

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:**

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ &  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ  
ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ  
ΥΓΕΙΑ**



**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ANTIBIOANTOXΗΣ  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ΚΑΙ STREPTOCOCCUS SPP ΑΠΟ  
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΒΕΙΟ ΚΑΙ ΑΙΓΕΙΟ ΓΑΛΑ**

**Σακοράφα Β. Χριστίνα  
Κτηνίατρος**

**Λάρισα, 2012**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

1. Γκόβαρης Αλ., Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Κτηνιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
2. Πουρνάρας Σ., Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Σολωμάκος Ν., Λέκτορας Τμήματος Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vii
ΣΚΟΠΟΣ	ix
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	2
1.1 Ταξινόμηση των Σταφυλόκοκκων	2
1.2 Γενικά για τον <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.3 Μορφολογία – Χαρακτηριστικά του <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.4 Παθογένεια του <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.5 Ανθεκτικότητα του <i>Staphylococcus aureus</i> στα αντιβιοτικά	14
1.6 Ανθεκτικός στη μεθικιλίνη <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	15
1.7 Ανθεκτικός στη βανκομυκίνη <i>Staphylococcus aureus</i> (VRSA)	18
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> ΚΑΙ <i>STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE</i>	 20
2.1 Γενικά για τους στρεπτόκοκκους	20
2.2 Μορφολογία – Χαρακτηριστικά των στρεπτόκοκκων	20
2.3 Μορφολογία – Χαρακτηριστικά του <i>Streptococcus agalactiae</i>	25
2.4 Παθογένεια του <i>Streptococcus agalactiae</i>	26
2.5 Μορφολογία – Χαρακτηριστικά του <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	27
2.6 Παθογένεια των στρεπτόκοκκων	28
2.7 Ανθεκτικότητα-Ευαισθησία των στρεπτόκοκκων στα αντιβιοτικά	30
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	 32
3.1 Ιστορική αναδρομή	32
3.2 Γενικά για τα αντιβιοτικά	34
3.3 Κατηγορίες αντιβιοτικών	37
3.3.1 Μικροβιοστατικά και μικροβιοκτόνα φάρμακα	37
3.3.2 Αντιμικροβιακό φάσμα	38
3.3.3 Κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων	38
3.4 Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών	43
3.5 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά	45

3.5.1 Γενικά	45
3.5.2 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και τρόφιμα	52
3.5.3 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και αυξητικοί παράγοντες	55
3.5.4 Επιπτώσεις της αντιβιοαντοχής στη Δημόσια Υγεία	57
3.5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση ανθεκτικότητας	59
3.5.6 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά	61
3.5.6 α) Μηχανισμοί άμυνας των μικροοργανισμών	61
3.5.6 β) Βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας	65
3.5.6 γ) Πηγές γονιδίων αντοχής	68
3.5.7 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας του <i>Staphylococcus aureus</i> στα αντιβιοτικά	69
3.5.7 α) β-λακταμάσες (μηχανισμός ενζυμικής αδρανοποίησης του αντιβιοτικού)	69
3.5.7 β) Τροποποιημένη PBP-σύνθεση PBP2a (μηχανισμός μεταβολής του μορίου-στόχου), Ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη (Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> , MRSA)	70
3.5.7 γ) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στα μακρολίδια	71
3.5.7 δ) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στα γλυκοπεπτίδια	72
3.5.7 ε) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στις λινκοσαμίδες	73
3.5.7 στ) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στις τετρακυκλίνες	73
3.5.7 ζ) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στη λινεζολίδα (οξαζολιδινόνες)	73
3.5.8 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των <i>Streptococcus</i> spp. στα αντιβιοτικά	74
3.5.9 Ανθεκτικά στελέχη	75
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ</b>	 81
4.1 Γενικά για τη βιολογική παραγωγή	81
4.1.1 Η βιολογική παραγωγή γάλακτος	84
4.1.2 Η βιολογική παραγωγή στην Ελλάδα	87
4.2 Νομοθεσία	89
4.2.1 Γενικά	89
4.2.2 Οδηγίες και Κανονισμοί των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής για τη βιολογική παραγωγή	92
4.2.3 Η βιολογική Νομοθεσία στην Ελβετία	95

4.2.4 Η βιολογική Νομοθεσία στη Δανία	96
4.2.5 Η βιολογική Νομοθεσία στη Νορβηγία	97
4.2.6 Η βιολογική Νομοθεσία στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στην Ελλάδα	97
4.3 Η μαστίτιδα στις βιολογικές εκτροφές	100
4.4 Βιολογικές εκτροφές και αντιβιοτικά	103
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (MIC)</b>	<b>108</b>
5.1 Γενικά για την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)	108
5.2 Όρια ευαισθησίας (breakpoints)	110
 <b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>114</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>115</b>
1.1 Δειγματοληψία	115
1.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση του <i>Staphylococcus aureus</i>	115
1.2.1 Προετοιμασία του δείγματος	116
1.2.2 Αραιώσεις	116
1.2.3 Ενοφθαλμισμός	116
1.2.4 Επώαση	117
1.2.5 Επιλογή τρυβλίων και επιβεβαίωση	117
1.2.5 α) Μορφολογία των αποικιών	118
1.2.5 β) Χρώση Gram	118
1.2.5 γ) Δοκιμή της καταλάσης	118
1.2.5 δ) Δοκιμή της κοαγκουλάσης (πηκτάσης)	119
1.2.5 ε) Βιοχημική ταυτοποίηση	119
1.2.6 Καταμέτρηση των αποικιών	120
1.2.7 Συντήρηση των στελεχών <i>S. aureus</i>	120
1.3. Απομόνωση και ταυτοποίηση των <i>Streptococcus agalactiae</i> και <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	120
1.3.1 Προετοιμασία του δείγματος	120
1.3.2 Αραιώσεις	121
1.3.3 Ενοφθαλμισμός	121
1.3.4 Επώαση	121
1.3.5 Επιλογή τρυβλίων και επιβεβαίωση	121

1.3.5 α) Μορφολογία αποικιών	122
1.3.5 β) Χρώση Gram	122
1.3.5 γ) Δοκιμή καταλάσης	122
1.3.5 δ) Ορολογική ταυτοποίηση	123
1.3.5 ε) Βιοχημική ταυτοποίηση	123
1.3.6 Καταμέτρηση των αποικιών	124
1.3.7 Συντήρηση των στελεχών <i>Streptococcus agalactiae</i> και <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	124
1.4 Προσδιορισμός της αντιβιοαντοχής	125
1.4.1 Μικρομέθοδος αραιώσεων σε ζωμό	125
1.4.1 α) Προετοιμασία των μητρικών διαλυμάτων των αντιμικροβιακών	126
i) Ζύγισμα των σκονών των αντιμικροβιακών φαρμάκων	126
ii) Προετοιμασία των μητρικών διαλυμάτων	126
1.4.1β) Αραίωση των αντιμικροβιακών φαρμάκων	127
1.4.1 γ) Προετοιμασία του ζωμού	129
1.4.1 δ) Προετοιμασία και αποθήκευση των μικροπλακών αραιώσης	129
1.4.1 ε) Διαδικασίες ενοφθαλμισμού	130
i) Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος	130
ii) Ενοφθαλμισμός του ζωμού	130
1.4.1 στ) Επώαση	131
1.4.2 Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων	131
1.5 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων – Στατιστική ανάλυση	131
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	 133
2.1 Παρουσία του <i>Staphylococcus aureus</i> σε συμβατικό και βιολογικό γάλα	133
2.2 Απομόνωση των <i>Streptococcus agalactiae</i> και <i>Streptococcus</i> <i>dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	136
2.3 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας του <i>Staphylococcus aureus</i> από συμβατικά και βιολογικά δείγματα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες	137
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	 141



## **ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ**

<b>Πίνακας 1 :</b> Αντιμικροβιακά φάρμακα	<b>125</b>
<b>Πίνακας 2 :</b> Σχήμα αραιώσεων των αντιμικροβιακών φαρμάκων	<b>127</b>
<b>Πίνακας 3:</b> Σχήμα για την προετοιμασία των αραιώσεων των αντιμικροβιακών φαρμάκων στις δοκιμές μικροαραιώσεων σε ζωμό	<b>128</b>
<b>Πίνακας 4:</b> Παρουσία του <i>S. aureus</i> σε συμβατικό και βιολογικό γάλα	<b>133</b>
<b>Πίνακας 5:</b> Αποτελέσματα για την ταυτοποίηση των στελεχών <i>S. aureus</i>	<b>134</b>
<b>Πίνακας 6:</b> Σύγκριση συμβατικών και βιολογικών δειγμάτων ως προς τον πληθυσμό του <i>S. aureus</i>	<b>136</b>
<b>Πίνακας 7:</b> Τιμές της MIC (μg/ml) για τους έντεκα αντιμικροβιακούς παράγοντες που ελέγχθηκαν	<b>139</b>
<b>Πίνακας 8:</b> Σύγκριση αντιβιοαντοχής στελεχών <i>S.aureus</i> από συμβατικό και από βιολογικό γάλα	<b>140</b>



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να αξιολογήσει τη σχέση μεταξύ του τρόπου διαχείρισης της εκμετάλλευσης (συμβατική ή βιολογική) και της παρουσίας *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* και *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* στο νωπό γάλα και του επιπέδου αντιβιοαντοχής τους σε γαλακτοπαραγωγές εκμεταλλεύσεις αιγοπροβάτων στη Θεσσαλία. Συλλέχθηκαν 25 δείγματα γάλακτος από συμβατικές εκτροφές αιγοπροβάτων και 25 δείγματα γάλακτος από βιολογικές εκτροφές αιγοπροβάτων. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* και *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. Απομονώθηκαν 10 στελέχη *S. aureus* από τα δείγματα συμβατικού γάλακτος και 7 στελέχη *S. aureus* από τα δείγματα βιολογικού γάλακτος. Στελέχη *Streptococcus agalactiae* δεν απομονώθηκαν από κανένα δείγμα, ενώ απομονώθηκαν δύο στελέχη *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, ένα από δείγμα συμβατικού γάλακτος και ένα από δείγμα βιολογικού γάλακτος. Οι πληθυσμοί του *S. aureus* στα συμβατικά δείγματα κυμάνθηκαν μεταξύ  $<10$  και  $1,9 \times 10^4$  cfu/ml, ενώ στα βιολογικά δείγματα κυμάνθηκαν μεταξύ  $<10$  και  $1,3 \times 10^5$  cfu/ml. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον πληθυσμό του *S. aureus* μεταξύ συμβατικού και βιολογικού γάλακτος.

