου νερού και 5 ml διαλύματος 2,5N NaOH. Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας (**working solution**): στα 9 ml αποσταγμένου νερού προστέθηκαν 1 ml από το μητρικό διάλυμα.

#### 1.4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ

Χρησιμοποιήθηκε βακτηριακό εναιώρημα θολερότητας 0,5 κλίμακας της κλίμακας McFarland που για την *E. coli* αντιστοιχεί σε συγκέντρωση  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml –ATCC 25922. Για να δημιουργηθεί το παραπάνω εναιώρημα με βαμβακοφόρο στυλεό επιλέχθηκαν 7 περίπου αποικίες με καλή μορφολογική εμφάνιση από πρόσφατη ανακαλλιέργεια και αναμίχθηκαν με 10 ml φυσιολογικού ορού.

Με φασματοφωτόμετρο, το οποίο είχε ρυθμιστεί στα 550 nm ρυθμίστηκε η θολερότητα του εναιωρήματος.

Στη συνέχεια δημιουργήθηκε εναιώρημα ενοφθαλμισμού με αραιώση του αρχικού εναιωρήματος 1:10 (συγκέντρωση *E. coli*  $15 \times 10^6$  cfu/ml. ) σε Mueller-Hinton broth.

### 1.4.3. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

Η τεχνική που χρησιμοποιήσαμε είναι αυτή της μικρομέθόδου (microdilution) που γίνεται σε ειδικές πλάκες μικροτιτλοποίησης και χρησιμοποιεί μικρούς όγκους (0,05-0,2 Μl), σε αντίθεση με την μακρομέθοδο (macrodilution), η οποία χρησιμοποιεί μεγάλους όγκους και εκτελείται σε σωληνάρια (> 1 mL)

Στη μικρομέθοδο, γίνεται η τοποθέτηση των διαδοχικών αραιώσεων σε πλάκες πολυστηρενίου με 96 βυθίσματα με πυθμένα σε σχήμα U, ώστε να είναι δυνατός ο ταυτόχρονος έλεγχος πολλών και διαφορετικών συγκεντρώσεων ποικίλων αντιβιοτικών που επιλέγονται. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία των αραιώσεων των αντιβιοτικών ήταν η ακόλουθη:

### 1.5. ΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑΣ

Αρχικά, παρασκευάστηκαν σειρές υποδιπλάσιων αραιώσεων των αντιβιοτικών σε Mueller-Hinton broth. Δέκα αραιώσεις ορίστηκαν σε τιμές εκατέρωθεν εκείνης, που σύμφωνα με την NCCLS (2003), καθορίζουν την ευαισθησία της *E.coli* σε καθένα από τα υπό μελέτη αντιβιοτικά.

Σε κάθε σειρά μικροκυψελών, προστέθηκαν αραιώσεις του ίδιου αντιβιοτικού, ξεκινώντας από τις μικρότερες προς τις μεγαλύτερες και προσθέτοντας σε κάθε μικροκυψέλη, 50 μl του διαλύματος του αντιβιοτικού. Σε κάθε κυψέλη, η συγκέντρωση του αντιβιοτικού πρέπει να είναι διπλάσια της ζητούμενης, δεδομένου ότι με την προσθήκη των 50 μl του εναιωρήματος των υπό μελέτη στελεχών στη συνέχεια, η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος υποδιπλασιάζεται. Από το τελικό μικροβιακό εναιώρημα που παρασκευάστηκε προστέθηκαν σε κάθε μικροκυψέλη με αντιβιοτικό 50 μl.

Στη συνέχεια καλύπτεται η μικροπλάκα μας με αυτοκόλλητη ελαστική μεμβράνη για την αποφυγή εξάτμισης και επωάζεται σε αερόβιες συνθήκες 38°C για 18-24 ώρες. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται με την βοήθεια καθρέπτη ή φακού. Η μικροβιακή αντοχή ελέγχεται με βάση τη θολερότητα. Ανάπτυξη βακτηρίου υπάρχει στα βοθρία που είναι θολά ή έχουν “κομβίο” στον πυθμένα τους. Το πρώτο βοθρίο που δεν έχει ανάπτυξη αποτελεί την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του αντιβιοτικού το οποίο εξετάζουμε και καταγράφουμε.

Σε μία περίπτωση, σε μία σειρά υποδιπλάσιων αραιώσεων υπήρξαν 2 διαδοχικά βοθρία με ανάπτυξη, ενώ ακολούθησε μεγαλύτερη αραιώση χωρίς ανάπτυξη οπότε η μέθοδος επαναλήφθηκε. Αντίθετα σε δύο περιπτώσεις που υπήρχε ένα τέτοιο βοθρίο δεν το λάβαμε υπ' όψη μας.

Για κάθε στέλεχος, η συγκέντρωση του εναιωρήματος της μικροκυψέλης με την μικρότερη αραιώση αντιβιοτικού, στην οποία δεν παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη, καθορίζει την MIC του στελέχους, στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

[119]

## 4.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS.15 στο Εργαστήριο Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

### 4.1.1 ΧΟΙΡΟΙ-ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΟΙ

	ΧΟΙΡΟΙ (n=19)	ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΟΙ (n=19)	R.R.	95% C.I.	P
	ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ			
ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ	6 (31,6 %)	10 (52,6 %)	0,6	0,273-1,319	0,189
ΧΛΩΡΑΜΦΑΙ- ΝΙΚΟΛΗ	1 (5,3 %)	2 (10,5 %)	0,5	0,049-5,061	1
ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ	0 (0%)	0 (0 %)	-	-	-
ΣΟΥΛΦΟ- ΜΕΘΟΞΟΛΗ	7 (36,8 %)	3 (15,8 %)	2,333	0,707-7,69	0,141
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	16 (84,2%)	14 (73,7 %)	1,143	0,82-1,59	0,693
ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ	2 (10,5%)	1 (5,3 %)	2	0,198-20,24	1
ΝΑΛΙΔΙΞΙΚΟ ΟΞΥ	4 (21,1%)	3 (15,8 %)	1,333	0,344-5,170	1

Εξετάστηκαν 19 ζεύγη δειγμάτων από χοιροτροφικές μονάδες.



Στα στελέχη των χοίρων παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα κατά σειρά στην **τετρακυκλίνη (84,2 %)**, **σουλφαμεθοξόλη (36,8%)**, **αμπικιλίνη (31,5 %)**, **ναλιδιξικό οξύ (21 %)**, **νεομυκίνη (10,5 %)** και **χλωραμφαινικόλη (5,2%)** ενώ για την **γενταμυκίνη** δεν βρέθηκε κανένα ανθεκτικό στέλεχος ( **0 %**).

Στα στελέχη των χοιροτρόφων μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε κατά σειρά στην **τετρακυκλίνη (73,68 %)**, **αμπικιλίνη (52,6 %)**, **σουλφαμεθοξόλη και ναλιδιξικό οξύ (15,78 %)**, **χλωραμφαινικόλη (10,5 %)**, **νεομυκίνη (5,2 %)** ενώ και πάλι για την **γενταμυκίνη** δεν βρέθηκε κανένα ανθεκτικό στέλεχος ( **0 %**).

Πιο συγκεκριμένα, για την **αμπικιλίνη** παρατηρήσαμε ότι το **68 %** των στελεχών που απομονώθηκαν από τους χοίρους και το **32 %** των στελεχών που απομονώθηκαν από τους χοιροτρόφους ήταν ευαίσθητα. Το  $p = 0,189$  ( $p > 0,050$ ) άρα δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα, ενώ το R.R. που προκύπτει ίσο με 0,6 υποδηλώνει ότι τα στελέχη των χοίρων έχουν 40 % μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι πιο ευαίσθητα στην αμπικιλίνη από αυτά των χοιροτρόφων.

Για την **χλωραμφαινικόλη** παρατηρήσαμε μεγάλη ευαισθησία τόσο στα στελέχη των χοίρων όσο και στα στελέχη των χοιροτρόφων σε ποσοστά **95%** και **90%** αντίστοιχα. Το  $p = 1$  άρα δεν είναι στατιστικώς σημαντικό ενώ στη εκτίμηση κινδύνου παρατηρούμε ότι R.R. που προκύπτει είναι ίσο με 0,5 και δηλώνει ότι οι τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους χοίρους έχουν 50 % μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι πιο ευαίσθητα στην χλωραμφαινικόλη από αυτά των χοιροτρόφων.

Για την **γενταμυκίνη** προκύπτει ότι όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα και δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα.

Για την **σουλφαμεθοξόλη** τα στελέχη των χοίρων εμφάνισαν ευαισθησία σε ποσοστό **63 %** ενώ τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους χοιροτρόφους σε ποσοστό **85 %**. Το  $p = 0,141$  άρα δεν είναι στατιστικώς σημαντικό ενώ στη εκτίμηση κινδύνου παρατηρούμε ότι το R.R. που προκύπτει είναι ίσο με 2,3 και δηλώνει τα στελέχη των χοίρων έχουν **διπλάσια** πιθανότητα να είναι ανθεκτικά στην σουλφομεθοξόλη από αυτά των χοιροτρόφων.

Για την **τετρακυκλίνη** το **37%** των στελεχών που απομονώθηκαν από τους χοίρους και το **16 %** των στελεχών που απομονώθηκαν από τους χοιροτρόφους εμφάνισαν ανθεκτικότητα

απέναντι στο συγκεκριμένο αντιμικροβιακό. Το  $p = 0,693$  άρα δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Για την **νεομυκίνη**, παρατηρήσαμε μεγάλη ευαισθησία τόσο στα στελέχη από απομονώθηκαν από τους χοίρους όσο και σε αυτά που απομονώθηκαν από τους χοιροτρόφους σε ποσοστά **90%** και **95%** αντίστοιχα. Το  $p = 0,547$  άρα δεν είναι στατιστικώς σημαντικό ενώ στη εκτίμηση κινδύνου παρατηρούμε ότι R.R. που προκύπτει είναι ίσο με **2** και δηλώνει ότι τα στελέχη των χοίρων έχουν διπλάσιο κίνδυνο να εμφανίσουν ανθεκτικότητα απέναντι στην νεομυκίνη από αυτά των χοιροτρόφων.

Τέλος για το **ναλιδιξικό οξύ** παρατηρήσαμε και πάλι μεγάλη ευαισθησία και στα στελέχη που απομονώθηκαν από τους χοίρους και στα στελέχη που απομονώθηκαν από τους χοιροτρόφους σε ποσοστά **80%** και **85%** αντίστοιχα. Το  $p = 0,676$  και δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά.

#### 4.1.2. ΠΤΗΝΑ-ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΟΙ

	ΠΤΗΝΑ (n=18) ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΟΙ (n=18) ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	R.R.	95% C.I.	P
ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ	4 (22,2 %)	12 (66,7 %)	0,33	0,13-0,84	0,01 (p<0,05)
ΧΛΩΡΑΜΦΑΙ- ΝΙΚΟΛΗ	1 (5,6 %)	4 (22,2 %)	0,25	0,031-2,025	0,338
ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ	0 (0%)	3 (16,7 %)	-	-	0,229
ΣΟΥΛΦΟ- ΜΕΘΟΞΟΛΗ	3 (16,7 %)	3 (16,7 %)	1	0,232-4,31	1
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	15 (83,3%)	12 (66,7 %)	1,25	0,849-1,84	0,443
ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ	6 (33,3%)	3 (16,7 %)	2	0,589-6,79	0,443
ΝΑΛΙΔΙΞΙΚΟ ΟΞΥ	12 (66,7%)	9 (50 %)	1,33	0,757-2,348	0,31

Εξετάστηκαν **18 ζεύγη δειγμάτων** από πτηνοτροφικές μονάδες.

Στα στελέχη που απομονώθηκαν από τα πτηνά παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα κατά σειρά στην **τετρακυκλίνη (83,3 %)**, **ναλιδιξικό οξύ (63,1%)**, **νεομυκίνη**  
[123]

(31,%) , αμπικιλίνη ( 22,2 %), σουλφαμεθοξόλη (16,6%) και χλωραμφαινικόλη (5,2%) ενώ για τη γενταμυκίνη δεν βρέθηκε κανένα ανθεκτικό στέλεχος ( 0 %).

Στους στελέχη που απομονώθηκαν από τους πτηνοτρόφους μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε κατά σειρά στην τετρακυκλίνη (66,6 %) και αμπικιλίνη (66,6 %), ναλιδιξικό οξύ ( 50%), χλωραμφαινικόλη (22%), σουλφαμεθοξόλη (15,78 %) και νεομυκίνη (15,78 %) και γενταμυκίνη (15,78 %) .

Πιο συγκεκριμένα, για την αμπικιλίνη παρατηρήσαμε μεγάλη διαφορά στην ανθεκτικότητα μεταξύ των στελεχών πτηνών (22 %) και των στελεχών των πτηνοτρόφων (67 %). Το  $p = 0,01$  ( $p < 0,050$ ) άρα είναι **στατιστικώς σημαντικό**, ενώ το R.R. που προκύπτει ίσο με 0,33 υποδηλώνει ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα πτηνά έχουν **66%** μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη από αυτά των πτηνοτρόφων. **(Διάστημα εμπιστοσύνης: 0,13-0,84)**

Για την χλωραμφαινικόλη παρατηρήσαμε υψηλή ευαισθησία τόσο στα στελέχη που απομονώθηκαν από τα πτηνά όσο και στα στελέχη των πτηνοτρόφων σε ποσοστά **95%** και **80%** αντίστοιχα. Το  $p = 0,338$  άρα δεν είναι στατιστικώς σημαντικό ενώ στη εκτίμηση κινδύνου παρατηρούμε ότι το R.R. που προκύπτει είναι ίσο με 0,25 και δηλώνει ότι τα στελέχη των πτηνών έχουν 75 % μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι πιο ευαίσθητα στην χλωραμφαινικόλη από αυτά των πτηνοτρόφων.