Τα 17 συνολικά στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν εξετάστηκαν ως προς το επίπεδο της αντιβιοαντοχής τους σε 11 αντιμικροβιακούς παράγοντες με τη μέθοδο της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας. Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η πενικιλίνη, η αμπικιλίνη, η τετρακυκλίνη, η τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, η χλωραμφαινικόλη, η ερυθρομυκίνη, η γενταμυκίνη, η νεομυκίνη, το ναλιδιξικό οξύ, η μεθικιλίνη και η βανκομυκίνη. Στα δείγματα συμβατικού γάλακτος το 85,7% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη, το 28,6% στην αμπικιλίνη, το 100% στην τετρακυκλίνη, την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, τη χλωραμφαινικόλη, την ερυθρομυκίνη, τη γενταμυκίνη, τη νεομυκίνη και το ναλιδιξικό οξύ, το 57,1% στη μεθικιλίνη και το 85,7% στη βανκομυκίνη. Στα δείγματα βιολογικού γάλακτος το 80% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη, το 20% στην αμπικιλίνη, το 100% στην τετρακυκλίνη, την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, τη χλωραμφαινικόλη, την ερυθρομυκίνη, τη γενταμυκίνη, τη νεομυκίνη και το ναλιδιξικό οξύ, το 20% στη μεθικιλίνη και το 90% στη βανκομυκίνη. Τα στελέχη τόσο από το συμβατικό όσο και από το βιολογικό γάλα ήταν σε μεγάλο βαθμό ανθεκτικά σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, εκτός

από την αμπικιλλίνη και τη μεθικιλλίνη. Ειδικότερα για τη μεθικιλλίνη, τα στελέχη που απομονώθηκαν από βιολογικά δείγματα ήταν περισσότερο ευαίσθητα στη μεθικιλλίνη (ποσοστό 80%) από τα στελέχη που απομονώθηκαν από συμβατικά δείγματα (ποσοστό 42,9%). Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο επίπεδο της αντιβιοαντοχής των στελεχών του *S. aureus* που απομονώθηκαν από συμβατικό γάλα και των στελεχών που απομονώθηκαν από βιολογικό γάλα και για τους 11 αντιμικροβιακούς παράγοντες που εξετάστηκαν.

## **ΣΚΟΠΟΣ**

Η παρούσα διπλωματική ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή» του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να αξιολογηθεί η σχέση μεταξύ του τρόπου διαχείρισης της εκμετάλλευσης αιγοπροβάτων (οργανική ή συμβατική) και της παρουσίας *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* και *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* στο νωπό γάλα και του επιπέδου αντιβιοαντοχής τους σε έντεκα αντιβιοτικά σε γαλακτοπαραγωγές εκμεταλλεύσεις αιγοπροβάτων στη Θεσσαλία.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

### 1.1 Ταξινόμηση των Σταφυλόκοκκων

Έχουν αναγνωριστεί πάνω από τριάντα είδη σταφυλόκοκκων, οι περισσότεροι από τους οποίους απαντώνται μόνο στα κατώτερα θηλαστικά (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007). Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram θετικοί, σφαιρικοί, ακίνητοι κόκκοι, διαμέτρου 0.5 έως 1.5  $\mu\text{m}$  και εμφανίζονται μόνοι τους, σε ζεύγη, σε τετράδες ή σε μικρές αλυσίδες (3-4 κύτταρα) και διαχωρίζονται χαρακτηριστικά σε πάνω από ένα επίπεδα σχηματίζοντας ομάδες με τη μορφή σταφυλιού. Ανήκουν στην οικογένεια *Staphylococcaceae*, που περιλαμβάνει, επίσης, τα είδη *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* και *Salinicoccus* (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Το κυτταρικό τους τοίχωμα περιέχει πεπτιδογλυκάνη και τειχοϊκό οξύ. Το διάμινο-οξύ που υπάρχει στην πεπτιδογλυκάνη είναι η L-λυσίνη. Αναπτύσσονται καλύτερα και ταχύτερα υπό αερόβιες συνθήκες, με εξαίρεση το *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* και *Staphylococcus saccharolyticus* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 30 °C -37°C. Οι αποικίες είναι αδιαφανείς και μπορεί να είναι άσπρες ή κρεμώδεις και σπανιότερα κίτρινες ή πορτοκαλί σε αιματούχο άγαρ. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι και μεταβολίζουν με ζύμωση (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007). Είναι συνήθως καταλάση θετικοί και οξειδάση αρνητικοί (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονται παρουσία 10% NaCl και μεταξύ 18°C και 40°C.

Οι θρεπτικές απαιτήσεις ποικίλλουν. Τα περισσότερα είδη απαιτούν μια οργανική πηγή αζώτου, π.χ. συγκεκριμένα αμινοξέα, και βιταμίνες της ομάδας B (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Το νιτρικό οξύ συχνά μετατρέπεται σε νιτρώδες (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007).

Κάποια είδη είναι ευαίσθητα στη λύση από λυσοσταφίνη, αλλά όχι από τη λυσοζύμη (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Κάποια είδη παράγουν εξωκυτταρικές τοξίνες. Οι σταφυλόκοκκοι μπορούν να αναγνωριστούν από την παραγωγή δεοξυριβονουκλεάσης (DNase) και/ή θερμοανθεκτικής DNase (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007).

Οι φυσικοί πληθυσμοί σχετίζονται κυρίως με το δέρμα, τους δερματικούς αδένες και τους βλεννογόνους των θερμόαιμων ζώων. Κάποια είδη απομονώνονται από τρόφιμα ζωικής προέλευσης (π.χ. κρέας, γάλα, τυρί) και από το περιβάλλον (π.χ. έδαφος, άμμος, σκόνη, αέρας ή φυσικά ύδατα). Κάποια είδη είναι ευκαιριακά παθογόνα του ανθρώπου ή/και των ζώων (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

## 1.2 Γενικά για τον *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* έχει αναγνωριστεί ως σημαντική αιτία ασθενειών του ανθρώπου εδώ και πάνω από 100 χρόνια. Ο Alexander Ogston απομόνωσε πρώτος τον *Staphylococcus aureus* από χειρουργικό απόστημα το 1880 και περιέγραψε το ρόλο του *S. aureus* στις τοπικές λοιμώξεις και τη σηψαιμία, συμπεριλαμβανομένου της χρήσης των μοντέλων ζώων των λοιμώξεων. Ο *S. aureus* έχει αναγνωριστεί ως αιτία μεγάλου εύρους λοιμώξεων, από ασήμαντες δερματικές λοιμώξεις και χρόνιες λοιμώξεις των οστών ως σηψαιμία και ενδοκαρδίτιδα (Howden *et al.*, 2010).

Ο *S. aureus* δείχνει ειδικότητα ξενιστή και συγκεκριμένα φαινοτυπικά και γενοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως η παραγωγή β-αιμολυσίνης. Τα γονίδια σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών και η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα σε πληθυσμούς *S. aureus* από διαφορετικά είδη (Jørgensen *et al.*, 2005). Ο *S. aureus* είναι το κύριο εντεροτοξινογόνο είδος. Είναι, επίσης, ο πιο κοινός παράγοντας της μαστίτιδας των βοοειδών που μπορεί, μαζί με τους άλλους παράγοντες τις μαστίτιδας (κοαγκουλάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι, όπως ο *S. agalactiae* και η *E. coli*), να επηρεάσει το 25-50% των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής σε ένα χρόνο. Η

ασθένεια έχει οικονομική σημασία παγκοσμίως και η ετήσια απώλεια ανά αγελάδα έχει υπολογιστεί στις Η.Π.Α. ότι είναι 184,4 δολάρια (Teuber, 1999).

Ο *S. aureus* είναι το πιο συχνό παθογόνο που συναντάμε στα τεταρτημόρια του μαστού με αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων στη Δανία και αντιπροσωπεύει περίπου το 50% των ενδομαστικών λοιμώξεων των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων. Ο έλεγχος των λοιμώξεων από *Staphylococcus aureus* στα κοπάδια γαλακτοπαραγωγής περιλαμβάνει συχνά ένα συνδυασμό προληπτικών μέτρων για να μειωθεί ο αριθμός των νέων μολύνσεων, θεραπεία ξηρής περιόδου των αγελάδων με αντιβιοτικά, θεραπεία των μολυσμένων ζώων και σφαγή των χρόνια μολυσμένων ζώων (Bennedsgaard *et al.*, 2006).

Τα αντιβιοτικά που έχουν εγκριθεί για χρήση στις αγελάδες που βρίσκονται στη γαλακτοπαραγωγική και στην ξηρή περίοδο ως μέτρα για την αποφυγή και τη θεραπεία της μαστίτιδας περιλαμβάνουν την αμοξικιλίνη, την κεφαπρίνη, την κλοξακιλίνη, την πιρλμισίνη, την πενικιλίνη και τους συνδυασμούς της με τη νοβοβοκίνη ή τη στρεπτομυκίνη. Λόγω του υψηλού επιπολασμού της μαστίτιδας των βοοειδών και τη σχετική κατανάλωση αντιβιοτικών, αναμένεται ο εμπλουτισμός των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά σταφυλοκόκκων και πράγματι έχει παρατηρηθεί. Το φαινόμενο εξαρτάται από το συγκεκριμένο κοπάδι και τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για πρόληψη και θεραπεία (Teuber, 1999).

Η ιστορία του *S. aureus* είναι ιστορία εξέλιξης και αλλαγής. Η απόκτηση αντιμικροβιακής αντοχής και τα μεταβαλλόμενα πρότυπα των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων αποτελούν κοινά θέματα στη σταφυλοκοκκική λογοτεχνία τα τελευταία 50 χρόνια. Σημαντικά γεγονότα στην εξέλιξη του *S. aureus* αποτελούν η ανάπτυξη της αντοχής στη μεθικιλίνη, πρόβλημα πολλών νοσοκομείων σε όλο τον κόσμο, και η πρόσφατη εμφάνιση κοινοτικών στελεχών *S. aureus* που είναι ανθεκτικά στη μεθικιλίνη και υποκρύπτουν γονίδια που σχετίζονται με αυξημένη λοιμογόνο δύναμη (Howden *et al.*, 2010).

### 1.3 Μορφολογία – Χαρακτηριστικά του *Staphylococcus aureus*

Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στο φύλο *Firmicutes*. Συγγενεύει στενά με τους βάκιλλους και άλλα μέλη του φύλου *Firmicutes*, όπως οι μακρόκοκκοι, εντερόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι, λακτοβάκιλλοι και λιστέρια.