Όλα τα στελέχη των πτηνών (100%) και το 16,7 % των στελεχών που απομονώθηκαν από τους πτηνοτρόφους αντίστοιχα, ήταν ανθεκτικά στην γενταμυκίνη. Το  $p=0,229$  και άρα δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Για την σουλφομεθοξόλη, παρατηρήθηκαν τα ίδια ποσοστά ανθεκτικότητας τόσο στα στελέχη που απομονώθηκαν από τα πτηνά όσο και σε αυτά που απομονώθηκαν από τους πτηνοτρόφους σε ποσοστό 17%. Και εδώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. ( $p = 1$ ).

Πολύ μεγάλη ανθεκτικότητα παρατηρούμε απέναντι στην τετρακυκλίνη. Πιο συγκεκριμένα το **83 %** των στελεχών των πτηνών και το **67 %** των στελεχών των πτηνοτρόφων εμφάνισαν ανθεκτικότητα απέναντι στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Το  $p=0,443$  και δεν έχουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Για την **νεομυκίνη** παρατηρήσαμε μεγάλη ευαισθησία τόσο στα στελέχη που απομονώθηκαν από τα πτηνά όσο και σε αυτά των πτηνοτρόφων σε ποσοστά **77%** και **83%** αντίστοιχα. Το  $p = 0,443$  άρα δεν είναι στατιστικώς σημαντικό ενώ στη εκτίμηση κινδύνου παρατηρήσαμε ότι το R.R. που προκύπτει είναι ίσο με **2** και υποδηλώνοντας ότι τα στελέχη των πτηνών έχουν διπλάσιο κίνδυνο να εμφανίσουν ανθεκτικότητα απέναντι στην νεομυκίνη από αυτά των πτηνοτρόφων.

Τέλος για το **ναλιδιξικό οξύ** παρατηρήσαμε ότι στην πλειοψηφία εμφανίζεται υψηλή ανθεκτικότητα σε ποσοστά **67 %** για τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα πτηνά και **50%** για τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους πτηνοτρόφους. Το  $p = 0,31$  και δεν εμφανίζει στατιστική σημαντικότητα.

#### 4.1.3 ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΟΙ-ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΟΙ

	ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΟΙ (n=18) ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΟΙ (n=19) ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	R.R.	95% C.I.	p
<b>ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ</b>	<b>12 (66,7 %)</b>	<b>10 (52,6 %)</b>	<b>1,267</b>	<b>0,74-2,168</b>	<b>0,385</b>
<b>ΧΛΩΡΑΜΦΑΙ- ΝΙΚΟΛΗ</b>	<b>4 (22, 2 %)</b>	<b>2(10,5 %)</b>	<b>2,111</b>	<b>0,439-10,149</b>	<b>0,405</b>
<b>ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ</b>	<b>3 (16,7 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,105</b>
<b>ΣΟΥΛΦΟ- ΜΕΘΟΞΟΛΗ</b>	<b>3 (16,7 %)</b>	<b>3(15,8 %)</b>	<b>1,056</b>	<b>0,244-4,567</b>	<b>1</b>
<b>ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ</b>	<b>12 (66,7 %)</b>	<b>14(73,7 %)</b>	<b>0,905</b>	<b>0,593-1,381</b>	<b>0,641</b>
<b>ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ</b>	<b>3 (16,7 %)</b>	<b>1(5,3 %)</b>	<b>3,167</b>	<b>0,362-27,718</b>	<b>0,34</b>
<b>ΝΑΛΙΔΙΞΙΚΟ ΟΞΥ</b>	<b>9 (50 %)</b>	<b>3 (15,8 %)</b>	<b>3,167</b>	<b>1,016-9,867</b>	<b>0,026(p&lt;0.05)</b>

Στατιστική σημαντικότητα παρατηρούμε στο ναλιδιξικό οξύ όπου το  $p=0,026$  και το  $R.R.=3$ . Φαίνεται λοιπόν ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους πτηνοτρόφους έχουν 3 φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο ναλιδιξικό οξύ απ αυτά των χοιροτρόφων ( $R.R.: 3,1$ ).

#### 4.1.4 ΠΤΗΝΑ-ΧΟΙΡΟΙ

	ΠΤΗΝΑ (n=18) ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΧΟΙΡΟΙ (n=19) ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	R.R.	95% C.I.	p
ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ	4 (22,2 %)	6 (31,6 %)	0,704	0,237-2,090	0,714
ΧΛΩΡΑΜΦΑΙ- ΝΙΚΟΛΗ	1 (5,6 %)	1 (5,3 %)	1,056	0,071-15,64	1
ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-
ΣΟΥΛΦΟ- ΜΕΘΟΞΟΛΗ	3 (16,7 %)	7 (36,8 %)	0,452	0,138-1,485	0,269
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	15 (83,3%)	16 (84,2%)	0,990	0,745-1,314	1
ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ	6 (33,3%)	2(10,5%)	3,167	0,732-13,7	0,124
ΝΑΛΙΔΙΞΙΚΟ ΟΞΥ	12 (66,7%)	4 (21,1%)	3,167	1,249-8,026	0,005(p<0,05)

Μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από τα πτηνά και των στελεχών που απομονώθηκαν από τους χοίρους παρατηρείται στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα πάλι στην περίπτωση του ναλιδιξικού οξέος όπου το  $p=0,005$  και σημαίνει ότι τα στελέχη των πτηνών

[127]

έχουν 3 φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα απέναντι στο ναλιδιξικό οξύ από αυτά των χοίρων (R.R.: 3,1).

## **4.2.ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (MAR-MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE)**

### **4.2.1 ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (MAR-MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE) ΜΕΤΑΞΥ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΧΟΙΡΩΝ-ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΩΝ .**

Από τα 19 ζεύγη που εξετάστηκαν κάποια παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε περισσότερα από 1 αντιβιοτικά :

	<b>ΧΟΙΡΟΙ (n=19)</b>	<b>ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΟΙ (n=19)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε κανένα αντιβιοτικό</b>	<b>3 στελέχη(15,78 %)</b>	<b>4 στελέχη (21%)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε 1 αντιβιοτικό</b>	<b>6 στελέχη (31,57%)</b>	<b>6 στελέχη (31,57 %)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά</b>	<b>3 στελέχη (15,78 %)</b>	<b>5 στελέχη (26 ,3 %)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε 3 αντιβιοτικά</b>	<b>4 στελέχη (21%)</b>	<b>0 στέλεχος (0 %)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε &gt;4 αντιβιοτικά</b>	<b>3 στελέχη (15,78 %)</b>	<b>4 στελέχη (21%)</b>

Από τα 19 στελέχη που απομονώθηκαν από χοίρους και χοιροτρόφους το 52,56 % παρουσίασε ανθεκτικότητα σε περισσότερα από 1 αντιβιοτικά.

Συγκεκριμένα, όσο αφορά τα στελέχη των χοίρων, το 31,57 % βρέθηκε ανθεκτικό στην  
[128]



τετρακυκλίνη (6 στελέχη). Το 15,78%, δηλ. 3 στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη-σουλφομεθοξόλη (TE-SUL), τετρακυκλίνη-νεομυκίνη (TE-NE) και τετρακυκλίνη-αμπικιλλίνη (TE-AM) αντίστοιχα. Από τα 4 στελέχη που παρουσίασαν αντοχή σε 3 αντιβιοτικά τα 2 από αυτά ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλλίνη-σουλφομεθοξόλη-τετρακυκλίνη (AM-SUL-TE), 1 στην τετρακυκλίνη-σουλφομεθοξόλη-νεομυκίνη (TE-SUL-NE) και ένα στην χλωραμφαινικόλη-τετρακυκλίνη-ναλιδιξικό οξύ (CHL-TE-NAL).

Για τους στελέχη που απομονώθηκαν από τους χοιροτρόφους, από τα 6 στελέχη που ήταν ανθεκτικά σε ένα αντιβιοτικό, τα πέντε παρουσίασαν αντοχή στην τετρακυκλίνη (TE) και το ένα στην αμπικιλλίνη (AM). Το 26,3% που έδειξαν ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά εμφάνισαν αντοχή στην τετρακυκλίνη-αμπικιλλίνη (TE-AM). Τα τέσσερα στελέχη που εμφάνισαν αντοχή σε 4 και άνω αντιβιοτικά και πιο συγκεκριμένα τα δύο από αυτά στην αμπικιλλίνη-σουλφομεθοξόλη-τετρακυκλίνη-και ναλιδιξικό οξύ (AM-SUL-TE-NAL), το ένα στην αμπικιλλίνη-σουλφομεθοξόλη-τετρακυκλίνη-και νεομυκίνη (AM-SUL-TE-NE) ενώ τέλος, ένα στέλεχος εμφάνισε αντοχή στα εξής πέντε αντιβιοτικά: αμπικιλλίνη-χλωραμφαινικόλη-σουλφομεθοξόλη-τετρακυκλίνη-και ναλιδιξικό οξύ (AM-CHL-SUL-TE-NAL).

**4.2.2 ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ  
(MAR-MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE)  
ΜΕΤΑΞΥ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΤΗΝΩΝ-ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΩΝ .**

Από τα 18 ζεύγη που εξετάστηκαν κάποια παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε περισσότερα από 1 αντιβιοτικά :

	<b>ΠΤΗΝΑ (n=18)</b>	<b>ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΟΙ (n=18)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε κανένα αντιβιοτικό</b>	<b>Κανένα στέλεχος (0 %)</b>	<b>1 στέλεχος (5, 26 %)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε 1 αντιβιοτικό</b>	<b>2 στελέχη (11,11 %)</b>	<b>4 στελέχη (22,22 %)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά</b>	<b>8 στελέχη (44,44 %)</b>	<b>6 στελέχη (33,33%)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε 3 αντιβιοτικά</b>	<b>7 στελέχη (38,88 %)</b>	<b>2 στελέχη (11,11 %)</b>
<b>Ανθεκτικότητα σε &gt;4 αντιβιοτικά</b>	<b>1 στέλεχος (5,26 %)</b>	<b>5 στελέχη (27, 77 %)</b>

Συγκεκριμένα, από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα πτηνά, το 11,11 % βρέθηκε ανθεκτικό στην τετρακυκλίνη.(2 στελέχη). Το 44,44% δηλ. 8 στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά σε 2 αντιβιοτικά, πιο συγκεκριμένα τα δύο ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη-ναλιδιξικό οξύ (AM-NAL), τρία στην τετρακυκλίνη-ναλιδιξικό οξύ (TE-NAL), ένα στην τετρακυκλίνη-νεομυκίνη (TE-NE), ένα στην τετρακυκλίνη-σουλφομεθοξόλη (TE-SUL) και ένα στην αμπικιλίνη-νεομυκίνη (AM-NE) αντίστοιχα. Από τα 7 στελέχη που παρουσίασαν αντοχή σε 3 αντιβιοτικά, τα 4 από αυτά, ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη-νεομυκίνη-ναλιδιξικό οξύ (TE-

NE-NAL), το 1 στην χλωραμφαινικόλη-τετρακυκλίνη-ναλιδιξικό οξύ (CHL-TE-NAL) και 2 στελέχη βρέθηκαν να είναι ανθεκτικά στην σουλφομεθοξόλη-νεομυκίνη-ναλιδιξικό οξύ (SUL-NE-NAL). Τέλος ένα στέλεχος βρέθηκε να εμφανίζει αντοχή στα παρακάτω αντιβιοτικά: αμπικιλίνη- τετρακυκλίνη-νεομυκίνη-ναλιδιξικό οξύ (AM-TE-NE-NAL.).

Για τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους πτηνοτρόφους, από τα 4 στελέχη που ήταν ανθεκτικά σε ένα αντιβιοτικό παρουσίασαν αντοχή: δύο στην τετρακυκλίνη (TE) ένα στην αμπικιλίνη (AM) και ένα στο ναλιδιξικό οξύ (NAL). Το 33,33% εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά, τα τρία εμφάνισαν αντοχή στην τετρακυκλίνη-αμπικιλίνη (TE-AM), το ένα στην σουλφομεθοξόλη-ναλιδιξικό οξύ (SUL-NAL), ένα στην αμπικιλίνη-ναλιδιξικό οξύ (AM-NAL) και ένα στην σουλφομεθοξόλη-τετρακυκλίνη (SUL- TE.). Δύο στελέχη παρουσίασαν αντοχή σε 3 αντιβιοτικά και συγκεκριμένα στην αμπικιλίνη-χλωραμφαινικόλη-τετρακυκλίνη (AM-CHL-TE) και αμπικιλίνη-τετρακυκλίνη-ναλιδιξικό οξύ (AM-TE-NAL).

Τέλος, δύο στελέχη εμφάνισαν αντοχή σε αμπικιλίνη-χλωραμφαινικόλη-τετρακυκλίνη-ναλιδιξικό οξύ (AM-CHL-TE-NAL), ενώ άλλα 2 βρέθηκαν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη - γενταμυκίνη-τετρακυκλίνη-νεομυκίνη-ναλιδιξικό οξύ (AM-GE-TE-NE-NAL), ενώ ένα στέλεχος εμφάνισε αντοχή σε αμπικιλίνη-χλωραμφαινικόλη-σουλφομεθοξόλη-νεομυκίνη-ναλιδιξικό οξύ (AM-CHL-SUL-NE-NAL).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΧΟΙΡΟΥΣ-ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΟΥΣ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 19 δείγματα κοπράνων χοίρων και 19 δείγματα κοπράνων χοιροτρόφων των αντίστοιχων κτηνοτροφικών μονάδων, από τα οποία απομονώθηκαν ισάριθμα στελέχη *E.coli*. Τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν στις τετρακυκλίνες αμπικιλίνη, σουλφομεθοξόλη και ναλιδιξικό οξύ. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με παλιότερες μελέτες που έγιναν τόσο στην χώρα μας όσο και στις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες (ITAVARM 2003, SVARM 2004).