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένας ακίνητος, μη σπορογόνος, Gram θετικός κόκκος. Απαντάται ένας-ένας και σχηματίζει ζευγάρια και συστάδες. Είναι προαιρετικά αναερόβιος και αναπτύσσεται καλά σε μέσα που περιέχουν 10% χλωριούχο νάτριο και ελάχιστα σε 15% χλωριούχο νάτριο. Αντιδρά θετικά με την αλκαλική φωσφατάση, την καταλάση, την κοαγκουλάση, τη θερμοανθεκτική νουκλεάση, την υαλουρονιδάση και προκαλεί αιμόλυση. Αντιδρά αρνητικά με την οξειδάση, τη β-γαλακτοσιδάση και τη β-γλυκουρονιδάση. Παράγει οξύ υπό αερόβιες συνθήκες από τη φρουκτόζη, τη μαλτόζη και τη σουκρόζη. Δεν παράγει οξύ από την αραβινόζη, τη σελοβιόζη, τη μελεσιτόζη, τη ραφινόζη, τη σαλικίνη, την ξυλιτόλη και την ξυλόζη. Είναι ευαίσθητος στη νοβοβοκίνη. Το τειχοϊκό οξύ περιέχει ριβιτόλη και N-ακετυλογλυκοζαμίνη (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Το σταφυλοκοκκικό κυτταρικό τοίχωμα είναι μια δυναμική δομή σημαντική για τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας και κρίσιμη στην αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου. Η εξώτατη επιφάνεια του *S. aureus* καλύπτεται συνήθως από μια πολυσακχαριδική κάψουλα. Κάτω από την κάψουλα βρίσκεται το κυτταρικό τοίχωμα, μια δομή που αποτελείται από ισχυρά συνδεδεμένη πεπτιδογλυκάνη (μια σύνθετη δομή που αποτελείται από σάκχαρα και αμινοξέα, ονομάζεται επίσης μуреΐνη), τειχοϊκό οξύ και πρωτεΐνες που σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα. Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από αλυσίδες γλυκάνης που απαρτίζονται από εναλλασσόμενα αμινοσάκχαρα N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλομουραμικό οξύ. Πενταπεπτίδια συνδέονται με την καρβοξυλική ομάδα κάθε N-ακετυλομουραμικού οξέος και ενδοπεπτιδικές γέφυρες (πενταγλυκίνες, που απαρτίζονται από κατάλοιπα γλυκίνης) συνδέουν τη λυσίνη ενός πενταπεπτιδίου με την προτελευταία D-αλανίνη ενός γειτονικού πενταπεπτιδίου. Οι αλυσίδες του τειχοϊκού οξέος συνδέονται με τις 6-υδροξυλομάδες μερικών καταλοίπων του N-ακετυλομουραμικού οξέος των αλυσίδων γλυκάνης και, μαζί με την πεπτιδογλυκάνη, σχηματίζουν ένα πολυστοιβαδικό δίκτυο που περιβάλλει το κύτταρο του



*S. aureus*. Η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης από διαφορετικά στελέχη *S. aureus* είναι σταθερή, με σχεδόν παρόμοια πρότυπα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) των μουροπεπτιδίων των στελεχών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σύνθεση είναι ειδική του είδους. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο το κυτταρικό τοίχωμα του *S. aureus* φαίνεται σαν μια παχιά (20 έως 40 nm πάχος) ομοιογενής δομή. Ο πραγματικός προσανατολισμός των αλυσίδων γλυκάνης μέσα στο κυτταρικό τοίχωμα είναι αβέβαιος. Ένα πρόσφατο μοντέλο προτείνει ότι οι αλυσίδες γλυκάνης και ολιγοπεπτιδίων είναι στην πραγματικότητα κάθετες στην πλασματική μεμβράνη, με τις αλυσίδες των ολιγοπεπτιδίων να υιοθετούν μια διαμόρφωση ζικ-ζακ για να συνδεθούν δίπλα στα σκέλη της γλυκάνης.

Το σταφυλοκοκκικό κυτταρικό τοίχωμα περιέχει, επίσης, τειχοϊκό οξύ που αντιπροσωπεύει έως και 50% του ξηρού βάρους του καθαρού σταφυλοκοκκικού κυτταρικού τοιχώματος. Τα λιποτειχοϊκά οξέα (LTAs) είναι πολυμερή της φωσφορικής γλυκερόλης που συνδέονται με το γλυκολιπιδικό τέρμα στην κυτοπλασματική μεμβράνη. Η πλήρης απώλεια του LTA οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο του *S. aureus*. Το λιποτειχοϊκό οξύ φαίνεται να συμμετέχει στην κυτταρική διαίρεση. Κάποια δεδομένα προτείνουν ότι τα τειχοϊκά οξέα παίζουν κάποιο ρόλο στο να βοηθούν στην προστασία του κυτταρικού φακέλου σαν ένας μηχανικός φραγμός στα μόρια της άμυνας του ξενιστή και τα αντιβιοτικά και, επίσης, το θετικό φορτίο των καταλοίπων D-αλανίνης απωθεί θετικά φορτισμένα μόρια. Τα τειχοϊκά οξέα του τοιχώματος συνεισφέρουν, επίσης, στην αντίσταση στη λυσοζύμη του *S. aureus* εμποδίζοντας τη σύνδεση της λυσοζύμης στην πεπτιδογλυκάνη και παίζουν ρόλο στη σύνδεση με τα κύτταρα του ξενιστή.

Μεγάλος αριθμός γονιδίων συμμετέχουν στην πρόδρομη παραγωγή του σταφυλοκοκκικού κυτταρικού τοιχώματος. Σημαντικά γονίδια είναι τα *femA*, *femB*, *femC* και *femX* γονίδια, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις συνδετικές πρωτεΐνες της πενικιλίνης (PBPs: *pbpA*, *pbpB*, *pbpC* και *pbpD*) και τα ρυθμιστικά γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, όπως το *vraSR* (Howden *et al.*, 2010).



Ηλεκτρονική μικρογραφία του *S. aureus*, 20,000x

Το μέγεθος του γενώματος των στελεχών του *Staphylococcus aureus* είναι 2,82-2,9 Mbp. Επτά στελέχη *Staphylococcus aureus* έχουν πλήρως αποκωδικοποιηθεί. Το

στέλεχος N315 είναι ένας ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* και το στέλεχος Mu50 είναι ανθεκτικό στη μεθικιλίνη και στη βανκομυκίνη (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Ο *Staphylococcus aureus* είναι κοαγκουλάση θετικός. Ο *S. aureus* είναι ένα πρωταρχικό παθογόνο που μπορεί να σχετίζεται με πολλές λοιμώξεις και είναι σημαντικό να διαχωριστεί από τους ευκαιριακούς κοαγκουλάση-αρνητικούς σταφυλόκοκκους. Στην εργαστηριακή ρουτίνα η παραγωγή κοαγκουλάσης χρησιμοποιείται συχνά ως το μόνο κριτήριο για τη διάκριση του *S. aureus* από τους άλλους σταφυλόκοκκους. Άλλα είδη κοαγκουλάση-θετικών σταφυλόκοκκων, όπως οι *S. hyicus*, *S. schleiferi* υποείδος *coagulans* ή *S. intermedius* μπορεί να είναι κοαγκουλάση θετικά, αλλά βρίσκονται μόνο περιστασιακά στις ανθρώπινες λοιμώξεις ή στις μεταφορές. Η παραγωγή κοαγκουλάσης και θερμοανθεκτικής νουκλεάσης από αυτούς τους σταφυλόκοκκους μπορεί να προκαλέσει τη λάθος αναγνώρισή τους ως *S. aureus*. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και κοαγκουλάση-αρνητικά στελέχη *S. aureus* (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007).

Ο *S. aureus* παράγει τοξικούς παράγοντες, όπως η πρωτεΐνη A, τοιχωματικούς πολυσακχαρίτες και τοξίνη α. Κάποια στελέχη *S. aureus* παράγουν την τοξίνη 1 τοξικού σοκ (TSST-1), την Panton Valentine Leucocidin ή άλλες τοξίνες (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007). Ο *S. aureus* παράγει πολλές εκκριτικές εξωπρωτεΐνες που συνεισφέρουν σημαντικά στη λοιμογόνο δύναμη, όπως είναι οι εντεροτοξίνες, οι κυτολυτικές τοξίνες και η πρωτεΐνη A (Spa) (Kennedy *et al.*, 2008).

Η πολυανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μπορεί να σχετίζεται με τα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη. Είναι θετικά στην θερμοανθεκτική νουκλεάση (NSA, Identification of *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp and *Rothia* spp., 2007).

Ο εκλεκτικός εμπλουτισμός συστήνεται για νωπά και μη επεξεργασμένα τρόφιμα που αναμένεται να περιέχουν <100 κύτταρα *Staphylococcus aureus*/gr και μεγάλο πληθυσμό ανταγωνιστικών ειδών. Οι συνιστώμενες διαδικασίες για τον εκλεκτικό εμπλουτισμό του *Staphylococcus aureus* είναι η τεχνική του πιο πιθανού αριθμού ή η απευθείας επίστρωση σε Baird-Parker άγαρ. Εκτός από το Baird-Parker μπορούν να χρησιμοποιηθούν και κάποια άλλα εκλεκτικά υποστρώματα.

Η ταυτοποίηση στα κλινικά εργαστήρια ή στα εργαστήρια ρουτίνας γίνεται με κιτ ταχείας αναγνώρισης των ειδών ή με αυτοματοποιημένα συστήματα που απαιτούν μόνο λίγες ώρες ως μία ημέρα για την ολοκλήρωση της δοκιμής. Η ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού στελεχών του είδους *Staphylococcus* μπορεί να γίνει με ακρίβεια 70% ως >90% με τα εμπορικά συστήματα. Ο *S. aureus* μπορεί να ταυτοποιηθεί αξιόπιστα από τα περισσότερα εμπορικά συστήματα που είναι διαθέσιμα στις μέρες μας. Κάποια από αυτά τα συστήματα είναι: RAPIDEC Staph και API STAPH, VITEK, MicroScan Pos ID panel, MicroScan Rapid Pos ID panel, κ.ά. (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

#### **1.4 Παθογένεια του *Staphylococcus aureus***

Οι κοαγκουλάση-θετικοί σταφυλόκοκκοι, μεταξύ των οποίων και ο *Staphylococcus aureus*, είναι δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί. Στα τέλη του 1950 και στις αρχές του 1960 ο *S. aureus* προκάλεσε σοβαρή νοσηρότητα και θνησιμότητα ως νοσοκομειακό παθογόνο των νοσηλευόμενων ασθενών (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Ο *S. aureus* είναι ένας συμβιωτικός οργανισμός και ένα πολύπλευρο παθογόνο των ζώων και του ανθρώπου. Είναι η αιτία επιφανειακών και εν τω βάθει λοιμώξεων και, μέσω των εξωτοξινών του, μιας ποικιλίας τοξαιμικών συνδρόμων (Jørgensen *et al.*,

2005). Ο *S. aureus* είναι υπεύθυνος για μια ποικιλία λοιμώξεων (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Αποτελεί σημαντική αιτία ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων και λοιμώξεων στην κοινότητα. Οι ασθένειες που σχετίζονται με αυτόν το μικροοργανισμό ποικίλλουν από ήπιες δερματικές λοιμώξεις σε πιθανά θανατηφόρες συστηματικές ασθένειες, όπως η ενδοκαρδίτιδα και το σύνδρομο τοξικού σοκ. Ο *S. aureus* είναι ένα κοινό παθογόνο που επηρεάζει άτομα όλων των ηλικιών (CDC, 2006). Προκαλεί λοιμώξεις στους ανθρώπους, όπως δοθήνες, έκζεμα, τοξική επιδερμική νεκρόλυση, πνευμονία, οστεομυελίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα, εντεροκολίτιδα, μαστίτιδα, κυστίτιδα, προστατίτιδα, τραχηλίτιδα, μηνιγγίτιδα, βακτηριαιμία, σύνδρομο τοξικού σοκ και αποστήματα στους μύς, στο δέρμα, στην ουρογεννητική οδό, στο κεντρικό νευρικό σύστημα και σε διάφορα ενδοκοιλιακά όργανα (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Οι λοιμώξεις από *S. aureus* σχετίζονται συχνά με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας. Πράγματι, αναφορές εκτιμούν ότι το 2005 ο οργανισμός προκάλεσε περισσότερους θανάτους στις Η.Π.Α. από ότι ο HIV/AIDS.

Η επιτυχία του *S. aureus* ως βακτηριακό παθογόνο μπορεί, εν μέρει, να αποδοθεί στην ικανότητά του να σχηματίζει βιομεμβράνες (βιοφίλμ) σε εμφυτευμένες ιατρικές συσκευές, που αποτελεί προφανώς το επίκεντρο για τη διάδοση των βακτηρίων σε δευτερογενείς τοποθεσίες του ξενιστή. Ένα από τα εμπλεκόμενα θέματα στη θεραπεία των σχετικών με τα βιοφίλμ λοιμώξεων είναι ότι τα βακτήρια που σχηματίζουν βιοφίλμ είναι εγγενώς απείθαρχα στη θεραπεία με αντιβιοτικά. Η επιτυχία του *S. aureus* ως παθογόνο του ανθρώπου μπορεί, εν μέρει, να αποδοθεί στην ικανότητά του να παράγει ένα εκτεταμένο ρεπερτόριο τοξικών παραγόντων, που αυξάνουν συνολικά την ικανότητα του οργανισμού να αποικίζει και να εισβάλλει στους ιστούς του ξενιστή, να αποφεύγει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και να προσαρμόζεται στις σχετικές με τον ξενιστή προκλήσεις του περιβάλλοντος (Olson *et al.*, 2011).

Επιπλέον, οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες εμπλέκονται σε τροφικές δηλητηριάσεις (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Στα τροφιμογενή παθογόνα ανήκουν και εκείνα που παράγουν εντεροτοξίνες και άλλα τοξικά μόρια κατά την ανάπτυξή τους στα μολυσμένα τρόφιμα, π.χ. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και *Clostridium perfringens*. Τα τοξινογόνα βακτήρια μπορεί να είναι παρόντα σε αριθμούς μεγαλύτερους από  $10^4$  CFU ανά γραμμάριο πριν το μολυσμένο τρόφιμο γίνει μη

αποδεκτό. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα αντιβιοτικά δε χρησιμεύουν στη θεραπεία ενός ασθενή που υποφέρει από τροφική δηλητηρίαση.

Ο *S. aureus* είναι το κύριο εντεροτοξινογόνο είδος (Teuber *et al.*, 1999). Κάποια στελέχη παράγουν σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες που μπορούν να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση, αν καταναλωθεί τρόφιμο που περιέχει προσχηματισμένες σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες. Τα συμπτώματα της σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης είναι ταχείας εμφάνισης (2-6 ώρες) και μπορεί να περιλαμβάνουν έμετο, στομαχικό άλγος και διάρροια. Στις μέρες μας έχουν περιγραφεί 18 σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (SEs) και είναι οι SEA έως SEE, οι SEG έως SER και η SEU. Κάποιες από αυτές στερούνται της ικανότητας να προκαλούν έμετο ή δεν έχουν ελεγχθεί για εμετικό αποτέλεσμα και αυτές ονομάζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια σταφυλοκοκκικές πρωτεΐνες τύπου εντεροτοξίνης. Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν συχνά ενοχοποιηθεί για σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση και συχνά εμπλέκεται το μολυσμένο νωπό γάλα (Jørgensen *et al.*, 2005).

Τα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν τις σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες και τις τοξίνες τύπου σταφυλοκοκκικής εντεροτοξίνης εδρεύουν στα κινητά γενετικά στοιχεία, όπως τα πλασμίδια, τα σταφυλοκοκκικά νησιά παθογένειας και τα νησιά γενώματος. Η οριζόντια μεταφορά των κινητών γενετικών στοιχείων είναι σημαντικό μέσο απόκτησης των παραγόντων τοξικότητας από τον *S. aureus* (Hwang *et al.*, 2010).

Η μαστίτιδα από *S. aureus* αποτελεί σοβαρό πρόβλημα στην γαλακτοκομική παραγωγή και τα μολυσμένα ζώα μπορεί να μολύνουν το χύδην γάλα. Οι χειριστές, ο εξοπλισμός άμελης, το περιβάλλον και το δέρμα των μαστών και των θηλών των ζώων γαλακτοπαραγωγής είναι πιθανές πηγές μόλυνσης του χύδην γάλακτος. Η επαρκής ψύξη του νωπού γάλακτος μέχρι την παστερίωσή του, ακολουθούμενη από προσπάθειες να προληφθεί η επαναμόλυνση, ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης από προϊόντα γάλακτος, αλλά όταν το νωπό γάλα χρησιμοποιείται για παραγωγή, το μολυσμένο χύδην γάλα μπορεί να είναι επικίνδυνο, ιδιαίτερα σε περίπτωση που είναι σημαντική η μόλυνση από *S. aureus* ή όταν οι καλλιέργειες εκκίνησης ή άλλες συνθήκες αποτυγχάνουν (Jørgensen *et al.*, 2005).

Τα στελέχη του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) πρωτοεμφανίστηκαν τη δεκαετία του 1980 ως τεράστιο κλινικό και επιδημιολογικό πρόβλημα στα νοσοκομεία. Τα στελέχη αυτά έχουν εξαπλωθεί εκτός των νοσοκομείων και έχουν εισβάλλει στις κοινότητες ανθρώπων και ζώων.

Ο *S. aureus* προκαλεί λοιμώξεις και σε πολλά ζώα και πτηνά. Οι πιο κοινές φυσικές λοιμώξεις περιλαμβάνουν τη μαστίτιδα, υμενίτιδα, αρθρίτιδα, ενδομητρίτιδα, δοθιήνες, διαπυημένη δερματίτιδα, πυαιμία και σηψαιμία. Η σταφυλοκοκκική μαστίτιδα είτε στην υποκλινική είτε στην κλινική της μορφή μπορεί να έχει σημαντικές οικονομικές συνέπειες στη γαλακτοβιομηχανία (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Ο *S. aureus* είναι, επίσης, ο πιο κοινός παράγοντας της μαστίτιδας των βοοειδών που μπορεί, μαζί με τους άλλους παράγοντες της μαστίτιδας (κοαγκουλάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι, όπως ο *S. agalactiae* και η *E. coli*), να επηρεάσει το 25-50% των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής σε ένα χρόνο (Teuber *et al.*, 1999). Ο *S. aureus* είναι σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας της μαστίτιδας των βοοειδών, που προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες στα κοπάδια γαλακτοπαραγωγής παγκοσμίως. Ο *S. aureus* παράγει μια ποικιλία τοξικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για υποκλινικές και επίμονες ενδομαστικές λοιμώξεις. Η μαστίτιδα που σχετίζεται με τον *S. aureus* είναι από τις πιο μεταδοτικές ασθένειες που επί του παρόντος μαστίζουν τα κοπάδια γαλακτοπαραγωγής. Τα κύρια παθογόνα που προκαλούν υποκλινική μαστίτιδα είναι οι κοαγκουλάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CNS), το *Corynebacterium bovis* και ο *S. aureus*. Τα Coliforms, ο *Streptococcus uberis* και ο *S. aureus* είναι τα παθογόνα που απομονώνονται πιο συχνά από δείγματα κλινικής μαστίτιδας (Kalmus *et al.*, 2011).

Ο *S. aureus* και οι κοαγκουλάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι μπορούν να μολύνουν το γάλα και το κρέας και να επιβιώσουν στα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως το τυρί (περίπου  $10^2$ - $10^3$  CFU ανά γραμμάριο) και τα λουκάνικα (έως  $10^5$  CFU ανά γραμμάριο), εάν το ωμό υλικό δεν παστεριώνεται κατά τη διαδικασία παρασκευής ή εάν συμβεί επιμόλυνση μετά τη θερμική επεξεργασία. Σε τέτοια προϊόντα βρέθηκαν ανθεκτικοί στην πενικιλίνη, τη νεομυκίνη, τη γενταμυκίνη, τη χλωραμφαινικόλη, την τετρακυκλίνη, την ερυθρομυκίνη και τη λινκομυκίνη *S. aureus* και κοαγκουλάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (*S. xylosus*, *S. lentus*, *S. caprae*, *S. epidermidis* και *S.*

*haemolyticus*) (Teuber *et al.*, 1999). Οι κατευθυντήριες γραμμές του Εθνικού Συμβουλίου Μαστίτιδας (National Mastitis Council, NMC) θεωρούν σημαντική τη μια αποικία *Staphylococcus aureus* ή *Streptococcus agalactiae* στην καλλιέργεια (Hariharan *et al.*, 2004).

Η μαστίτιδα θεωρείται η ασθένεια που κοστίζει περισσότερο ετησίως στη γαλακτοβιομηχανία με ετήσιες οικονομικές απώλειες στις Ηνωμένες Πολιτείες που υπερβαίνουν τα 2 εκατομμύρια δολάρια (1984). Οι απώλειες προέρχονται από την απόρριψη του γάλακτος, το κόστος των φαρμάκων, την κτηνιατρική περίθαλψη, τις υπερωρίες και την πρόωρη σφαγή. Ο *Staphylococcus aureus* είναι από τα πιο σημαντικά παθογόνα που προκαλούν ενδομαστικές λοιμώξεις στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και παραμένει μια από τις σημαντικότερες αιτίες μαστίτιδας στα κοπάδια γαλακτοπαραγωγής παγκοσμίως. Ο μικροοργανισμός αυτός προκαλεί κλινικές και υποκλινικές μαστίτιδες και είναι παρόν τόσο στις εκτροφές με σωστή διαχείριση όσο και στις εκτροφές που αντιμετωπίζουν προβλήματα διαχείρισης και υγιεινής. Η μείωση της επίδρασης του *S. aureus* επιτυγχάνεται μειώνοντας τον αριθμό και τη διάρκεια των λοιμώξεων. Η μείωση της διάρκειας των λοιμώξεων επιτυγχάνεται είτε με την επιτυχημένη θεραπεία είτε με τη σφαγή του μολυσμένου ζώου. Η θεραπεία με αντιβιοτικά μπορεί να γίνει κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής ή κατά την ξηρή περίοδο (Tikofsky *et al.*, 2002).