Ποσοτικά στοιχεία σχετικά με την αντοχή των στελεχών *E.coli* από χοίρους είναι διαθέσιμα σε όλη την Ευρώπη.(Baquero 1997, DANMAP 1997, McKinnon 1993, Morvan 1995, Pohl 1991, Wray 1993). Ανθεκτικότητα έχει αναφερθεί στις τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες τριμεθοπρίμη (>50%) και στην αμπικιλίνη (20-50%) και στην τριμεθοπρίμη- σουλφοναμίδες (18- 46%). Μεταξύ των στελεχών της *E.coli* που απομονώθηκαν από υγιείς χοίρους τα ποσοστά ανθεκτικότητας ήταν χαμηλότερα από αυτά που απομονώθηκαν από ασθενείς χοίρους για την τετρακυκλίνη (37%) και αμπικιλίνη (10%). (DANMAP , 1997).

Στην Σουηδία, ο επιπολασμός της μικροβιακής αντοχής στους χοίρους δεν έχει αλλάξει τα τελευταία 10 χρόνια παρά την μείωση κυρίως της τετρακυκλίνης (Bjornerot, 1996, Odensvik, 1997). Ωστόσο η κατάσταση είναι ευνοϊκή σε σχέση με άλλες χώρες. (Melin, 1996). Το 1994, το 38% των κλινικών στελεχών ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη, το 41% στην στρεπτομυκίνη, το 10% στην τριμεθοπρίμη-σουλφοναμίδες και το 8% στην αμπικιλίνη.

Στην Φινλανδία, το 1996 τα ποσοστά ανθεκτικότητας ήταν 30% για την τετρακυκλίνη, 20% για σουλφοναμίδες, 24% για στρεπτομυκίνη, 9% για αμπικιλίνη και 7% για σουλφοναμίδες-τριμεθοπρίμη (Tast, 1997).

Στη Δανία (DANMAP 2008), από το 2001 έως το 2008 η κατανάλωση αντιμικροβιακών αυξήθηκε κατά 19%. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την αυξημένη κατανάλωση τετρακυκλίνων από το στόμα. Από το 2003 έως το 2008 η κατανάλωση τετρακυκλίνων αυξήθηκε κατά 118% κατά την περίοδο του απογαλακτισμού των χοίρων και κατά 60% κατά την περίοδο της πάχυνσης. Το 2008 η κατανάλωση τετρακυκλίνων σε χοίρους απογαλακτισμού περιελάμβανε το 50% της συνολικής κατανάλωσης των τετρακυκλίνων σε χοίρους.

Στο Ηνωμένο Βασίλειο, παρά το γεγονός ότι έχει απαγορευτεί η χορήγηση τετρακυκλίνων στους χοίρους, δεν παρατηρήθηκε μείωση της ανθεκτικότητας από το 1971 έως το 1975 (Smith, 1975). Αντίθετα στην Ολλανδία η απαγόρευση τους ως αυξητικός παράγοντας το 1971 (Monten, 1971), είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της ανθεκτικότητας βαθμιαία. (Vodg, 1997).

Το γεγονός ότι παρατηρούνται υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στις τετρακυκλίνες αποδίδεται στο γεγονός της μακροχρονής χρήσης τους τόσο για θεραπευτικούς σκοπούς όσο και για προφύλαξη και παλιότερα σαν αυξητικός παράγοντας (Klachatourianis, 1998).

Σύμφωνα με παλιότερες μελέτες, η πλειοψηφία των παθογόνων βακτηρίων στο παρελθόν παρουσίαζε ευαισθησία στις τετρακυκλίνες αλλά η ευαισθησία προέκυψε χάρη στα tet-γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τους μηχανισμούς αντίστασης οι οποίοι βασίζονται στις «efflux-αντλίες» και στις προστατευτικές πρωτεΐνες του ριβοσώματος. (Chopra and Roberts, 2001).

Στη Δανία ( DANMAP, 2010), η χρήση των κεφαλοσπορίνων μειώθηκε κατά 0,8% μόνο μέσα στο 2010. Το 2007, αποσύρθηκαν οι αμινογλυκοσίδες, με αποτέλεσμα 99,7% μείωση της κατανάλωσης της νεομυκίνης και μείωση της κατανάλωσης των αμινογλυκοσίδων

[133]

από το 2006 έως το 2008. Για την στρεπτομυκίνη, λόγω της μείωσης της κατανάλωσης της από το 2004 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση σε ποσοστό 30%. Τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας βρέθηκαν για την τετρακυκλίνη (30%), γεγονός που αποδεικνύει την μεγάλη της κατανάλωση και στις χοιροτροφικές μονάδες. Τέλος, τα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στις τετρακυκλίνες (TET-R) ήταν ανθεκτικά σε 3 ή περισσότερα αντιβιοτικά. Το 24% παρουσίασε ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη-σουλφοναμίδες και τετρακυκλίνες (AMP-SUL-TET) και το 27% στις σουλφοναμίδες-τετρακυκλίνη και στρεπτομυκίνη (SUL-TET-STREPT).

Στην Ολλανδία (MARAN 2008), τα ποσοστά ανθεκτικότητας στα στελέχη των χοίρων ήταν: 35,5% για την αμπικιλίνη, 2,4% για την γενταμυκίνη, 10,5% για την χλωραμφαινικόλη, 57,1% για σουλφομεθοξόλη, 67,9% για τετρακυκλίνη και 2% για το ναλιδιξικό οξύ. Σε αντίστοιχη έκθεση στην Σουηδία τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν: 6% για την αμπικιλίνη, <1% για τη γενταμυκίνη, 3% για τη χλωραμφαινικόλη, 9% για σουλφομεθοξόλη, και την τετρακυκλίνη και 1% για το ναλιδιξικό οξύ.

Στην Ολλανδία η χρήση κινολόνων είναι εξαιρετικά χαμηλή (2%). (Van den Bogart et al 2001), όμως σε όλη την Ευρώπη η αντοχή στις κολόνες έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια (από το 2001) σε 24 χώρες. Εξαιρέση αποτελούν η Εσθονία και η Πολωνία. Το 2007 η Εσθονία και η Νορβηγία παρουσίασε ποσοστά της τάξης του 7% σε αντίθεση με την Κύπρο όπου το αντίστοιχο ποσοστό έφτανε το 40% (European Centre for prevention and disease control). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα τα ποσοστά ανθεκτικότητας των στελεχών των χοίρων για τις κινολόνες ήταν τα ακόλουθα: για την Αυστρία 8%, Δανία 2%, Γαλλία 3%, Ιταλία 9%, Ολλανδία 0%, Νορβηγία 0,5% και Σουηδία 1% γεγονός που οφείλεται στο ότι οι κινολόνες έχουν νομικούς περιορισμούς από το 2002 στα παραγωγικά ζώα.(MARAN 2003).

Και στον άνθρωπο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ανθεκτικότητας στις κινολόνες. Το 2008 μόνο τέσσερις χώρες ανέφεραν ποσοστά κάτω από 10%(Ισλανδία 6%, Εσθονία 7%, Νορβηγία 7%, Φινλανδία 9%), ενώ 10 χώρες αναφέρουν ανθεκτικότητα >10% και 3 από αυτές ποσοστά >35% (Ιταλία 38%, Κύπρος 45% και Τουρκία 52%).(EARSS).

Σημαντικό στοιχείο είναι ότι η *E.coli* είναι υπεύθυνη για πάνω από το 80% της οξείας κυστίτιδας (κυρίως σε νεαρές γυναίκες) και των ουρολοιμώξεων. Αυξημένη αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένου και της αμπικιλίνης και τριμεθοπρίμης και τριμεθοπρίμης-σουλφοναμίδων έχουν αναφερθεί στο Ην. Βασίλειο (Gruneberg, 1995), και σημαντική αύξηση των ανθεκτικών στελεχών *E.coli* στις φθοριοκινολόνες έχουν αναφερθεί και σε άλλες χώρες. (Threlfall,1997, Garcia-Rodriguez,1995). Τα ανθεκτικά στελέχη συχνά απομονώθηκαν από ασθενείς που είχαν λάβει αγωγή με φθοριοκινολόνες (Al Lehn et al., 1996) ή σε ασθενείς με ουρολοίμωξη (Ozeki et al. 1997).

Σύμφωνα με το EARSS, όσον αφορά τις αμινογλυκοσίδες, μόνο σε έξι χώρες παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά αντοχής (Σουηδία 2%, Βοσνία 3%, Νορβηγία 3%, Φινλανδία 4%, Δανία 4%, Βέλγιο 4 %, ενώ τα ψηλότερα παρατηρήθηκαν στην Βουλγαρία (31%) και στην Τουρκία (35%), ενώ τα τελευταία 4 χρόνια είχαμε αύξηση της ανθεκτικότητας σε 16 χώρες. Όσον αφορά τις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς τα ποσοστά είναι χαμηλά στις περισσότερες χώρες με εξαίρεση την Βουλγαρία (29%) και την Τουρκία (42%).

Σε μελέτη που έγινε στην Πενσυλβανία των Η.Π.Α. τα ποσοστά ανθεκτικότητας ήταν για τα στελέχη των χοίρων: 75% για σουλφοναμίδες, 71% για τετρακυκλίνη, 23% για την αμπικιλίνη ενώ για τα στελέχη των χοιροτρόφων: 27% για την τετρακυκλίνη , 25% για σουλφομεθοξόλη και 15% για την αμπικιλίνη.(Schroeder et al. 2002).

Στην Ιταλία (ITAVARM 2005), σε στελέχη 255 χοίρων τα αποτελέσματα ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά ήταν τα παρακάτω: 50% στην αμπικιλίνη, 78% στην τετρακυκλίνη, 58,8% στις σουλφοναμίδες, 25% στη χλωραμφαινικόλη, 7 % στη γενταμυκίνη και 9% στο ναλιδιξικό οξύ.

Στην Ελλάδα σε μελέτη που έγινε στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σε 135 στελέχη χοίρων τα ποσοστά ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκαν ήταν: 70, 4% για την αμπικιλίνη, 31,85% για τη χλωραμφαινικόλη, 15,5% για τη γενταμυκίνη, 100% για την τετρακυκλίνη και 55,5 % για τη σουλφομεθοξόλη, δηλαδή μεγάλη ανθεκτικότητα στην

τετρακυκλίνη και την αμπικιλίνη, αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια για θεραπευτικούς σκοπούς και για προφύλαξη στου εντατικού τύπου εκτροφές.(Σαρρής Κ. και συνεργάτες, 2002).

Σε αντίστοιχη εργασία στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας ( Α.Μηνάς και συνεργάτες, 2007) ,σε 108 στελέχη χοίρων παρατηρήθηκαν υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας και πάλι στην τετρακυκλίνη(57%), σουλφομεθοξόλη(5,37%), και αμπικιλίνη (13,89%).

Τέλος τα χαμηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στην γενταμυκίνη οφείλονται στο γεγονός η χρήση της είναι μηδενική, ενώ για την χλωραμφαινικόλη αν και έχει απαγορευτεί εδώ και 17 χρόνια –λόγω της καταστολής του Ν.Μ. που προκαλεί στον άνθρωπο η οποία οδηγεί σε απλαστική αναιμία (Μουζουράς, 1997)-αναφέρεται ότι, η αντίσταση σε ένα αντιβιοτικό μπορεί να παραμένει πολύ καιρό μετά την κατάργηση του, γεγονός που εξηγείται από το ότι το γονίδιο που είναι υπεύθυνο μπορεί να παραμένει παρών ως αποτέλεσμα της χρήσης άλλων αντιβιοτικών στα οποία οι καθοριστές είναι γενετικώς συνδεδεμένοι στο ίδιο πλασμίδιο η τρανσποζόνιο (Phillips et. Al. 2005).

## **ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΠΤΗΝΑ-ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΟΥΣ**

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 18 στελέχη πτηνών από τα οποία τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν στις τετρακυκλίνες (83,3%), κινολόνες (66,7%) και στην νεομυκίνη (33,3%) ενώ στα στελέχη των πτηνοτρόφων τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν πάλι στις τετρακυκλίνες και την αμπικιλίνη (66,7%) και στο ναλιδιξικό οξύ (50%). Τα στοιχεία αυτά είναι σε συμφωνία με παλιότερες μελέτες οι οποίες αποδεικνύουν ότι η χρήση αντιμικροβιακών αποτελεί βασικό παράγοντα για την εμφάνιση μικροβιακής αντοχής στην *E.coli*.(Meng j., Zhao, DebRoy C. Torrcolini j. 1997)

Σύμφωνα με την F.D.A. US Food and Drug Administration, τα ποσοστά  
[136]



ανθεκτικότητας που αναφέρονται για τα στελέχη που απομονώθηκαν από ανθρώπους είναι: 59% στην σουλφομεθοξόλη, 55% στην αμπικιλίνη, 57% στις τετρακυκλίνες και 35% στην χλωραμφαινικόλη ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ανθεκτικότητας για τα στελέχη των πτηνών είναι: 85% στη σουλφομεθοξόλη, 82% στη στρεπτομυκίνη, 71% στη τετρακυκλίνη, 50% στην αμπικιλίνη, 25% στη γενταμυκίνη και 20% στο ναλιδιξικό οξύ. Επίσης παρατηρείται πολλαπλή ανθεκτικότητα στις πενικιλίνες και σουλφοναμίδες. Εκτεταμένη αντίσταση στην σουλφομεθοξόλη συνεπάγεται την παρουσία της κατηγορίας I integrons, που είναι επίσης σημαντική για την εμφάνιση ανθεκτικότητας απέναντι σε πολλές αντιμικροβιακές ουσίες.