Η διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ο στόχος πολλών εναλλακτικών θεραπειών που προτείνονται για τη θεραπεία της μαστίτιδας. Η υποδόρια χορήγηση ενός εκχυλίσματος τζίνσεγκ έχει εκτιμηθεί ως θεραπεία για αγελάδες με υποκλινική μαστίτιδα από *S. aureus*. Η χρήση του εκχυλίσματος τζίνσεγκ ως ανοσοενισχυτικό για μια βακτηρίνη *S. aureus* είχε ως αποτέλεσμα τον ενισχυμένο πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων ως απάντηση στη διέγερση και στη μεγαλύτερη παραγωγή αντισωμάτων. Ωστόσο, η υποδόρια χορήγηση τζίνσεγκ σε αγελάδες με υποκλινική μαστίτιδα από *S. aureus* δεν επηρέασε τον αριθμό των βακτηριολογικών θεραπειών, τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα, τον αριθμό των λευκοκυττάρων του αίματος ή την αναλογία του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων (Ruegg *et al.*, 2009).

Οι σταφυλόκοκκοι είναι οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες των ενδομαστικών λοιμώξεων των μικρών μηρυκαστικών και ο *Staphylococcus aureus* απομονώνεται

συχνότερα από κλινικές ενδομαστικές λοιμώξεις, ενώ οι κοαγκουλάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι απομονώνονται συχνότερα από υποκλινικές ενδομαστικές λοιμώξεις. Η ετήσια επίπτωση των κλινικών ενδομαστικών λοιμώξεων στα πρόβατα γαλακτοπαραγωγής είναι γενικά χαμηλότερη από 5%, αλλά σε μικρό ποσοστό κοπαδιών μπορεί να υπερβεί το 30-50% των ζώων, προκαλώντας θνησιμότητα (γαγγραινώδης μαστίτιδα) ή σφαγή έως και του 70% του κοπαδιού. Επιπλέον, οι υποκλινικές ή κρυφές ενδομαστικές λοιμώξεις από *S. aureus* εμφανίζονται στο 3-37% των προβάτων γαλακτοπαραγωγής και είναι σημαντικές για οικονομικούς λόγους, για λόγους υγιεινής και για νομικούς λόγους στην Ευρώπη (Vautor *et al.*, 2009).

Η μαστίτιδα είναι σημαντική ασθένεια των προβάτων. Αν και ένα μεγάλο εύρος μικροοργανισμών μπορεί να προκαλέσει μαστίτιδα των προβάτων, οι περισσότερες περιπτώσεις αναφέρθηκε ότι οφείλονταν σε σταφυλόκοκκους. Πολλές αναφορές υποδηλώνουν ότι οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CNS) είναι η συχνότερη αιτία υποκλινικής μαστίτιδας στις προβατίνες γαλακτοπαραγωγής, ενώ οι CNS και ο *S. aureus* είναι συχνές αιτίες στο κρέας των προβάτων (Tormod *et al.*, 2007).

Η κύρια δεξαμενή του *S. aureus* στα πρόβατα είναι οι μολυσμένοι μαστικοί αδένες και τα τραύματα των θηλών. Ωστόσο, ο *S. aureus* μπορεί επίσης να καλλιεργηθεί από ανέπαφο δέρμα των θηλών και από άλλα μέρη του σώματος. Στα κοπάδια γαλακτοπαραγωγής η μεταφορά κατά τη διάρκεια της άμελης θεωρείται σημαντικός μηχανισμός εξάπλωσης αυτού του οργανισμού. Στα κοπάδια κρεοπαραγωγής η μετάδοση του *S. aureus* μεταξύ των προβατίνων μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταφοράς από το βοσκό κατά τη διάρκεια του ελέγχου του μαστού με το χέρι ή ο μαστός εκτίθεται στη στρωμή που έχει μολυνθεί από τις μολυσμένες προβατίνες. Κάποιοι αμνοί που θηλάζουν και από άλλες προβατίνες, εκτός από τη μητέρα τους, μπορεί να συμβάλλουν στο μηχανισμό εξάπλωσης του *S. aureus*. Οι υποκλινικά μολυσμένοι μαστοί αποτελούν σημαντική δεξαμενή του *S. aureus* που μπορεί να ανιχνευθεί μόνο μέσω βακτηριολογικής εξέτασης.

Ο *S. aureus* είναι η πιο συχνή αιτία κλινικής μαστίτιδας των προβάτων στη Νορβηγία και ο οργανισμός αυτός συχνά εξαπλώνεται μεταξύ των μαστικών αδένων στις μολυσμένες προβατίνες (Tormod *et al.*, 2007).



## 1.5 Ανθεκτικότητα του *Staphylococcus aureus* στα αντιβιοτικά

Αν και συνήθως δεν εκτιμάται, ο *Staphylococcus aureus* είναι γνωστό εδώ και καιρό ότι προκαλεί επιδημίες. Επιπλέον, ο *S. aureus* είναι τυπικά πολυανθεκτικός και επομένως οι λοιμώξεις μπορεί να είναι δύσκολο να θεραπευθούν. Τα πρώτα ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη αναφέρθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1940 και έγιναν ευρέως διαδεδομένες αιτίες λοιμώξεων σε νοσηλευόμενους ασθενείς. Ένας ανθεκτικός στην πενικιλίνη γονότυπος *S. aureus* που ορίζεται τύπος βακτηριοφάγου 80/81 προκάλεσε πανδημία στις δεκαετίες του 1950 και 1960 στα νοσοκομεία και στην κοινότητα. Αν και τα στελέχη τύπου βακτηριοφάγου 80/81 εξαφανίστηκαν μετά την εμφάνιση της μεθικιλίνης το 1959, ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *S. aureus* (MRSA) εμφανίστηκαν σχεδόν αμέσως και τώρα προκαλούν επιδημίες στα νοσοκομεία (Kennedy *et al.*, 2008).

Το γονίδιο *mecA* των σταφυλόκοκκων κωδικοποιεί την αλλοιωμένη δεσμευτική πρωτεΐνη της πενικιλίνης 2a και σχετίζεται με την αντοχή στην πενικιλίνη. Η ανίχνευση του *mecA* συσχετίζεται ισχυρά με τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MICs) μεγαλύτερες από την τιμή cutoff του άγριου τύπου (MIC οξακιλλίνης 2 mg/l [CLSI]) (Turnidge and Paterson, 2007). Πολλά γονίδια που συνεισφέρουν στη λοιμογόνο δύναμη ή την αντοχή στα αντιβιοτικά του *S. aureus* κωδικοποιούνται από κινητά στοιχεία, όπως οι ακολουθίες εισαγωγής, τα τρανσποζόνια, τα πλασμίδια, οι προφάγοι και τα γονιδιακά νησιά (Kennedy *et al.*, 2008).

Η εμφάνιση της αντοχής στη βανκομυκίνη και των υπερτοξικών στελεχών έχει εντείνει την ανάγκη για νέους αντισταφυλόκοκκικούς παράγοντες. Η επεξεργασία του βακτηριακού RNA και η υποβάθμισή του είναι απαιτούμενες κυτταρικές διεργασίες που μπορούν να αξιοποιηθούν για ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών φαρμάκων (Olson *et al.*, 2011).

## 1.6 Ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Τα στελέχη του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) προκαλούν πλήθος ασθενειών στους ανθρώπους, που εκτείνονται από μικρές δερματικές λοιμώξεις έως επικίνδυνες για τη ζωή του ανθρώπου εν τω βάθει λοιμώξεις, όπως πνευμονία, ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα, μετεγχειρητικές λοιμώξεις, σηψαιμία και σύνδρομο τοξικού σοκ. Η μεγάλη εξάπλωση των στελεχών του MRSA σε όλο τον κόσμο τον καθιστά ένα σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας, καθώς αυτό το Gram-θετικό παθογόνο έχει αναπτύξει αντιβιοαντοχή σε πολλά φάρμακα (Arivudainambi *et al.*, 2011).

Πράγματι, κάποια στελέχη έχουν γίνει ανθεκτικά πρακτικά σε όλους τους συνηθισμένους διαθέσιμους παράγοντες. Μια περιβόητη περίπτωση είναι ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA), που δεν είναι ανθεκτικός μόνο στη μεθικιλίνη (η οποία αναπτύχθηκε για να αντιμετωπιστούν οι *S. aureus* που παράγουν πενικιλινάσες), αλλά συνήθως και στις αμινογλυκοσίδες, τα μακρολίδια, την τετρακυκλίνη, τη χλωραμφαινικόλη και τις λινκοσαμίδες. Αυτά τα στελέχη είναι, επίσης, ανθεκτικά στα απολυμαντικά και ο MRSA μπορεί να δράσει ως κύρια πηγή ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Ένα παλιό αντιβιοτικό, η βανκομυκίνη, ανασύρθηκε για τη θεραπεία των λοιμώξεων από MRSA. Ωστόσο, η μεταβιβάσιμη αντίσταση στη βανκομυκίνη είναι αρκετά συνηθισμένη στον *Enterococcus* spp. και τελικά μεταφέρθηκε στον MRSA το 2002, αν και τέτοια στελέχη είναι προς το παρόν σπάνια (Nikaido, 2009).

Οι αναδυόμενες και οι επανεμφανιζόμενες μολυσματικές ασθένειες, ειδικά εκείνες που οφείλονται σε ανθεκτικά στα φάρμακα βακτήρια, αποτελούν μεγάλο πρόβλημα παγκοσμίως. Ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* που σχετίζεται με την κοινότητα (CA-MRSA) εμφανίστηκε ραγδαία και απροσδόκητα στις Ηνωμένες Πολιτείες, με αποτέλεσμα μια επιδημία που προκλήθηκε κυρίως από στελέχη που ταξινομήθηκαν ως USA300. Τα εξελικτικά και μοριακά θεμέλια της επιδημίας αυτής είναι δύσκολα κατανοητά. Ειδικότερα, δεν είναι ξεκάθαρο αν υπήρξε κλωνική εμφάνιση των στελεχών USA300 ή εξελικτική σύγκλιση προς έναν υπερπαθογόνο φαινότυπο με αποτέλεσμα μια ανεξάρτητη εμφάνιση παρόμοιων οργανισμών. Η πλειονότητα όλων των λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών ιστών των ασθενών που προσέρχονται στα τμήματα επείγοντων περιστατικών στις Ηνωμένες Πολιτείες προκαλούνται από τον

CA-MRSA. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη των Klevens και συν. υποδεικνύει ότι τα στελέχη USA300 αντιπροσωπεύουν την πλειοψηφία (67%) των λοιμώξεων από MRSA που εισβάλλουν στην κοινότητα, κάποιες από τις οποίες οδηγούν στο θάνατο. Αυτή και άλλες μελέτες δείχνουν ξεκάθαρα ότι υπάρχει μια επιδημία σε εξέλιξη στις Ηνωμένες Πολιτείες από CA-MRSA. Η προέλευση των στελεχών που ταξινομήθηκαν ως USA300 δεν είναι γνωστή, ούτε καταλαβαίνουμε την έκταση της γενετικής ποικιλότητας ή τη βάση της αυξημένης λοιμογόνου δύναμης αυτών των οργανισμών (Kennedy *et al.*, 2008).

Ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) (που πιθανώς αντιστοιχεί σε λιγότερο από το ένα τρίτο όλων των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων) προκάλεσε μόνος του περισσότερους θανάτους στις Η.Π.Α. το 2005 από τις λοιμώξεις του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (το εκτιμώμενο ποσοστό θνησιμότητας του MRSA το 2005 είναι 6,3 ανά 100.000 άτομα) και προκάλεσε περισσότερες λοιμώξεις (εκτιμώμενη επίπτωση του MRSA το 2005 31,8 ανά 100.000 άτομα) από άλλα σημαντικά βακτηριακά παθογόνα, όπως ο *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* και *Neisseria meningitidis* (Howden *et al.*, 2010).

Ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* υπολογίζεται ότι προκαλεί περισσότερους θανάτους ετησίως στις Η.Π.Α. από ότι ο HIV/AIDS. Η εμφάνιση των εξωνοσοκομειακών στελεχών του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) που είναι ικανά να προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις σε κατά τα άλλα υγιή άτομα καθιστά τον οργανισμό ένα πιο φοβερό παθογόνο σήμερα από οποιαδήποτε άλλη στιγμή από την έναρξη της εποχής των αντιβιοτικών. Πράγματι, εκτιμάται ότι μόνο το 2005 ο αριθμός των νέων λοιμώξεων από MRSA στις Η.Π.Α. ήταν περίπου 94.360, από τις οποίες οι 18.650 είχαν θανατηφόρα κατάληξη. Με βάση αυτές τις στατιστικές, ο *S. aureus* έχει ξεπεράσει το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) ως αιτία θανάτου στις Η.Π.Α., αυξάνοντας περαιτέρω την ανάγκη για νέους αντισταφυλοκοκκικούς παράγοντες (Olson *et al.*, 2011).

Οι σταφυλόκοκκοι είναι τα πιο κοινά παθογόνα που σχετίζονται με την υποκλινική μαστίτιδα στις αίγες γαλακτοπαραγωγής. Αν και οι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκοι αντιπροσωπεύουν τα πιο σημαντικά παθογόνα που ευθύνονται για σοβαρές ανθρώπινες ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, η απουσία του γονιδίου *mecA* και ο

χαμηλός επιπολασμός της απλής και της πολλαπλής ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά υποδηλώνει ότι η υποκλινική μαστίτιδα στις αίγες δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση των πολυανθεκτικών σταφυλόκοκκων και δεν αντιπροσωπεύει μεγάλο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Virdis *et al.*, 2010).

Πρόσφατες έρευνες που διεξήχθησαν στις Κάτω Χώρες και στον Καναδά αποκάλυψαν υψηλό επιπολασμό (20-40%) του MRSA στους χοίρους. Η μετάδοση του MRSA από τους χοίρους στους χοιροτρόφους και τις οικογένειές τους έχει τεκμηριωθεί στην Ευρώπη. Έτσι, έχουν διατυπωθεί ανησυχίες ότι τα στελέχη MRSA που προέρχονται από ζώα μπορούν πιθανά να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα και να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία των χειριστών κρέατος. Ερευνητές στις Κάτω Χώρες ανέφεραν την απομόνωση ενός κλώνου MRSA που σχετίζεται με χοίρους σε ολλανδικά κρέατα. Αν και ο *S. aureus* θεωρείται γενικά ως ένας παράγοντας που προκαλεί τροφιμογενή δηλητηρίαση εξαιτίας της παραγωγής θερμοανθεκτικών εντεροτοξινών, η παρουσία MRSA σε κρέας μπορεί να ενέχει πιθανή απειλή για τους χειριστές τροφίμων. Οι Kluytmanas και συν. ανέφεραν μια σοβαρή επιδημία από MRSA το 1995, που πιθανότερα ξεκίνησε από κάποιο μολυσμένο τρόφιμο (Shuaihua *et al.*, 2009).

Έχει παρατηρηθεί αύξηση στην κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) ανάμεσα στα στελέχη των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη *S. aureus* σε αρκετές πρόσφατες αναφορές. Αυτή η αλλαγή προκαλεί ανησυχία, επειδή ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι οι ασθενείς με λοιμώξεις που προκαλούνται από MRSA με τιμές MIC για τη βανκομυκίνη στο υψηλότερο όριο του εύρους ευαισθησίας του CLSI και του FDA ανταποκρίνονται λιγότερο στη βανκομυκίνη. Οι κλινικοί πρέπει να εξετάσουν τη χρήση εναλλακτικών θεραπειών για τέτοιους ασθενείς. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν η παρατηρούμενη αλλαγή στην κατανομή των τιμών MIC της βανκομυκίνης για τον MRSA σχετίζεται με παρόμοιες αλλαγές στην κατανομή των τιμών MIC άλλων αντι-MRSA παραγόντων (Patel *et al.*, 2009).

## 1.7 Ανθεκτικός στη βανκομυκίνη *Staphylococcus aureus* (VRSA)

Μετά την εμφάνιση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων τη δεκαετία του 1980, υπήρξε μεγάλη ανησυχία όσον αφορά το ενδεχόμενο για μεγάλες εστίες βανκομυκίνη ανθεκτικών *S. aureus* (VRSA) λόγω της απόκτησης του γονιδίου *vanA* από τους εντερόκοκκους. Πλήρως βανκομυκίνη ανθεκτικά στελέχη *S. aureus* (VRSA), λόγω της απόκτησης του γονιδίου *vanA* από τους εντερόκοκκους, αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στις Η.Π.Α. το 2002. Ωστόσο, σήμερα, μόνο εννέα περιπτώσεις VRSA έχουν αναφερθεί στις Η.Π.Α., με δυο επιπλέον περιπτώσεις, μια από την Ινδία και μια από το Ιράν. Παρόλα αυτά η γενετική της αντοχής δεν έχει επαληθευθεί από δεύτερο εργαστήριο σε αυτές τις περιπτώσεις. Αυτό υποδηλώνει ότι, αν και αυτός ο μηχανισμός αντοχής είναι σημαντικός, δεν εξελίσσεται ή δεν εξαπλώνεται ραγδαία.

Το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI) καθόρισε τα breakpoints ανθεκτικότητας για την MIC και τη διάχυση με δίσκους της βανκομυκίνης έναντι του *S. aureus* εδώ και πάνω από 20 χρόνια. Τα αρχικά breakpoints είχαν ως εξής: ευαίσθητος σε διάλυμα βανκομυκίνης MIC  $\leq 4$   $\mu\text{g}$  ανά ml, μέσης ευαισθησίας σε διάλυμα βανκομυκίνης MIC 8 έως 16  $\mu\text{g}$  ανά ml, και ανθεκτικός σε διάλυμα βανκομυκίνης MIC  $\geq 32$   $\mu\text{g}$  ανά ml. Ακολούθως, το 2006, το CLSI επαναπροσδιόρισε τα breakpoints της βανκομυκίνης ως εξής: ευαίσθητος σε διάλυμα βανκομυκίνης MIC  $\leq 2$   $\mu\text{g}$  ανά ml, μέσης ευαισθησίας σε διάλυμα βανκομυκίνης MIC 4 έως 8  $\mu\text{g}$  ανά ml, και ανθεκτικός σε διάλυμα βανκομυκίνης MIC  $\geq 16$   $\mu\text{g}$  ανά ml. Ως εκ τούτου, ο ισχύων ορισμός για τον VISA είναι ένα στέλεχος *S. aureus* με διάλυμα βανκομυκίνης MIC 4 έως 8  $\mu\text{g}$  ανά ml. Άλλη ορολογία, όπως *S. aureus* με μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη (SA-RVS), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει αυτά τα στελέχη. Η αιτία για την αλλαγή των breakpoints ήταν μια αυξανόμενη συσχέτιση ανάμεσα στην MIC της βανκομυκίνης 4  $\mu\text{g}$  ανά ml και στην αποτυχία θεραπείας με τη βανκομυκίνη και επιπλέον η αυξημένη ανίχνευση ετεροανθεκτικών στελεχών.

Ετερογενής μέσης ευαισθησίας στη βανκομυκίνη *Staphylococcus aureus* (hVISA): Ο ορισμός και η άριστη εργαστηριακή ανίχνευση του hVISA παραμένουν αβέβαια. Ουσιαστικά, ένα στέλεχος hVISA είναι ένα στέλεχος *S. aureus* με MIC βανκομυκίνης μέσα στο εύρος ευαισθησίας, όταν εξετάζεται με μεθόδους ρουτίνας (παλαιότερα

διάλυμα βανκομυκίνης MIC  $\leq 4$   $\mu\text{g}$  ανά ml και σήμερα διάλυμα βανκομυκίνης MIC  $\leq 2$   $\mu\text{g}$  ανά ml), αλλά όπου η αναλογία του πληθυσμού των κυττάρων βρίσκεται στο εύρος μέσης ευαισθησίας στη βανκομυκίνη.