Στην Ισπανία, υψηλά ποσοστά αντοχής σε στελέχη (67-95%) πουλερικών παρατηρήθηκαν σε: στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη, σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη-σουλφοναμίδες, ενώ το 13-24% ήταν ανθεκτικά στις φθοριοκινολόνες (Blanco, 1999).

Στη Φινλανδία, τα ποσοστά ήταν 4% στη στρεπτομυκίνη και 15% στην τετρακυκλίνη (Tast, 1999).

Για αντιβιοτικά όπως η τριμεθοπρίμη και οι φθοριοκινολόνες υπάρχουν επιδημιολογικά στοιχεία της αντιστοιχίας μεταξύ άδειας κυκλοφορίας (αδειοδότηση) και εμφάνισης ανθεκτικότητας. (Martel, 1998, Wray, 1995)

Στην έκθεση που παρουσίασε η Ιταλία το 2004 (ITAVARM) σε στελέχη 258 πτηνών τα ποσοστά ανθεκτικότητας ήταν: 73% για την τετρακυκλίνη, 18% για τη χλωραμφαινικόλη, 49% για ναλιδιξικό οξύ, 59% για τη σουλφομεθοξόλη, 4,5% για τη γενταμυκίνη και 54% για την αμπικιλίνη

Σε αντίστοιχη μελέτη που έγινε στην Ολλανδία το 2008 τα ποσοστά ανθεκτικότητας στα στελέχη των πτηνών ήταν: 58,2% για την τετρακυκλίνη 25,2% για την χλωραμφαινικόλη 61,8% για ναλιδιξικό οξύ 70,9% για την σουλφομεθοξόλη 14,5% για την γενταμυκίνη 18% και 65,4% για την αμπικιλίνη (MARAN 2008).

Στην Αλβανία, παρατηρήθηκε σημαντική ανθεκτικότητα στις φθοριοκινολόνες. Σε 101 στελέχη πτηνών τα ποσοστά ανθεκτικότητας ήταν 100% στην ερυθρομυκίνη, 90% στην αμπικιλίνη, 97% στην τετρακυκλίνη, 87% στην στρεπτομυκίνη, και 78% στην νεομυκίνη, γεγονός που αποδεικνύει την αυξημένη χρήση αντιβιοτικών στις πτηνοτροφικές μονάδες της χώρας (Shtylla T. et al. 2009).

Η Σουηδία (SVARM 2009) αντίθετα, σε 297 στελέχη πτηνών δίνει ποσοστά 5% για την αμπικιλίνη, <1% για χλωραμφαινικόλη και γενταμυκίνη, 7% για ναλιδιζικό οξύ, 3% για τετρακυκλίνη και σουλφοναμίδες, ενώ 85 στελέχη εμφάνισαν πολλαπλή ανθεκτικότητα σε περισσότερα από 1 αντιβιοτικά.

Στη Δανία (DANMAP 2008), το 2008 παρατηρήθηκε αύξηση της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη κατά 137% σε σχέση με το 2007 σε στελέχη πτηνών. Παρ' όλα αυτά είναι σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με άλλα είδη. Πριν το 2007, η αμοξικιλίνη και οι φθοριοκινολόνες αποτελούσαν το 90% των χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών στα πτηνά.

Το 2007, παρατηρήθηκε αύξηση της ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες και μακρολίδες, ενώ η κατανάλωση των κινολόνων στα πτηνά μειώθηκε κατά 97% το 2008 σε σχέση με το 2006. Τα ποσοστά κατανάλωσης μειώθηκαν από 16% το 2007 στο 2% το 2008.

Αξιοσημείωτα είναι τα υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στο ναλιδιζικό οξύ γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην θεραπευτική χρήση κινολόνων στα πτηνά καθώς και στην θεραπεία λοιμώξεων στους πτηνοτρόφους. Στην παρούσα εργασία τα ποσοστά ανθεκτικότητας για τα στελέχη των χοίρων ήταν 21%, για τα στελέχη των χοιροτρόφων ήταν 15,78% , ενώ για τα στελέχη των πτηνών ήταν 63,1% και για τα στελέχη των πτηνοτρόφων 50%. Το υψηλό ποσοστό ανθεκτικότητας των στελεχών που απομονώθηκαν από τους πτηνοτρόφους μπορεί επίσης να οφείλεται και στο γεγονός ότι πάνω από το 50% του δείγματος ήταν άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 55 ετών.

Οι κινολόνες γενικά χρησιμοποιούνται στα πτηνά και εμφανίζουν ανθεκτικότητα με λίγες μόνο μέρες θεραπείας (Jacobs-Reitsma, 1995). Στην Σουηδία χρησιμοποιούνται περιστασιακά σε ποσοστό έως 10% (Berndtson , 1995).

Στην Ολλανδία αξιοσημείωτη είναι η αύξηση ανθεκτικότητας στο ναλιδιζικό οξύ το 2008 σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60% σε σχέση με το 2007 που ήταν μέχρι 50% (MARAN 2008).

Τα ποσοστά ανθεκτικότητας στο ναλιδιζικό οξύ στα στελέχη των πτηνών ήταν για το 2005: για την Αυστρία 54%, τη Δανία 10%, τη Φινλανδία 2%, τη Γαλλία 28%, την Ιταλία 50% την Ολλανδία 35%, τη Νορβηγία 1% και τη Σουηδία 5%.

## ΜΕΤΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

Όπως έχει επισημανθεί το φαινόμενο της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών (είτε πρόκειται για ζωνοσογόνα βακτήρια είτε πρόκειται για κοινά παθογόνα) στα αντιμικροβιακά φάρμακα, είναι πολύπλοκο. Επομένως η πρόληψη και αντιμετώπιση της εμφάνισης του φαινομένου της ανθεκτικότητας πρέπει να είναι συνισταμένη πολλών παραγόντων. Ακόμη πρέπει να γίνει αντιληπτό ότι ο έλεγχος των ανθεκτικών μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά φάρμακα δεν είναι μόνο πρόβλημα που αφορά την Κτηνιατρική, αλλά αποτελεί κοινό στόχο και ευθύνη τόσο της Κτηνιατρικής όσο και της Ιατρικής, προκειμένου να διασφαλισθεί η υγεία των ζώων και η Δημόσια Υγεία. Άλλωστε η Ε.Ε. αναγνωρίζει την ανάγκη οι κτηνίατροι να συντονίσουν τις προσπάθειες τους προκειμένου:

α) να διατηρήσουν τα ευεργετικά αποτελέσματα από τη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα και στον άνθρωπο, και

β) να εξασφαλίσουν ότι η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα έχει τις λιγότερες δυνατές αρνητικές επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία .

Για την αντιμετώπιση του φαινομένου της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά φάρμακα και των επιπτώσεων που έχει, πρέπει να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα τα οποία είναι τα εξής:

- Εφαρμογή προγράμματος επιτήρησης-καταγραφής, της κατανάλωσης αντιμικροβιακών φαρμάκων
- Εφαρμογή της Ορθής Κτηνιατρικής Πρακτικής
- Εκπαίδευση κτηνιάτρων και εκτροφέων
- Εφαρμογή εμβολιασμών και προληπτικών προγραμμάτων ελέγχου-εκρίζωσης νοσημάτων
- Εφαρμογή μέτρων υγιεινής, βιοασφάλειας και ορθής διαχείρισης εκτροφών
- Εφαρμογή εναλλακτικών των αντιμικροβιακών φαρμάκων τρόπων θεραπείας

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ-ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΗΣ  
ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ  
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

Προγράμματα επιτήρησης-καταγραφής της κατανάλωσης αντιμικροβιακών φαρμάκων και εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών μικροοργανισμών υπάρχουν σε πολλές χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Αυστρία, Βέλγιο, Γαλλία, Γερμανία, Δανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ιρλανδία, Ισπανία, Ιταλία, Ολλανδία, Πορτογαλία, Σουηδία και Φιλανδία), αλλά και στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η επιτήρηση και η καταγραφή των ανθεκτικών στελεχών είναι απαραίτητη για την κατανόηση της επιδημιολογίας των ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά φάρμακα μικροοργανισμών τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους.

Ο σκοπός και το αντικείμενο των προγραμμάτων επιτήρησης – καταγραφής είναι:

- α) να παρέχουν λεπτομερή στοιχεία για τα χαρακτηριστικά της ευαισθησίας διάφορων μικροοργανισμών που βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα όπως π.χ. *Salmonella spp.* των ζώων και των ανθρώπων,
- β) να ταυτοποιήσουν την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών που απομονώνονται από τα ζώα και τους ανθρώπους,
- γ) να παρέχουν πληροφορίες στους κτηνιάτρους και στους γιατρούς,
- δ) να επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής των εγκεκριμένων αντιμικροβιακών φαρμάκων με την προώθηση της ορθολογικής χρήσης τους, και
- ε) να ανιχνεύσουν το φαινόμενο της ανθεκτικότητας που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση

Στην Ελλάδα δεν υπάρχει ανάλογο πρόγραμμα επιτήρησης δεδομένου ότι δεν υπάρχει επίσημη καταγραφή της κατανάλωσης αντιμικροβιακών φαρμάκων από τα παραγωγικά ζώα, ούτε από τον Ε.Ο.Φ, ούτε από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Επομένως, ένα πρώτο βήμα θα ήταν να οργανωθεί από το Υπουργείο σε συνεργασία με τον Ε.Ο.Φ, ένα σύστημα καταγραφής των ποσοτήτων των

αντιμικροβιακών φαρμάκων που πωλούνται στην Ελλάδα, δεδομένου ότι τα στοιχεία αυτά παρέχονται συστηματικά από τις φαρμακευτικές εταιρίες.

Ένα δεύτερο βήμα θα ήταν να οργανωθεί από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων ένα σύστημα επιτήρησης και καταγραφής των ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά φάρμακα μικροοργανισμών.

## **ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΟΡΘΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΡΑΚΤΙΚΗΣ**

Ορθή Κτηνιατρική Πρακτική, είναι η επιλεκτική και ενδεδειγμένη χρήση των εγκεκριμένων κτηνιατρικών φαρμάκων (δηλαδή σύμφωνα με τις ενδείξεις και τις οδηγίες χρήσης), μετά τη διάγνωση του νοσήματος και εφόσον έχουν ληφθεί υπόψη η ύπαρξη καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, καθώς και οι επιπτώσεις στο περιβάλλον.

Η Ομοσπονδία Κτηνιάτρων της Ευρώπης (Federation of Veterinarians in Europe) θέσπισε έναν Κώδικα Ορθής Κτηνιατρικής Πρακτικής, προκειμένου να αποτελέσει τη βάση πάνω στην οποία θα στηριχθεί η κατάρτιση σε κάθε χώρα της Ευρώπης του δικού της Κώδικα, όπως έχει γίνει στην Ιταλία από το 1993 (Italian Ethical Code, IEC) και στη Γερμανία από το 2000. Ο Κώδικας της Ορθής Κτηνιατρικής Πρακτικής παίζει σημαντικό ρόλο στη διασφάλιση:

- της υγείας και ευζωίας των ζώων,
- της Δημόσιας Υγείας, και
- της προστασίας του περιβάλλοντος.

Η συνετή χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της Ορθής Κτηνιατρικής Πρακτικής και στοχεύει στην μεγιστοποίηση του θεραπευτικού αποτελέσματος ταυτόχρονα με την ελαχιστοποίηση της «επιλογής» ανθεκτικών μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Η συνετή χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων βασίζεται:

Στη λήψη αναμνηστικού.

Στη γνώση της παθοφυσιολογίας της λοίμωξης.

[141]

Στη γνώση της φαρμακοκινητικής συμπεριφοράς του αντιμικροβιακού φαρμάκου.

Στη γνώση παραγόντων που μπορεί να τροποποιήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου.

Στη γνώση της τοξικότητας ορισμένων φαρμάκων.

Στη γνώση της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος του ζώου.

Η λύση στο πρόβλημα θα είναι η σωστή εκπαίδευση τόσο των κτηνιάτρων όσο και των εκτροφέων, ώστε να τηρείται η συνταγογράφηση των κτηνιατρικών φαρμάκων, γεγονός που αποτελεί τον θεμέλιο λίθο οποιουδήποτε προγράμματος επιτήρησης και καταγραφής κατανάλωσης αντιμικροβιακών φαρμάκων από τα ζώα.

## **ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΩΝ ΚΑΙ ΕΚΤΡΟΦΕΩΝ**

Όπως προαναφέρθηκε, απαιτείται εκπαίδευση κτηνιάτρων τόσο στα πλαίσια των σπουδών τους όσο και με συνεχή επιμόρφωση κατά τη διάρκεια της άσκησης του επαγγέλματός τους. Η εκπαίδευση των κτηνιάτρων πρέπει να εστιαστεί στα προβλήματα υγείας των παραγωγικών ζώων και στη σωστή χρήση των κτηνιατρικών γενικά και των αντιμικροβιακών ειδικά φαρμάκων, για την πρόληψη και την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων. Επίσης, είναι απαραίτητο να υπάρχει συνεχής ενημέρωση των κτηνιάτρων για τα φαρμακευτικά σκευάσματα, προκειμένου να βελτιωθεί η χρήση των φαρμάκων αυτών για τη θεραπεία των νοσημάτων των παραγωγικών ζώων, να ελαχιστοποιηθεί το πρόβλημα καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και να αποτραπεί η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Σκοπός δηλαδή της εκπαίδευσης των κτηνιάτρων είναι να μπορούν στην πράξη να εξισορροπήσουν την ηθική τους υποχρέωση που αφορά την υγεία των ζώων έναντι του πιθανού κινδύνου για τη Δημόσια Υγεία.

Η εκπαίδευση των κτηνιάτρων αποτελεί το πρώτο και ουσιαστικό βήμα για την μετέπειτα εκπαίδευση των εκτροφέων. Οι εκτροφείς πρέπει να εκπαιδευτούν προκειμένου να κάνουν σωστή και όχι ανεξέλεγκτη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Πρέπει να κατανοήσουν:

- α) να τηρούν το μητρώο φαρμακευτικής αγωγής,
- β) να προμηθεύονται τα αντιμικροβιακά φάρμακα μόνο μετά από συνταγή κτηνιάτρου,
- γ) να τηρούν αυστηρά τις οδηγίες χρήσης και τους χρόνους αναμονής και τέλος
- δ) να αποφεύγουν την ρύπανση του περιβάλλοντος (έδαφος, νερό) με τα υπολείμματα των φαρμάκων.

### **ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ-ΕΚΡΙΖΩΣΗΣ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ**

Τα εμβόλια αποτελούν μέτρο πρόληψης πολλών βακτηριακών και ιογενών νοσημάτων των ζώων. Εφαρμόζοντας στις εκτροφές ένα σωστό εμβολιακό πρόγραμμα, μειώνεται ο κίνδυνος εμφάνισης νοσημάτων που για την αντιμετώπιση τους θα απαιτούνταν η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η «πίεση επιλογής» για τη δημιουργία ανθεκτικών μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά φάρμακα που μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι δεν υπάρχουν εμβόλια για όλα τα νοσήματα οπότε απαιτείται πολλές φορές χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων. Πάντως η προγραμματισμένη και επαναλαμβανόμενη χρήση τους συμβάλλει σημαντικά στην εξασφάλιση ικανοποιητικής ανοσίας των παραγωγικών ζώων έναντι πολλών μικροοργανισμών, γεγονός που αποτελεί τη βάση για την καλή υγιεινή κατάσταση της εκτροφής.

Εκτός από τους εμβολιασμούς σημαντικό ρόλο στην πρόληψη ασθενειών και κατά συνέπεια στη μείωση χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων, παίζουν τα διάφορα προγράμματα ελέγχου-εκρίζωσης ασθενειών που εφαρμόζονται στη χώρα μας.

### **ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΤΡΩΝ ΥΓΙΕΙΝΗΣ, ΒΙΟΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΟΡΘΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΤΡΟΦΩΝ**

Η τήρηση των μέτρων υγιεινής και βιοασφάλειας μειώνει κατά πολύ την είσοδο, τον πολλαπλασιασμό και τη μετάδοση των διαφόρων μικροοργανισμών στην

εκτροφή, που ευθύνονται για σοβαρά νοσήματα των ζώων και που πολλές φορές μεταδίδονται και στον άνθρωπο. Ενδεικτικά κάποια από αυτά τα μέτρα είναι :

α) ο περιορισμός της πρόσβασης στους χώρους της εκτροφής (π.χ. κατάλληλη τοποθεσία, ύπαρξη περίφραξης),

β) ο περιορισμός του αριθμού των επισκεπτών,

γ) η αλλαγή των ρούχων και των υποδημάτων των επισκεπτών πριν την είσοδο τους στην εκτροφή,

ε) η καταπολέμηση των εντόμων και τρωκτικών,

στ) ο τακτικός καθαρισμός και απολύμανση των χώρων εκτροφής των ζώων

η) η χορήγηση καλής ποιότητας τροφής απαλλαγμένης από μικροοργανισμούς π.χ. *Salmonella spp.*, που είναι δυνατόν να μολύνουν τα ζώα κ.λ.π.

Σημαντικό επίσης ρόλο στην πρόληψη των νοσημάτων παίζει και η διαχείριση της εκτροφής. Τα γενικά διαχειριστικά μέτρα μιας εκτροφής περιλαμβάνουν τα απαιτούμενα μέτρα υγιεινής και βιοασφάλειας, ενώ τα ειδικά διαχειριστικά μέτρα εφαρμόζονται σε σχέση με το επίπεδο υγείας των ζώων στη μονάδα, με αποτέλεσμα την εύρυθμη και αποδοτική λειτουργία της. Η σωστή διαχείριση μειώνει στο ελάχιστο δυνατό κάθε στρεστικό παράγοντα που πιθανόν να προκαλεί ανοσοκαταστολή στο ζώο και να το κάνει ευάλωτο στις διάφορες λοιμώξεις.

Ενδεικτικά, κάποια στοιχεία της ορθής διαχείρισης είναι:

- Η εφαρμογή συστήματος all in-all out όπου αυτό είναι δυνατό. Το σύστημα αυτό δίνει τη δυνατότητα να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται οι θάλαμοι κάθε φορά που αδειάζουν από ζώα, οπότε τα νεοεισερχόμενα μπαίνουν σε καθαρό περιβάλλον απαλλαγμένο κατά το μέγιστο δυνατό από μικροοργανισμούς
- Η απομόνωση των νεοεισερχόμενων ζώων για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 20 ημερών.
- Η κατασκευή σωστά διαμορφωμένων σταβλικών εγκαταστάσεων που εξασφαλίζουν κατάλληλη θερμοκρασία, υγρασία και αερισμό στα εκτρεφόμενα ζώα
- Η διασφάλιση της ευζωίας των ζώων
- Έλεγχος των νεοεισερχόμενων ζώων και σπέρματος για την περίπτωση που είναι



φορείς παθογόνων μικροοργανισμών.

## **ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Τα τελευταία 10-15 χρόνια υπάρχει μια σταθερή μείωση του αριθμού των νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων που εισάγονται στην κλινική χρήση, ενώ αυτά που εισήλθαν στην αγορά αυτήν την περίοδο ήταν δομικές παραλλαγές των ήδη υπαρχόντων. Από την άλλη πλευρά, κάθε χρόνο όλο και μεγαλύτερος αριθμός παθογόνων βακτηρίων αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα περισσότερα από τα συνηθισμένα αντιμικροβιακά φάρμακα. Τα γεγονότα αυτά, καθιστούν αναγκαία την εύρεση άλλων, εκτός των αντιμικροβιακών φαρμάκων, εναλλακτικών τρόπων αντιμετώπισης των βακτηρίων.

Ένας από τους τρόπους αυτούς είναι η χρησιμοποίηση φυτών στη θεραπευτική των ζώων. Τα φυτά περιέχουν διάφορες αρωματικές ουσίες (φαινόλες ή τανίνες) που αποτελούν μηχανισμό αυτοάμυνας τους έναντι διαφόρων μικροοργανισμών ή εντόμων. Οι ουσίες αυτές έχουν μελετηθεί από διάφορους ερευνητές και έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη πολλών παθογόνων και ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά φάρμακα βακτηρίων. Εκτός μάλιστα από την παρατήρηση ότι ορισμένα φυτικά εκχυλίσματα αναστέλλουν την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιμικροβιακά φάρμακα, υπάρχουν και αναφορές ερευνητών ότι ορισμένα φυτά, καθώς και τα αιθέρια έλαια δρουν κατά των πλασμιδίων ανθεκτικότητας (R- plasmids).

Τέλος, μια άλλη εναλλακτική μέθοδος της χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα είναι η θεραπεία με φάγους ή βακτηριοφάγους. Οι βακτηριοφάγοι ή φάγοι αποτελούν ιούς που εισέρχονται μέσα στο βακτηριακό κύτταρο. Στην περίπτωση των λυτικών φάγων, διαταράσσουν το μεταβολισμό του βακτηρίου και προκαλούν τη λύση του. Η θεραπεία με φάγους συνίσταται στη χρήση των λυτικών βακτηριοφάγων για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων. Η

θεραπεία με φάγους μπορεί να αποδειχθεί ως μια σημαντική εναλλακτική λύση της χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων, για τη θεραπεία λοιμώξεων από μικροοργανισμούς που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε πολλά αντιμικροβιακά φάρμακα

# ***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

[147]

Aarestrup F., Schwarz S., 2006: Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Streptococci of Animal Origin. In:Antimicrobial Resistance in bacteria of animal origin by F.M.Aarestrup, ASM Press, Washington D.C.

Aarestrup F., 2006: Concluding remarks and future aspects: some personal views. In:Antimicrobial Resistance in bacteria of animal origin by F.M.Aarestrup, ASM Press, Washington D.C.

Aires J.R., Kohler T., Nikaido H., Plesiat P., 1999: Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2624-2628.

Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2000: Bacterial drug resistance: response to survival threats, in: Storz, G., Hengge-Aronis R.(Eds), Bacterial stress responses, ASM Press, Washington D.C.,pp.323-366.

Ambler R.P., 1980: The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.* 289, 321-331.

Bager, F., Helmuth, R., 2001: Epidemiology of quinolone resistance in Salmonella. *Vet. Res.* 32, 285-290.

Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas R., & McArthur J.V., 2006: Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14:177-182.

Barragry T.B., 1994: Veterinary Drug Therapy. Lea & Febiger, Pennsylvania, U.S.A.

Barza M., 2002: Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals. *Clin. Infect. Dis.* 34, S123-S125.

Beauclerk A., Cundliffe E., 1987: Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J. Mol. Biol.* 20, 661-671.

Bennett, P.M., 1995: The spread of drug resistance, in: Baumberg S., Young J.P.W., Wellington E.M.H., Saunders J.R., (Eds), *Population Genetics in Bacteria*, University Press, Cambridge, pp.317-344.

Bischoff K.M., White D.G., Mc Dermott P.F., Zhao S., Gaines S., Mauer J.J., Nisbet D.J., 2002: Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. *J. Clin. Microbiol.* 40, 389-394.

Boatman, M., 1998: Survey of antimicrobial usage in animal health in the European union, Boatman consulting, Sept.1998, by order of FEDESA

Bories, G., Louisot, P., 1998: Rapport concernant l' utilisation d' antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation. Rapport presente au Ministere de l' Agriculture, de la Peche et de Alimentation, 23p.

Broer, S., Broer, G.Ji,A., and Silver, S., 1993: Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinant of *Staphylococcus aureus* Pi258. *J.Bacteriol.* 175:3480-3485.

Brown E.M., Nathwani D., 2005: Antibiotic cycling or rotation: a systematic review of the evidence of efficacy. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 6-9.

Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A., 1995: A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211-1233.

Bywater R.J., 2004: Veterinary Use of Antimicrobials and Emergence of Resistance in

Zoonotic and sentinel Bacteria in the E.U. *J. Vet. Med.* 51, 361-363.

Bywater R.J., Casewell M., 2000: An assessment of the impact of antibiotic resistance in different bacterial species and of the contribution of animal sources to resistance in human infectious. *J. Antimicrob. Chemother.* 46,643-645 (erratum: 1052).

Capitano, B. & Nightingale C.H., 2001: Optimizing antimicrobial therapy through use of pharmacokinetic/pharmacodynamic principles. *Mediguide to Infectious Diseases* 21, 1-8.

Chanishvili N., Chanishvili T., Tediashvili M., Barrow P.A., 2001; Phages and their application against drug-resistant bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 689-699.

Charpentier E., Courvalin P., 1997: Emergence of the trimethoprim resistance gene *dhfrD* in *Listeria monocytogenes* BM4293. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1124-1136.

Chaslus-Dancla E., Martel J.L., Carlier C., Lafont J.P., Courvalin P., 1986 : Emergence of aminoglycoside 3-N-acetyltransferase IV in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from animals in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29, 239-243.

Choi C., Ham H.J., Kwon D., Kim J., Cheon D.S., Min K., Cho W.S., Chung H.K., Jung T., Jung K., Chae C., 2002: Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 71-73.

Chung W.O., Werckenthin C., Schwarz S., Roberts M.C., 1999: Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in human and animal bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 5-14.

Cloekaert A., Chaslus-Dancla E., 2001: Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. *Vet. Res.* 32, 291-300.

Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., and Taylor D.E., 2003: Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* 47, 3675-3681.

Craig, W.A., Andes D., 1996; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. *Pediat Infect Dis J* 15: 255-259.

Dancer, S.J., Shears, P., Platt D.J., 1997: Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic. *J. Appl. Microbiol*, 82(5):597-609.

Danielsen M., 2003: Antibiotic resistance in Food. *BIOforum Europe*, (Mar): 2-3.

Davidson D.J. 2004: Proposal to withdraw approval of the new animal drug application for enrofloxacin in poultry. *U.S. Food and Drug Administration*, Rockville, Md.

Davies J., Wright G.D., 1997: Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 5, 375-382.

Davies, J., 1994: Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375-381.

Devriese L.A., Vandamme L.R., Fameree L., 1972: Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zbl, Vet. B* 19, 598-605.

Endtz H.P., Gijs J.R., Vanklingeren B., Jansen W.H., van der Reyden T., Mouton R.P., 1991: Quinolone resistance in campylobacter isolated from men and poultry following the introduction of flouroquinolones in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemother* 27,199-208.

Engberg J., Neimann J., Nielsen E.M., Aarestrup F.M., 2004: Quinolone-resistant *Campylobacter* infections: risk factors and clinical consequences. *Emerg. Infect. Dis.* 10,1056-1063.

Everett M.J., Jin Y.F., Ricci V., Piddock L.J.V.,1996: Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2380-2386.

Everett M.J., Piddock L.J.V., 1998: Mechanisms of resistant to fluoroquinolones. p.p.259-296. In: Quinolones antibacterials by Kuhlmann J., Dalhoff A., Zeiler H.-J. SpringerVerlag Berlin Heidelberg.

Fishman N.,2006: Antimicrobial Stewardship.*Amer. J. of Medicine.* 119, S53-S61.