Οι αναφορές για κλινικά στελέχη *S. aureus* που επιδείκνυαν μειωμένη ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη και εμφάνιση in vivo ανθεκτικότητας κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τεϊκοπλανίνη προέρχονταν από την Ευρώπη στις αρχές της δεκαετίας του 1990, αν και αυτά τα στελέχη παρέμεναν ευαίσθητα στη βανκομυκίνη. Το 1997 στελέχη *S. aureus* με μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη ανακοινώθηκαν από την Ιαπωνία. Σε αυτά περιλαμβανόταν ένα στέλεχος με MIC βανκομυκίνης 8  $\mu\text{g}$  ανά ml που απομονώθηκε από μια φλεγμονή χειρουργικού τραύματος από ένα άτομο ηλικίας 4 μηνών που είχε υποβληθεί σε καρδιοχειρουργική επέμβαση, όπου η βανκομυκίνη απέτυχε να θεραπεύσει τη λοίμωξη, και ένα στέλεχος με MIC βανκομυκίνης 4  $\mu\text{g}$  ανά ml που έτρεφε υποπληθυσμούς με μέγιστη MIC σε ποσοστό μεγαλύτερο από 1 σε  $10^6$  κύτταρα (Howden *et al.*, 2010).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* ΚΑΙ *STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE*

### 2.1 Γενικά για τους στρεπτόκοκκους

Τα τελευταία χρόνια η ταξινόμηση των στρεπτόκοκκων και των συγγενών οργανισμών έχει υποστεί εκτεταμένη αναθεώρηση μετά την εισαγωγή μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης. Υπάρχουν, επίσης, κάποιες διαφορές ως προς την ονοματολογία κάποιων στρεπτόκοκκων ανάμεσα στα συστήματα ταυτοποίησης του Ηνωμένου Βασιλείου και των Η.Π.Α. Το όνομα του γένους εντερόκοκκοι, που προτάθηκε αρχικά το 1903 για βακτήρια που προηγουμένως ονομάζονταν *Streptococcus faecalis* και *Streptococcus faecium*, αναθεωρήθηκε το 1984, όταν άλλα βακτήρια μεταφέρθηκαν στο γένος. Προς το παρόν υπάρχουν 18 μέλη του γένους *Enterococcus*. Οι *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium* είναι οι πιο κοινοί εντερόκοκκοι που απομονώνονται από ανθρώπινες λοιμώξεις (NSA, Identification of Streptococcus spp., Enterococcus spp. and morphologically similar organisms, 2007).

Ο ορισμός των περιβαλλοντικών στρεπτοκόκκων ποικίλλει και οι μη β-αιμολυτικοί, καταλάση αρνητικοί, gram θετικοί κόκκοι περιλαμβάνουν διάφορα είδη εσκουλίνη θετικών στρεπτόκοκκων, εντερόκοκκων, λακτόκοκκων και αερόκοκκων. Η σωστή αναγνώριση σε επίπεδο είδους είναι σημαντική για την επιλογή της σωστής θεραπείας, επειδή αυτά τα είδη έχουν διαφορετικές παθογένειες και διαφορετικά προφίλ αντιβιοαντοχής. Επιπλέον, η ακριβής αναγνώριση είναι αναγκαία για την ανάπτυξη και την τροποποίηση των μεθόδων ελέγχου (Pitkälä *et al.*, 2008).

### 2.2 Μορφολογία – Χαρακτηριστικά των στρεπτόκοκκων

Τα είδη του *Streptococcus* ανήκουν στην οικογένεια *Streptococcaceae*, που περιλαμβάνει επίσης και τα είδη *Lactococcus* και *Lactovum*. Ταξινομήθηκαν για πρώτη φορά το 1884 από τον Rosenbach (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Τα στελέχη *Streptococcus spp.* είναι συνήθως σφαιρικοί ή ωοειδείς κόκκοι, ακίνητοι, Gram-θετικοί, με διάμετρο μικρότερη από 2μm και σχηματίζουν αλυσίδες ή ζεύγη, όταν αναπτύσσονται σε υγρά μέσα (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009,

NSA, Identification of Streptococcus spp., Enterococcus spp. and morphologically similar organisms, 2007). Δε σχηματίζουν ενδοσπόρια. Στη φύση είναι δυνητικά αναερόβιοι και μερικά είδη απαιτούν επιπλέον CO<sub>2</sub> για να αναπτυχθούν. Είναι καταλάση αρνητικοί με πολύπλοκες και ποικίλες διατροφικές απαιτήσεις. Η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος είναι χαρακτηριστική των Gram-θετικών βακτηρίων και αποτελείται κυρίως από πεπτιδογλυκάνη στην οποία συνδέονται υδρογονάνθρακες, τειχοϊκό οξύ και πρωτεϊνικά αντιγόνα επιφάνειας. Η πεπτιδογλυκάνη ανήκει στην ομάδα A, με την L-λυσίνη ως το διαμινοξύ στη θέση 3 της πεπτιδικής υποομάδας. Η ποιοτική σύνθεση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος είναι γνωστή για πολλά από τα είδη στρεπτοκόκκων και αυτό αποτελεί τη βάση της κατά Lancefield ορολογικής ομαδοποίησης, στην οποία τα στελέχη ορίζονται με ένα γράμμα της αλφαβήτου ανάλογα με το ποιο αντιγόνο κυτταρικού τοιχώματος κατέχουν. Τα αμινοσάκχαρα γλυκοσαμίδη και μουραμικό οξύ υπάρχουν πάντα, ενώ η γαλακτοσαμίνη υπάρχει κάποιες φορές. Τα συνηθισμένα αναγωγικά σάκχαρα είναι η γλυκόζη, η γαλακτόζη και η ραμνόζη, τα οποία συναντώνται σε ποικίλους συνδυασμούς στα διάφορα είδη. Συνήθης θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37°C, αλλά οι μέγιστες και ελάχιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης ποικίλλουν μεταξύ των ειδών. Οι στρεπτόκοκκοι είναι προαιρετικά αναερόβιοι και κάποια είδη, όπως ο *Streptococcus mutans* και ο *Streptococcus pneumoniae*, απαιτούν την προσθήκη 5% CO<sub>2</sub> για να αναπτυχθούν (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Οι στρεπτόκοκκοι είναι καταλάση αρνητικοί. Οι υδρογονάνθρακες μεταβολίζονται με ζύμωση. Κύριος μεταβολίτης είναι το γαλακτικό οξύ. Οι στρεπτόκοκκοι παράγουν το ένζυμο λευκίνη αμινοπεπτιδάση (LAP), που ονομάζεται επίσης λευκίνη αρυλαμιδάση (NSA, Identification of Streptococcus spp., Enterococcus spp. and morphologically similar organisms, 2007). Είναι χαρακτηριστικά ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη, δεν παράγουν αέριο από τη γλυκόζη στο MRS και εμφανίζουν διάφορες αντιδράσεις ανάπτυξης σε υπόστρωμα που περιέχει 6,5% NaCl και υδrolύνουν την εσκουλίνη παρουσία 40% χολής. Οι αντιδράσεις αυτές, μαζί με την απουσία κινητικότητας και το σχηματισμό αλυσίδων, χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των στρεπτοκόκκων από άλλα είδη προαιρετικά αναερόβιων, καταλάση αρνητικών και Gram θετικών κόκκων (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Η ανάπτυξη σε στερεά μέσα συχνά ενισχύεται με την προσθήκη αίματος, ορού ή γλυκόζης. Οι αποικίες στη γλυκόζη έχουν συνήθως 0,5-1,0mm διάμετρο μετά από 24



ώρες στους 37°C και δεν αναπτύσσεται ή αναπτύσσεται ελάχιστα μετά από παρατεταμένη επώαση. Στην πράξη, όλα τα είδη δεν εμφανίζουν χρώμα, εκτός από ορισμένα στελέχη του *Streptococcus agalactiae*, που μπορεί να έχουν κίτρινο, πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα. Η ανάπτυξη σε υγρά μέσα αυξάνεται με την προσθήκη γλυκόζης, αλλά η γρήγορη πτώση του pH αναστέλλει γρήγορα την ανάπτυξη, εκτός αν το μέσο είναι καλά ρυθμισμένο, όπως στο ζωμό Todd-Hewitt, ή αν το μέσο έχει ελεγχόμενο pH με τη συνεχή προσθήκη αλκάλειος. Πολλοί τύποι αντίδρασης στο αιματούχο άγαρ παράγονται από διάφορους στρεπτόκοκκους. Αυτό είναι ορατό από την επιφανειακή ανάπτυξη σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ. Χρησιμοποιείται αίμα προβάτου ή αλόγου. Η μείωση των σακχάρων μπορεί να αναστείλει την αιμόλυση από τον *Streptococcus pyogenes* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Στο αιματούχο άγαρ τα στελέχη παρουσιάζουν διάφορους βαθμούς αιμόλυσης, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτο βήμα για την ταυτοποίηση των κλινικά απομονωμένων στελεχών. Η αιμόλυση που προκαλείται από τις αποικίες στο αιματούχο άγαρ και η ορολογική ομαδοποίηση κατά Lancefield είναι σημαντικοί παράγοντες ταυτοποίησης.

Οι τύποι αιμόλυσης σε αιματούχο άγαρ είναι οι εξής:

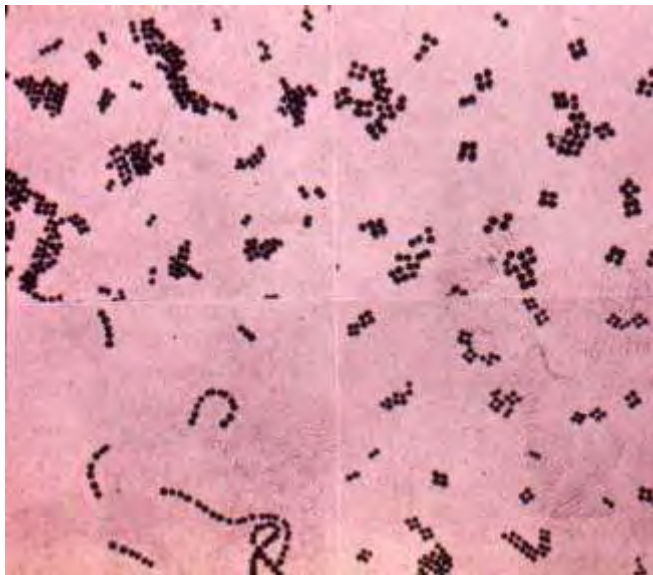
- α-αιμόλυση: μερική λύση των ερυθροκυττάρων που περιβάλουν μια αποικία που προκαλεί πράσινο αποχρωματισμό του υποστρώματος.
- β-αιμόλυση: πλήρης λύση των ερυθροκυττάρων που περιβάλουν μια αποικία που προκαλεί καθαρισμό του αίματος από το υπόστρωμα.
- μη-αιμολυτικοί ή γ-αιμόλυση: καμία αλλαγή χρώματος ή καθαρισμός του υποστρώματος.
- α-prime ή “wide zone α” αιμόλυση: μια μικρή ζώνη άθικτων ερυθροκυττάρων φαίνεται παρακείμενα της αποικίας με μια ζώνη πλήρους αιμόλυσης να περιβάλλει τη ζώνη των άθικτων ερυθροκυττάρων. Ο τύπος αυτός αιμόλυσης μπορεί να συγχυστεί με τη β-αιμόλυση (NSA, Identification of *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. and morphologically similar organisms, 2007).