Fuller R., 1992; History and development of probiotics. In: Probiotics-The scientific basis by R.Fuller, Chapman & Hall, London.

Gaskins, H.R., Collier, C.C., & Anderson, D.B., 2002: Antibiotics as growth promotants:mode of action. *Animal Biotechn.*13, 29-42.

Gaze W., O'Neill C., Wellington E., 2008: Antibiotic resistance in the environment, with particular reference to MRSA. *Adv. in Applied Microbiol.* 63, 250-270.

Georgeopapadakou N.H.,1993: Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to  $\beta$ -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2045-2053

Glynn M.K., Reddy V., Hutwagner L., Rabatsky-Ehr T., Shiferaw B., Vugia D.J., Segler S., Bender J., Barrett T.J., Angulo F.J., 2004: Prior antimicrobial agent use increases the risk of sporadic infections with multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: a FoodNet case control study, 1996-1997. *Clin. Infect. Dis* 38, S227-S236.



Gnanou, J.C., 1998: Antibiotic Resistance in Bacteria from Animal Origin-Analysis of national Monitoring Programs 1997. Fougères, France: CNEVA.

Gomez T.M., Motarjemi Y., Miyagawa S., Kaferstein F.K., Stohr K., 1997: Foodborne salmonellosis. *World Health Stat. Q* 50, 81-89

Goodtz T.D., 2006: The forgotten Gram-negative bacilli: what genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochem Pharmacol* 71(7):1073-1084.

Grape M., Sundstrom L., Kronvall G., 2003: Sulphonamide resistance gene sul3 found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 1022-1024.

Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., 2006: Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368, 874-885.

Guardabass and Courvalin, 2006: Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance In: Antimicrobial Resistance in bacteria of animal origin by F.M. Aarestrup, ASM Press, Washington D.C

Guerra B., Junker E., Helmuth R., 2004: Incidence of the newly described sulfonamide resistance gene sul3 among, German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2712-2715.

Guthrie, C.A., Vogel, G.J. & Laudert, S.B., 1997: Effects of tilmicosin on the incidence of bovine respiratory disease and animal performance when used in temperature-based therapy and complete metaphylaxis treatment programs. In *Proceedings of the Thirtieth Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners With the Society for*

*Theriogenology*, Montreal, Quebec, Canada, p.134. American Association of Bovine Practitioners, Rome, GA, USA.

Hackbath C.J., Chambers H.F., 1989: Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanism of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 991-994.

Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S., and White, D.G., 2006: Genetics of Antimicrobial Resistance. *Animal Biotechnol.* 17: 111-124.

Harrow S.A., Gilpin B.J., and Klena J.D., 2004: Characterization of erythromycin resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from pig offal in New Zealand. *J. Appl. Microbiol.* 97, 141-148.

Hasman H., Aarestrup F.M., 2002: tcrB, a gene conferring transferable cooper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* 46, 1410-1416

Hasman H., Aarestrup F.M., 2005: Relationship between cooper, glycopeptide, and macrolide resistance among *Enterococcus faecium* strains isolated from pigs in Denmark between 1997 and 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 454-456

.

Helms M., Simonsen J., Olsen K.E.P., Molbak K., 2005: Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. *J. Infect. Dis.* 191, 1050-1055.

Hinton M., 1986: The ecology of *Escherichia coli* in animals including man with particular reference to Drug Resistance. *Vet. Record* 111, 420-426.

Holberg S.D., Wells G. J., Cohen M.L., 1984: Animal-to-man transmission of

antimicrobial-resistant Salmonella: investigations of U.S. outbreaks, 1971-1983. *Science* 225, 833-835.

Hooper D.C., 1999: Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Res. Updates* 2, 38-55.

Hooper D.C., Wolfson J.S., Bozza M.A., Ng E.Y., 1992: Genetics and regulation of outer protein expression by quinolone resistance loci *nfxB*, *nfxC*, and *cfxB*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1151-1154.

Huovinen P., 2001: Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1608-1614.

Huovinen P., Sundstrom I., Sweldberg G., Skold O., 1995: Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 279-289.

Jansen W.T.M., van der Bruggen J.T., Verhoef J., Fluit A.C., 2006: Bacterial resistance: A sensitive issue. Complexity of the challenge and containment strategy in Europe. *Drug Resist. Updates* 9, 123-133.

Jones M.E., Sahn D.F., Martin N., Scheuring S., Heising P., Thornsberry C., Kohrer K., Schmitz F.-J., 2000: Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from worldwide surveillance studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 462-466.

Kamata K., Onuki H., Hirota H., Yamamoto Y., Hayashi M., Komiyama K., Sato M., Ishibashi M., 2004: Tubiferal A, a backbone-rearranged triterpenoid lactone isolated from the myxomycete *Tubifera dimorphotheca*, possessing reversal of drug resistance activity. *Tetrahedron* 60, 9835-9839

Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K.,2000: A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.*44, 1549-1555

Kohler T., Kok M., Michea-Hamzeshpour M., Plesiat P., Gotoh N., Nishino T., Curty L.K., Pechere J.-C.,1996: Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.*40, 2288- 2290.

Lawrence, K., 1998: Growth promoters in swine. In: *Proceedings of the 15th IVPS Congres* (Birmingham, England). 5-9 July. International Pig Veterinary Society.

Leclercq R., Courvalin P., 1991: Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1273-1276

Leclercq R., Courvalin P.,1991 : Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1267-1272.

Lee J.H., 2003: Methicillin (oxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. and Envir. Microbiol.* 69, 6489-6494.

Lees, P. & Aliabadi, F.S., 2002: Rational dosing of antimicrobial drugs: animal versus humans *.Intern. J. of Antimicrob. Agents* 19, 269-84.

Levy S.B., McMurry L.M., Barbosa T.M., Burdet V., Courvalin P., Hillen W., Roberts MC., Rood JI., Taylor DE., 1999: Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother* 43, 1523-1524.

Livermore D.M., 1995:  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol.Rev.* 8, 557-584.

Martel J., Coudert M., 1993: Bacterial resistance monitoring in animals: the French national experiences of surveillance schemes. *Vet Microbiol* 35, 321-338.

Mathur MD., Vidhani S., Mehndiratta PL., 2003: Bacteriophage therapy: an alternative to

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., Davies, J., 1998: A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280(5363):605-608.

Mc Dermott P., 2006: Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal Salmonellae:  
In:Antimicrobial Resistance in bacteria of animal origin by F.M.Aarestrup, ASM Press, Washington D.C.

McDermott P.F., Walker R.D., White D.G., 2003: Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol* 22:135-143.

McEwen S.A. and Fedorka-Cray J., 2002: Antimicrobial Use and resistance in Animals. *Clin. Infect. Dis.*; 34 (Suppl 3): S93-106.conventional antibiotics. *J. Assoc. Physicians India* 51, 593-596.

Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V.,1999: Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607- 625.

MeierA., Kirschner P., Burkhardt S., Steingrube V. A., Brown B.A., Wallace Jr. R.J., Bottger E.C., 1994: Identification of mutation in 23S rRNA gene of clarithromycinresistant *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 381-384.

Mellon, M., Benbrook, C., Benbrook, K.L., 2001: Hogging it : estimates of antimicrobial abuse in livestock. Cambridge: UCS Publications.

Meunier D., Acar J.F., Martel J.L.,2004: Seven years survey of susceptibility to marbofloxacin of bovine pathogenic strains from eight European countries. *Int.. J. of Antimicrob. Agents.* 24, 268-278.

Modigan M.T., Martinko J.M, Parket J., 2003: Brock Biology of Microorganisms. Pearson Education Inc, N.J. 07458, U.S.A

Molbak K., 2006: Clinical importance of Animal Related Resistance. In: Antimicrobial Resist., ance in bacteria of animal origin by F.M.Aarestrup, ASM Press, Washington D.C.

Moreno M.A., Dominguez I., Teshager T., 2000: Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 285-290.

National Research Council, 1999: The use of drugs in food animals,1st edition, National Academy Press, CABI Publishing, Wallingford. Nightingale, C.H., Murakawa T., & Ambrose, P.G., Eds. 2001: Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA.

Nonaka L., Suzuki S., 2002: New Mg<sup>2+</sup> dependent oxytetracycline resistance determinant Tet34 in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1550-1552.

Nucifora, G.,Chu, L.,Misra, T.K., and Silver, S.,1989: Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid Pi 258 cad A gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:3544-3548

Passantino A. 2007: Ethical aspects for veterinarians regarding antimicrobial drug use in Italy. *Int. J. of Antimicrob. Agents* 29, 240-244.

Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A., 1996: Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60, 575-608.

Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R., and Waddel J., 2004: Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health critical review of published data. *Antimicrob. Agents Chemother* 53, 28-52.

Piddock L.J., 2006: Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 19(2):382-402.

Poole K., 2000: Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2233-2241.

Poole K., 2000: Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-positive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2595-2599

Poole K., 2002: Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* 3(2):77-98.

Prammanaman T., Sander P., Brown A., Frischkorn K., Onyi G.O., Zhang E., Bottger C., Wallace R.J. Jr., 1998: A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J. Infect. Dis.* 177, 1573-1581.

Prescott J., Baggot J.D., Walker R.D., 2000: Antimicrobial Therapy in Veterinary

Medicine. Iowa State University Press, Iowa U.S.A..

Putman M., van Veen H.W., Konings W.N.,2000: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Boil. Rev.* 64, 672-693.

Quintiliani R.Jr., Sahm D.F., Courvalin P., 1999 : Mechanisms of resistance to antimicrobial agents in : Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H., (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., ASM Press, Washington D.C., pp.1505-1525.

Rasmussen J.L., Odelson D.A., Macrina F.I., 1986: Complete nucleotide sequence and transcription of ermF, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacteroides fragilis*. *J.Bacteriol.* 168, 523-533.

Recchia, G.D., Hall, R.M., 1995: Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 141, 3015-3027.

Roberts M.C., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L.B., Rood J., Seppala H.,1999: Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2823-2830.

Roberts, M.C., 1996: Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution, *FEMS Microbiol. Rev* 19 1-24.

Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby GA., Macielag M., Abbanat D., Park CH., Bush K., Hooper DC., 2006: Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat med* 12(1):83-88.

Rosenberg E., Ma D., Nikaido H.,2000: AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux



pump. *J. Bacteriol.* 182, 1754-1756.

Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ.,1998: 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a Gram-positive bacterium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1702-1705.

Rouch D.A., Masserotti L.J., Loo L.S.L., Jackson C.A., Skurray R.A.,1989: Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol. Microbiol.* 3, 161-175.

Ruiz J., 2003: Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1109-1117.

Salyers A.A., Whitt D.D., 1994: Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington D.C., USA.

Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M., Li L.-Y., 1995: Conjugative transposons : an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol.Rev.* 59, 579- 590.

Sandvang D., Aarestrup F.M.,2000: Characterization of aminoglycoside resistance genes and class 1 intergrons in porcine and bovine gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* 6, 19-27.

Schelz Z., Molnar J., Hohmann J., 2006: Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77, 279-285.

Schroeder C.M., Zhao C., DebRoy C., Torcolini J., Zhao S., White D., Wagner D., McDermott P., Walker R., Meng J., 2002: Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Appl. and Envir. Microbiol.* 68, 576-581.

Schwarz S., Cloeckert A., Roberts M.C., 2006: Mechanisms and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents pp 73-91. In:Antimicrobial Resistance in bacteria of animal origin by F.M.Aarestrup. ASM Press, Washington, D.C.

Schwarz S., and Noble, W.C., 1999: Aspects of bacterial resistance to antimicrobial agents used in veterinary dermatological practice. *Vet.Dermatol.* 10, 163-176.

Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E., 2001: Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet.Res.* 32, 201-225.

Scwarz S., Kehrenberg C., Walsh T.R.,2001: Uses of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Inter. J. of Antimicrob. Agents.* 17, 431-437.

Segura P., Francois M., Gagnon C., Sauve S.,2009: Review of the Occurrence of Antiinfectives in Contaminated Wastewaters and Natural and Drinking Waters. *Envir. Health Persp.* 117, 675-684.

Shaw K.J., Rather P.N., Hare S.R., Miller G.H., 1993:Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycosidemodifying enzymes. *Microbiol.Rev.* 57, 138-163.

Shriram V., Jahagirdar S., Latha C., Kumar V., Puranik V., Rojatkar S., Dhakephalkar K., Shitole M.G.,2008: A potential plasmid-curing agent, 8-epidiosbulbin E acetate, from *Dioscorea bulbifera* L. against multidrug-resistant bacteria. *Inter. J. of Antimicrob. Agents* 32, 405-410.

Smith K.E., Besser J.M., Hedberg C.W., Leano F.T., Bender J.H., Wicklund J.H., Johnson B.P., Moore K.A., Osterholm M.T.,1999: Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections

in Minnesota. *N.Engl. J. Med.* 340, 1525-1532.

Song, J.S., Jeon J.H., Lee J.H., Jeong J.H., Jeong B.C., Kim S.J., Lee J.H., Lee S.H., 2005: Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount south of Lihir Island, Papua New Guinea). *J.Microbiol* 43(2):172-178.

Speer BS., Shoemaker NB., Salyers A.A., 1992: Bacterial resistance to tetracyclines: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 387-399.

Spica J.S., Waterman H., Hoo G.H., St Louis M.E., Pacer R.E., James S.M., Bisset M.L.,

Mayer L.W., Chiu J.Y., Hall B., et al.,1987: Chloramphenicol-resistant Salmonella Newport traced through hamburger to dairy farms. A major persisting source of human salmonellosis in California. *N.Engl. J. Med.* 316, 565-570.

Stanisich, V.A., 1988: Identification and analysis of plasmids at the genetic level, in: Gristed J., Bennett P.M.(Eds), *Plasmid Technology*, Academic Press, London, pp.11-48.

Stokes, D., Kelly. A.F., Gould, S.W.J., Cassar, C.A., & Fielder M.D., 2008: The withdrawal of antimicrobial treatment as a mechanism for defeating resistant microorganisms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53, 300-305.

Talsma E, Goettsch WG, Nieste HL, .Schrijnemakers P. M., Sprenger M. J. W., 1999: Resistance in *Campylobacter* species: increased resistance to fluoroquinolones and seasonal variation. *Clin Infect Dis*, 29:845–848.

Taylor DE., Chau A., 1996: Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1-5.

- Tenover, F.C. 2001: Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clin Infect Dis* 33, Suppl.3, S108-15.
- Teuber, M., 2001: Veterinary use and antibiotic Resistance. *Cur. Op. in Microbiol*, 4: 493-499
- Theuretzbacher U., 1998:  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Chemother. J.* 7, 136- 142.
- Thielman N.M., Guerrant R.L.,1999: Escherichia coli, pp 188-200. In: Antimicrobial therapy and vaccines by Yu, Merigan, Barriere (eds). The Williams & Willkins Company,Baltimore, Md.
- Thomas, J.K., Forest, A., Bhavnani, S.M., Hyatt J.M., Cheng A., Ballow C.H., Schentag J.J., 1998: Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patient during therapy.. *J. Antimicrob. Chemother* 42:521-527.
- Threlfall E.J., 2000:Epidemic Salmonella typhimurium DT 104-a truly international multiresistance clone. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 7-10.
- Threlfall E.J., Fischer IST., Berghold C., Gerner-Smidt P., Tschepe H., Cormican M., Luzzi I., Schnieder F., Wannet W., Machado J., Edwards G., 2003:Trends in antimicrobial resistance in Salmonella enterica serotypes Typhi and Paratyphi A isolated in Europe, 1999-2001. *Inter. J. of Antimicrob. Agents.* 22, 487-491.
- Threlfall E.J., Ward L.R., Rowe B., 1997: Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic Salmonella typhimurium DT 104 in England and Wales. *Eurosurv.* 2, 81-84.
- Threlfall E.J., Ward L.R., Rowe B., 1998: Multiresistant Salmonella Typhimurium DT 104 and

salmonella bacteraemia. *Lancet* 352, 287-288.

Thuille N., Fille M., Nagl M., 2003: Bactericidal activity of herbal extracts. *Int J. Hyg. Environ Health*. 206, 217-221.

Tiemersma E.W., Bronzwaer S.L., Lyytikainen O., Degener J.E., Schrijnemakers P., Bruinsma N., Monen J., Witte W., Grundman H., 2004: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1627-1634.

Toleman M.A., Bennett P.M., Walsh T.R., 2006: Common regions e.g. orf 513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J. Antimicrob Chemother.* 58(1) :1 6.

Tollefson L., Morris D., Boland C., Kay J., 2006: Licensing and Approval for use in Animals. In: *Antimicrobial Resistance in bacteria of animal origin* by F.M.Aarestrup, ASM Press, Washington D.C.

Tollefson L. and Flynn WT, 2002: Impact of antimicrobial resistance on regulatory policies in veterinary medicine: Status AAPS Pharmaceutics and Drug Delivery Conference, *Aaaps Pharmsci* 4(37).

Top, E., Mergay, M., Springael, D., and Vestræete, W., 1990: Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from *E.coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples. *Appl. Environ. Microbiology* 56:2471-2479

Travers K., Barza M., 2002: Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 34, S131-134.

Turnidge J., 2004: Antibiotic use in animals- prejudices, perceptions and realities. *J. Antimicrob Chemother* 53, 26-27.

Ungemach F.R, 2000: Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation. *Acta Vet.Scand.*93(Suppl.), 89-103

Ungemach, F.R., Muller-Bahrtdt D., Abraham G., 2006: Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int. J. of Med. Microb.* 296 S2, 33-38

Ungemach, F.R., 1999: Use of antibiotics in veterinary medicine-consequences and prudent use. *Tierarzu Prax* 27:335-40

Van Miert A.S.J.P.A.M., 1990b: Veterinary drugs and Good Veterinary Practice. *Tijdschr Diergeneeskd* 112, 125-131.

Van't Klooster G.A.E., Blaauboer B.J., Noordhoek J., Van Miert A.S.J.P.A.M., 1993: Sulphamidine metabolism in vitro II: comparative studies in cultured rat, goat, sheep and cattle hepatocytes. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*16, 454-461.

Vellinga A., Van Loock F., 2002: The dioxin crisis as experiment to determine poultryrelated *Cambylobacter enteritis* *Emer. Infect. Dis.* 8, 19-22.

Vidaver A.K., 2002: Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clin. Infect. Dis.* 34, S107-110.

Weisblum B., 1995: Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577-585.

White D., 2006: Antimicrobial Resistance in Pathogenic *Escherichia coli* from Animals. In:Antimicrobial Resistance in bacteria of animal origin by F.M.Aarestrup, ASM Press,

Washington D.C.

White D.G., Piddock LJV., Maurer J.J., 2000: Characterization of flouoroquinolone resistance among veterinary isolates of avian Escherichia coli. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 44, 2897-2899.

White,D.G., Zhao S., Simjee S., Wagner D.D., McDerott P.F.,2002:Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microb Infect*, 4:404-412.

Williamson, R., le Bougouenec, C., Gutmann,L., Horaud, T., 1985 : One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of Enterococcus faecium to benzylpenicillin. *J Gen Microbiol* 131(8):1933-1940.

Wray C., Gnanou J-C., 2000: Antibiotic resistance monitoring in bacteria of animal origin: analysis of national monitoring programmes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 291-294.

Wright G.D., 1999: Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr.Opin.Microbiol.* 2, 499-503.

Wright G.D.,2005: Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(10): 1451-1470.

Zhao T., White D.G., Ge B., Ayers S., Friedman S., English L., Wagner D., Gaines S., Meng J., 2001: Identification and characterization of intergron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates. *Appl and Environ Microbiol.* 61, 1290-1293.

Zinn C.S., Westh H., Rosdahl V.T.,2004: An international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital Staphylococcus aureus isolates from 21 laboratories in 14 countries or states. *Microb Drug Resist.-Mech. Epid and Dis.* 10, 160-168.

### **Ελληνόγλωση:**

Κρήτας Σ.Κ., 2004: Σημειώσεις Παθολογίας Χοίρου. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Καρδίτσα.

Μεθενίτου Γ., 2004: Ανθεκτικότητα μικροβίων έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων στον άνθρωπο από τη διατροφική αλυσίδα. 3ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Υγιεινής & Τεχνολογίας Τροφίμων.

Μπατζιάς Γ., 2005: Κτηνιατρική Φαρμακολογία (V), Αντιμικροβιακά-Αντιμυκητιακά. Τμήμα Εκδόσεων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.

Σπαής Α.Β., Φλώρου-Πανέρη Π., Χρηστάκη Ε., 2001: Οι βάσεις της διατροφής θηλαστικών και πτηνών. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Στέρης Ι.Β., Ιωσηφίδου Γ.Ε., 2004: Αντιβιοαντοχή και ασφάλεια των τροφίμων. 3ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Υγιεινής & Τεχνολογίας Τροφίμων.

### **Ηλεκτρονικές πηγές:**

[www.danmap.org](http://www.danmap.org)

<http://195.45.99.82:800/pdf/itavarm.pdf>

<http://www.maf.gov.uk>

[http://www.fda.gov/cvm/index/narms\\_pg.htm](http://www.fda.gov/cvm/index/narms_pg.htm)

<http://www.fedesa.be/eng/PublicSite/xtra/dossiers/doss9>

<http://faculty.washington.edu/marilynr/>

<http://jac.oxfordjournals.org>

<http://jac.oxfordjournals.org/content/47/6/763.short>  
<http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/ja/vaa/2007/317-322.pdf>

<http://jac.oxfordjournals.org/content/52/3/489.short>

<http://www.jarvm.com/articles/Vol3Iss2/SANMARTIN.pdf>

[http://www.iatp.org/files/64\\_2\\_72936.pdf](http://www.iatp.org/files/64_2_72936.pdf)



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

[169]









# ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗ ΤΩΝ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΩΝ

A/A	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΖΩΟ		ΑΝΘΡΩΠΟΣ	
1	Πιερία(Κατερίνη)	Χοίρος(Κάπρος)	4 μηνών	Ανδρας	60-65 ετών
2	Πιερία( Κατερίνη)	Χοίρος	1 ετών	Ανδρας	60-65 ετών
3	Πιερία(Κατερίνη)	Χοίρος(χοιρομητέρα)	2 ετών	Ανδρας	50 ετών
4	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	1 μηνών	Γυναίκα	40-50 ετών
5	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	1 μηνών	Ανδρας	55-65 ετών
6	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	20 ημερών	Ανδρας	35-40 ετών
7	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	1-2 μηνων	Ανδρας	60-65 ετών
8	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	1,5 μηνών	Ανδρας	55-62 ετών
9	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	20 ημερών	Ανδρας	61 ετών
10	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	1 μηνών	Ανδρας	55-59 ετών
11	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	20 ημερών	Ανδρας	50-60 ετών
12	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	1 μηνών	Ανδρας	35-40 ετών
13	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	20 ημερών	Ανδρας	55 ετών
14	Θεσσαλονίκη	Πτηνό	1μηνών	Ανδρας	65-70 ετών
15	Φθιώτιδα (Μακρακώμη)	Πτηνό	20 ημερών	Ανδρας	37 ετών
16	Φθιώτιδα (Μακρακώμη)	Πτηνό(νεοσσός)	20 ημερών	Ανδρας	33 ετών

Α/Α	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΖΩΟ		ΑΝΘΡΩΠΟΣ	
				Ανδρας	Ετών
17	Φθιώτιδα (Μακρακώμη)	Χοίρος(χοιρομητέρα)	1,5 ετών	Ανδρας	23 ετών
18	Φθιώτιδα(Δομοκός)	Χοίρος(κάπρος)	1,5 ετών	Ανδρας	65 ετών
19	Φθιώτιδα(Αρχάνι)	Χοίρος(χοιρομητέρα)	2 ετών	Ανδρας	45 ετών
20	Φθιώτιδα(Μακρακώμη)	Χοίρος	2,5 ετών	Ανδρας	30-40 ετών
21	Φθιώτιδα	Χοίρος	3 ετών	Ανδρας	38 ετών
22	Φθιώτιδα(Γοργοπόταμος)	Χοιρομητέρα	2 ετών	Ανδρας	28 ετών
23	Φωκίδα(Άμφισσα)	Χοιρίδιο	4 μηνών	Ανδρας	32 ετών
24	Λάρισα	Χοίρος	2 ετών	Ανδρας	32 ετών
25	Φθιώτιδα- (Λειανοκλάδι)	Χοίρος	2 ετών	Ανδρας	25-30 ετών
26	Φθιώτιδα(Λαμία)	Χοιρίδιο	4 μηνών	Ανδρας	40-50 ετών
27	Καρδίτσα	Χοιρος(Χοιρομητέρα)	2,5 ετών	Ανδρας	40-45 ετών
28	Καρδίτσα	Χοίρος(Χοιρομητέρα)	3 ετών	Ανδρας	40-45 ετών
29	Καρδίτσα	Χοιρος(Χοιρομητέρα)	2 ετών	Ανδρας	40-45 ετών
Α/Α	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΖΩΟ		ΑΝΘΡΩΠΟΣ	
30	Φθιώτιδα( Σπερχειάδα)	Χοιρίδιο	5 μηνών	Ανδρας	30-37 ετών
31	Φθιώτιδα( Πτελέα)	Χοιρίδιο	5 μηνών	Ανδρας	40-45 ετών



32	Φθίωτιδα( Τιθορέα)	Πτηνό	1,5 μηνών	Ανδρας	35-45 ετών
33	Φθίωτιδα( Λαμία)	Πτηνό	1 μηνών	Ανδρας	37 ετών
34	Φθίωτιδα(Τσούκκα)	Πτηνό	20 ημερών	Ανδρας	30-37 ετών
35	Φθίωτιδα(Αμφίκλεια)	Χοίρος	4 μηνών	Ανδρας	40-45 ετών
36	Φθίωτιδα(Σπερχειάδα)	Πτηνό (Χήνα)	2 μηνών	Ανδρας	35-45 ετών
37	Φωκίδα(Μπράλλος)	Πτηνό	1 μηνών	Ανδρας	35-45 ετών

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ

A/A	Z Ω Ο	ΕΡΓΑ ΤΗΣ ΜΟΝ ΑΔΑ Σ	ΗΛ ΙΚΙ Α ΕΓ ΑΤ Η	ΑΜΠΙ ΚΙΛΛΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΑΜΠΙ ΚΙΛΛΙ ΝΗ ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ	ΧΛΩΡΑΜ ΦΑΙΝΙΚΟ ΛΗ ΖΩΟΥ	ΧΛΩΡΑΜ ΦΑΙΝΙΚΟ ΛΗ ΑΝΘΡΩΠ ΟΥ	ΓΕΝΤΑ ΜΥΚΙΝ Η ΖΩΟΥ	ΓΕΝΤΑ ΜΥΚΙΝ Η ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ	ΣΟΥΛΦΟ ΜΕΘΟΞΟ ΛΗ ΖΩΟΥ	ΣΟΥΛΦΟ ΜΕΘΟΞΟ ΛΗ ΑΝΘΡΩΠ ΟΥ	ΤΕΤΡΑ ΚΥΚΛΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΤΕΤΡΑ ΚΥΚΛΙ ΝΗ ΑΝΘΡΩ ΠΟΥ	ΝΕΟ ΜΥΚΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΝΕΟ ΜΥΚΙ ΝΗ ΑΝΘΡ ΩΠΟ Υ	ΝΑΛΙ ΔΙΕΙΚ Ο ΟΞΥ ΖΩΟ Υ	ΝΑΛΙ ΔΙΕΙΚ Ο ΟΞΥ ΑΝΘΡ ΩΠΟ Υ
1	Π Τ Η Ν Ο	ΓΥΝ ΑΙΚ Α	40- 50 ΕΤ Ω Ν	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2
2	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	55- 65 ΕΤ Ω Ν	2	1	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1
3	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1
4	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	60- 65 ΕΤ Ω Ν	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1

5	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	55- 62 ΕΤ Ω Ν	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	
6	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	61 ΕΤ Ω Ν	1	1	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	
7	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	55- 59 ΕΤ Ω Ν	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
8	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	50- 60 ΕΤ Ω Ν	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
9	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1
10	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	55 ΕΤ Ω Ν	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2

11	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	56- 70 ΕΤ Ω Ν	2	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1
12	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	37 ΕΤ Ω Ν	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
13	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	33 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2
14	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
15	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	37 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
16	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	30- 37 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2

17	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
18	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1				

ΟΠΟΥ: 1= ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΚΑΙ 2=ΕΥΑΙΣΘΗΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ**

A/A	Z Ω Ο	ΕΡΓ ΑΤΗ Σ ΜΟΝ ΑΔΑ Σ	ΗΛ ΙΚΙ Α ΕΓ ΑΤ Η	ΑΜΠΙ ΚΙΛΛΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΑΜΠΙ ΚΙΛΛΙ ΝΗ ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ	ΧΛΩΡΑΜ ΦΑΙΝΙΚΟ ΛΗ ΖΩΟΥ	ΧΛΩΡΑΜ ΦΑΙΝΙΚΟ ΛΗ ΑΝΘΡΩΠ ΟΥ	ΓΕΝΤΑ ΜΥΚΙΝ Η ΖΩΟΥ	ΓΕΝΤΑ ΜΥΚΙΝ Η ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ	ΣΟΥΛΦΟ ΜΕΘΟΞΟ ΛΗ ΖΩΟΥ	ΣΟΥΛΦΟ ΜΕΘΟΞΟ ΛΗ ΑΝΘΡΩΠ ΟΥ	ΤΕΤΡΑ ΚΥΚΛΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΤΕΤΡΑ ΚΥΚΛΙ ΝΗ ΑΝΘΡΩ ΠΟΥ	ΝΕΟ ΜΥΚΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΝΕΟ ΜΥΚΙ ΝΗ ΑΝΘΡ ΩΠΟ Υ	ΝΑΛΙ ΔΙΕΙΚ Ο ΟΞΥ ΖΩΟ Υ	ΝΑΛΙ ΔΙΕΙΚ Ο ΟΞΥ ΑΝΘΡ ΩΠΟ Υ
1	Χ Ο Ι Ρ Ο Σ	ΑΝ ΔΡΑ Σ	60- 65 ΕΤ ΩΝ	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1
2	Χ Ο Ι Ρ Ο Σ	ΑΝ ΔΡΑ Σ	60- 65 ΕΤ ΩΝ	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
3	Χ Ο Ι Ρ Ο Σ	ΑΝ ΔΡΑ Σ	50 ΕΤ ΩΝ	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1
4	Χ Ο Ι Ρ Ο Σ	ΑΝ ΔΡΑ Σ	23 ΕΤ ΩΝ	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

5	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	65 ET Ω N	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2
6	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	45 ET Ω N	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2
7	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	30- 40 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
8	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	38 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	28 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2
10	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	32 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2

11	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	32 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
12	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	25- 30 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
13	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	40- 50 ET Ω N	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2
14	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	40- 45 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
15	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	40- 45 ET Ω N	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
16	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	40- 45 ET Ω N	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2



17	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	30- 37 ET Ω N	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
18	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	40- 45 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
19	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	40- 45 ET Ω N	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ BREAK POINTS ΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

ΠΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ

A/A	Z Ω Ο	ΕΡΓΑ ΤΗΣ ΜΟΝ ΑΔΑ Σ	ΗΛ ΙΚΙ Α ΕΓ ΑΤ Η	ΑΜΠΙ ΚΙΛΛΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΑΜΠΙ ΚΙΛΛΙ ΝΗ ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ	ΧΛΩΡΑΜ ΦΑΙΝΙΚΟ ΛΗ ΖΩΟΥ	ΧΛΩΡΑΜ ΦΑΙΝΙΚΟ ΛΗ ΑΝΘΡΩΠ ΟΥ	ΓΕΝΤΑ ΜΥΚΙΝ Η ΖΩΟΥ	ΓΕΝΤΑ ΜΥΚΙΝ Η ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ	ΣΟΥΛΦΟ ΜΕΘΟΞΟ ΛΗ ΖΩΟΥ	ΣΟΥΛΦΟ ΜΕΘΟΞΟ ΛΗ ΑΝΘΡΩΠ ΟΥ	ΤΕΤΡΑ ΚΥΚΛΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΤΕΤΡΑ ΚΥΚΛΙ ΝΗ ΑΝΘΡΩ ΠΟΥ	ΝΕΟ ΜΥΚΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΝΕΟ ΜΥΚΙ ΝΗ ΑΝΘΡ ΩΠΟ Υ	ΝΑΛΙ ΔΙΕΙΚ Ο ΟΞΥ ΖΩΟ Υ	ΝΑΛΙ ΔΙΕΙΚ Ο ΟΞΥ ΑΝΘΡ ΩΠΟ Υ
1	Π Τ Η Ν Ο	ΓΥΝ ΑΙΚ Α	40- 50 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 32  μg/ml )	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32  μg/ml )	1(B.P. 64  μg/ml)	1(B.P. .32  μg/ml)	2	1(B. P.32  μg/m l)	2
2	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	55- 65 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 64  μg/ml )	2	1(B.P.32  μg/ml)	2	2	2	2	1(B.P. 64  μg/ml)	1(B.P. 128  μg/ml)	1(B.P. .32  μg/ml)	2	1(B. P.32  μg/m l)	1(B. P.64  μg/m l)
3	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	1(B.P.51 2  μg/ml)	1(B.P.51 2  μg/ml)	2	2	2	2	1(B. P.32  μg/m l)	1(B. P.32  μg/m l)
4	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	60- 65 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 64  μg/ml )	2	2	2	1(B.P. 64  μg/ml)	2	2	1(B.P. 32  μg/ml)	1(B.P. 128  μg/ml)	1(B.P. .64  μg/ml)	1(B.P. .64  μg/ml)	1(B. P.32  μg/m l)	1(B. P.64  μg/m l)

5	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	55- 62 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P. 128 μg/ml)	1(B.P. .64 μg/ml)	1(B.P. .32 μg/ml)	1(B. P.32 μg/m l)	1(B. P.25 6 μg/m l)
6	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	61 ΕΤ Ω Ν	1(B.P. 32 μg/ml)	1(B.P. 32 μg/ml)	2	1(B.P.32 μg/ml)	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml)	1(B.P. 128 μg/ml)	2	2	2	2	
7	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	55- 59 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P. 128 μg/ml)	2	2	11(B. P.32 μg/m l)	1(B. P.12 8 μg/m l)	
8	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	50- 60 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P.32 μg/ml)	1(B.P.32 μg/ml)	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml)	1(B.P. 64 μg/ml)	2	2	1(B. P.32 μg/m l)	1(B. P. μg/m l)	
9	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	2	1(B. P.32 μg/m l)	1(B. P.32 μg/m l)	

10	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	55 ΕΤ Ω Ν	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P. 64 μg/ml)	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P. 128 μg/ml)	2	2	2	2
11	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	56- 70 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 128 μg/ml)	2	1(B.P.64 μg/ml)	2	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P.51 2 μg/ml)	1(B.P.10 24 μg/ml)	1(B.P. 32 μg/ml)	2	1(B.P. .64 μg/ml)	1(B.P. .32 μg/ml)	1(B. P.64 μg/m l)	1(B. P.12 8 μg/m l)
12	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	37 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	2	1(B. P.32 μg/m l)	2
13	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	33 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml)	2	1(B.P. .32 μg/ml)	2	2	2
14	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	1(B.P. 32 μg/ml)	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	1(B. P.32 μg/m l)	2

15	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	37 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P.51 2 μg/ml)	1(B.P.51 2 μg/ml)	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P. 64 μg/ml)	2	2	2	2
16	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	30- 37 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2			1(B.P. 32 μg/ml)	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	2	2
17	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	1(B.P. 32 μg/ml)	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1(B. P.32 μg/m l)	1(B. P.64 μg/m l)
18	Π Τ Η Ν Ο	ΑΝΔ ΡΑΣ	35- 45 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2			1(B.P. 32 μg/ml)	1(B.P. 64 μg/ml)	2	2	2	2

### ΧΟΙΡΟΤΡΟΦΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ

A/A	Z Ω Ι Π Ο Σ	ΕΡΓ ΑΤΗ Σ ΜΟΝ ΑΔΑ Σ	ΗΛ ΙΚΙ Α ΕΓ ΑΤ Η	ΑΜΠΙ ΚΙΛΛΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΑΜΠΙ ΚΙΛΛΙ ΝΗ ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ	ΧΛΩΡΑΜ ΦΑΙΝΙΚΟ ΛΗ ΖΩΟΥ	ΧΛΩΡΑΜ ΦΑΙΝΙΚΟ ΛΗ ΑΝΘΡΩΠ ΟΥ	ΓΕΝΤΑ ΜΥΚΙΝ Η ΖΩΟΥ	ΓΕΝΤΑ ΜΥΚΙΝ Η ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ	ΣΟΥΛΦΟ ΜΕΘΟΞΟ ΛΗ ΖΩΟΥ	ΣΟΥΛΦΟ ΜΕΘΟΞΟ ΛΗ ΑΝΘΡΩΠ ΟΥ	ΤΕΤΡΑ ΚΥΚΛΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΤΕΤΡΑ ΚΥΚΛΙ ΝΗ ΑΝΘΡΩ ΠΟΥ	ΝΕΟ ΜΥΚΙ ΝΗ ΖΩΟΥ	ΝΕΟ ΜΥΚΙ ΝΗ ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ	ΝΑΛΙ ΔΙΕΙΚ Ο ΟΞΥ ΖΩΟ Υ	ΝΑΛΙ ΔΙΕΙΚ Ο ΟΞΥ ΑΝΘΡ ΩΠΟΥ
1	Χ Ο Ι Π Ο Σ	ΑΝ ΔΡΑ Σ	60- 65 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 64 μg/ml)	2	1(B.P.32 μg/ml)	2	2	1(B.P.51 2 μg/ml)	1(B.P.10 24 μg/ml)	1(B.P. 32 μg/ml)	1(B.P. 64 μg/ml)	2	2	2	1(B. P.32 μg/m l)
2	Χ Ο Ι Π Ο Σ	ΑΝ ΔΡΑ Σ	60- 65 ΕΤ Ω Ν	2	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P.32 μg/ml)	1(B.P.64 μg/ml)	2	2	2	2	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P. 128 μg/ml)	2	2	1(B. P.64 μg/m l)	1(B. P.25 6 μg/m l)
3	Χ Ο Ι Π Ο Σ	ΑΝ ΔΡΑ Σ	50 ΕΤ Ω Ν	1(B.P. 64 μg/ml)	1(B.P. 32 μg/ml)	2	2	2	2	1(B.P.51 2 μg/ml)	1(B.P.51 2 μg/ml)	1(B.P. 128 μg/ml)	1(B.P. 128 μg/ml)	2	2	1(B. P.32 μg/m l)	1(B. P.64 μg/m l)
4	Χ Ο Ι Π Ο Σ	ΑΝ ΔΡΑ Σ	23 ΕΤ Ω Ν	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

5	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	65 ET Ω N	2	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2	2	1(B.P.51 2 μg/ml)	1(B.P.10 24 μg/ml)	1(B.P. 64 μg/ml	1(B.P. 128 μg/ml)	1(B.P. .32 μg/ml	1(B.P. .32 μg/ml	2	2
6	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	45 ET Ω N	1(B.P. 128 μg/ml	1(B.P. 64 μg/ml	2	2	2	2	1(B.P.51 2 μg/ml)	2	1(B.P. 32 μg/ml	1(B.P. 64 μg/ml	2	2	1(B. P.32 μg/ml	2	
7	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	30- 40 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
8	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	38 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
9	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	28 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 64 μg/ml	1(B.P. 32 μg/ml	1(B.P. .32 μg/ml	2	2	2	
10	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	32 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2	

11	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	32 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 64 μg/ml	1(B.P. 64 μg/ml	2	2	2	2
12	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	25- 30 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2
13	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	40- 50 ET Ω N	1(B.P. 64 μg/ml	1(B.P. 64 μg/ml	2	2	2	2	1(B.P.51 2 μg/ml)	2	1(B.P. 32 μg/ml	1(B.P. 64 μg/ml	2	2	1(B. P.32 μg/m l	2
14	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	40- 45 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 64 μg/ml	1(B.P. 128 μg/ml	2	2	2	2
15	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	40- 45 ET Ω N	2	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2
16	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ Ω N	40- 45 ET Ω N	1(B.P. 64 μg/ml	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2	1(B.P.51 2 μg/ml)	2	1(B.P. 64 μg/ml	1(B.P. 64 μg/ml	2	2	2	2



17	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	30- 37 ET Ω N	1(B.P. 32 μg/ml	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2	2
18	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	40- 45 ET Ω N	2	2	2	2	2	2	2	2	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2	2
19	X O I P O Σ	AN ΔPA Σ	40- 45 ET Ω N	1(B.P. 32 μg/ml	1(B.P. 32 μg/ml	2	2	2	2	1(B.P.51 2 μg/ml)	2	1(B.P. 32 μg/ml	1(B.P. 64 μg/ml	2	2	2	2