Η β-αιμόλυση χαρακτηρίζεται από μια ευκρινή ζώνη διαύγειας γύρω από τις αποικίες με το μέγεθος της ζώνης να ποικίλλει από στέλεχος σε στέλεχος. Στην α-αιμόλυση μια ζώνη πρασινωπού αποχρωματισμού εμφανίζεται γύρω από την αποικία, συνήθως 1-

3mm σε πλάτος, και τα περιθώρια είναι δυσδιάκριτα. Ένας τρίτος τύπος αιμόλυσης, η α-prime, έχει επίσης περιγραφεί και μοιάζει με την α-αιμόλυση με έναν εμφανή εξωτερικό δακτύλιο διαύγειας γύρω από τη ζώνη των αποχρωματισμένων (πράσινων) ερυθροκυττάρων. Οι μη-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι (ή γ-αιμόλυση) δεν επηρεάζουν καθόλου το αιματούχο άγαρ (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Τα στελέχη των β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων που απομονώνονται από ανθρώπους υποδιαίρονται σε αυτούς που σχηματίζουν μεγάλες αποικίες και σε εκείνους που σχηματίζουν μικρές αποικίες (διάμετρος < 0,5mm). Ο *Streptococcus pyogenes* (ομάδα A κατά Lancefield), ο *Streptococcus agalactiae* (ομάδα B) και ο *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (ομάδα C, G) ανήκουν σε εκείνους που σχηματίζουν μεγάλες αποικίες (Uh Young et al., 2007).

Το μέγεθος του ολοκληρωμένου στρεπτοκοκκικού γονιδιώματος κυμαίνεται από 1,85 (*Streptococcus pyogenes*) έως 2,21 (*Streptococcus agalactiae*) Mbp. Επίσης, έχουν ολοκληρωθεί τα γενώματα των *Streptococcus mutans* (2,03 Mbp) και *Streptococcus pneumoniae* (2,04-2,16 Mbp) (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).



Μικροσκοπική εμφάνιση  
*Streptococcus* spp. μετά από χρώση  
Gram

Οι στρεπτόκοκκοι απομονώνονται από μεγάλο αριθμό κλινικών δειγμάτων και μπορούν να καλλιεργηθούν στα πιο κοινά σύνθετα άγαρ. Η ενσωμάτωση 5% αφυδατωμένου αίματος ζώου (προβάτου ή αλόγου) στο άγαρ επιτρέπει τον καθορισμό της αιμόλυσης

και οι αιμολυτικές αποικίες μπορούν άμεσα να χρησιμοποιηθούν για ανακαλλιέργεια, αν και η παρουσία τους μπορεί να συγκαλυφθεί αν υπάρχουν μεγάλοι αριθμοί άλλων μικροοργανισμών (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Τα απομονωμένα στελέχη από τις αρχικές καλλιέργειες ταυτοποιούνται από την εμφάνιση των αποικιών, τη χρώση Gram, τη δοκιμή της καταλάσης, την ομαδοποίηση κατά Lancefield και την ευαισθησία στην οπτοχίνη. Περαιτέρω ταυτοποίηση γίνεται με τη χρήση βιοχημικών ή άλλων δοκιμών για τη διάκριση μεταξύ των ειδών. Αν η ομαδοποίηση κατά Lancefield δεν οδηγήσει σε επαρκή ταυτοποίηση για κλινική διαχείριση, πλήρης ταυτοποίηση μπορεί να γίνει με τη χρήση ενός εμπορικού συστήματος ταυτοποίησης, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της δοκιμής ευαισθησίας. Όλες οι δοκιμές πρέπει να εκτελούνται από μη εκλεκτικό άγαρ (NSA, Identification of Streptococcus spp., Enterococcus spp. and morphologically similar organisms, 2007).

Ο ορολογικός προσδιορισμός καθιερώθηκε από τον Lancefield ως ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά στην αναγνώριση των β-αιμολυτικών στρεπτοκόκκων και ο ορολογικός προσδιορισμός των χαρακτηριστικών της ομάδας υδρογονανθρακικών αντιγόνων που υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα των στελεχών έχει παραμείνει μια σημαντική τεχνική αναγνώρισης ρουτίνας. Η αναγνώριση των αντιγόνων επιτυγχάνεται με τη χρήση της δακτυλιοειδούς κατακρήμνισης υπό βροχή σε μικρούς τριχοειδείς σωλήνες, της διπλής διάχυσης σε γέλη, της συγκόλλησης ή του ανοσοφθορισμού. Πρόσφατα τα εμπορικά κιτ ομαδοποίησης στρεπτοκόκκων έχουν γίνει απαραίτητα και χρησιμοποιούνται ευρέως ειδικά σε διαγνώσεις ρουτίνας. Αυτά βασίζονται σε λάτεξ συγκόλλησης, όπου τα σωματίδια του λάτεξ επικαλύπτονται με έναν ειδικό για κάθε ομάδα κατά Lancefield αντιορό και αναμιγνύονται με τα εκχυλισμένα αντιγόνα. Οι θετικές αντιδράσεις είναι ορατές από τη συσσώρευση των σωματιδίων (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Έχει χρησιμοποιηθεί μεγάλος αριθμός δοκιμών για το χαρακτηρισμό των στρεπτοκόκκων και συμπεριλαμβάνουν ζυμώσεις υδρογονανθράκων, παραγωγή ακετυλο-μεθυλο-καρβινόλης (ακετοΐνης) από γλυκόζη στην αντίδραση Voges-Proskauer, παραγωγή αμμωνίας από αργινίνη, υδρόλυση της εσκουλίνης, του ιππουρικού και του αμύλου, παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, ανοχή στο

χλωριούχο νάτριο και τη χολή και σχηματισμός εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη από σουκρόζη. Συμβατικά οι δοκιμές αυτές εκτελούνται σε ζωμό από εκχύλισμα κρέατος ή σε ορό νερού με τα κατάλληλα πρόσθετα. Στις μέρες μας, τα σχήματα αναγνώρισης για τους στρεπτοκόκκους βασίζονται συχνά στο συνδυασμό δοκιμών που είναι σχεδιασμένες να ανιχνεύουν ενζυμικές δραστηριότητες μετά από λίγες ώρες επώασης με τη χρήση χρωμογόνων ή φθορίζοντων υποστρωμάτων και περιλαμβάνουν γλυκοσίδες, αμινογλυκοσίδες και πεπτιδάσες. Έχουν σχεδιαστεί εμπορικά κιτ αναγνώρισης ειδικά για στρεπτόκοκκους και περιλαμβάνουν ενζυμικές δοκιμές, όπως και μορφές ζύμωσης υδρογονανθράκων σε μικρογραφία και άλλες παραδοσιακές βιοχημικές δοκιμές. Η υδρόλυση του ιππουρικού νατρίου γίνεται από πολλά είδη στρεπτόκοκκων, ανάμεσα στα οποία είναι και ο *Streptococcus agalactiae* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

### 2.3 Μορφολογία – Χαρακτηριστικά του *Streptococcus agalactiae*

Ο *Streptococcus agalactiae* είναι Gram θετικός κόκκος (NSA, Identification of Streptococcus spp., Enterococcus spp. and morphologically similar organisms, 2007), ανήκει στην ομάδα Β κατά Lancefield, έχει σφαιρικά ή ωοειδή κύτταρα, με διάμετρο 0,6-1,2  $\mu\text{m}$ , σχηματίζει αλυσίδες συνήθως πολύ μεγάλες και σπάνια με λιγότερα από τέσσερα κύτταρα. Αναπτύσσεται σε αιματούχο άγαρ και προκαλεί διάφορους τύπους αιμόλυσης, κυρίως τυπική β-αιμόλυση, αλλά με στενή ζώνη, α-αιμόλυση με διπλή ζώνη ή δεν προκαλεί αιμόλυση (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Μετά από επώαση 18-24 ώρες στους 35°C-37°C οι αποικίες τείνουν να είναι λίγο μεγαλύτερες από των άλλων στρεπτόκοκκων (ακριβώς 1mm) και έχουν λιγότερο διακριτή ζώνη β-αιμόλυσης. Κάποια στελέχη μπορεί να είναι μη αιμολυτικά (NSA, Identification of Streptococcus spp., Enterococcus spp. and morphologically similar organisms, 2007). Τα στελέχη του *Streptococcus agalactiae* παρουσιάζουν μια περιχαρακωμένη διεύρυνση της ζώνης β-αιμόλυσης όταν, μετά από αναερόβια επώαση στους 37°C για 18 ώρες, μεταφέρονται στους 4°C για 6 ώρες και μετά επωάζονται ξανά αναερόβια στους 37°C (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας Β κατά Lancefield αναπτύσσονται σε υποστρώματα που περιέχουν χολή (NSA, Identification of Streptococcus spp., Enterococcus spp. and morphologically similar

organisms, 2007). Πολλά στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν σε μέσα που περιέχουν 40% χολή. Κάποια στελέχη παράγουν κίτρινη, πορτοκαλί ή κόκκινη χρωστική και η παραγωγή μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη αμύλου ή με αναερόβια επώαση. Παράγουν αέριο από γλυκόζη, μαλτόζη, ριβόζη, σουκρόζη και τρεχαλόζη. Η γλυκερόλη σχηματίζεται μόνο αερόβια. Οξύ δεν παράγεται από ξυλόζη, αραβινόζη, ραφινόζη, ινουλίνη, μανιτόλη ή σορβιτόλη. Τα στελέχη παράγουν αλκαλική φωσφατάση. Η παραγωγή α-γαλακτοσιδάσης και β-γλυκουρονιδάσης δεν είναι σταθερά χαρακτηριστικά. Τα στελέχη υδρολύουν την αργινίνη και το ιππουρικό, αλλά δεν υδρολύουν την εσουλίνη. Τα χαρακτηριστικά πολυσακχαριδικά αντιγόνα της ομάδας B αποτελούνται από τη ραμνόζη, τη N-ακετυλογλυκοσαμίνη και τη γαλακτόζη. Ο *Streptococcus agalactiae* περιλαμβάνει επτά ορότυπους: Ia,Ib,II,III,IV,V και VI, οι οποίοι αναγνωρίζονται με βάση το πολυσακχαριδικό αντιγόνο της κάψας και τα επιφανειακά πρωτεϊνικά αντιγόνα (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

## **2.4 Παθογένεια του *Streptococcus agalactiae***

Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας B προκαλούν ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, όπως επιμολύνσεις τραυμάτων, ενδοκαρδίτιδα και οστεομυελίτιδα. Στις έγκυες γυναίκες οι λοιμώξεις ποικίλλουν, από ήπιες λοιμώξεις του ουροποιητικού και ενδομητρίτιδα έως σηψαιμία και μηνιγγίτιδα. Στα νεογνήτα και τα παιδιά μπορεί να προκαλέσουν σηψαιμία, πνευμονία, μηνιγγίτιδα και πυελονεφρίτιδα (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Ο *Streptococcus agalactiae* (στρεπτόκοκκος της ομάδας B) είναι ο κύριος μικροοργανισμός που προκαλεί μηνιγγίτιδα και σηψαιμία σε βρέφη και, επίσης, σηψαιμία σε μη εγκύους ενήλικες (Murayama *et al.*, 2009). Ο *Streptococcus agalactiae* είναι η πιο κοινή αιτία νεογνικής σηψαιμίας. Η πενικιλίνη χρησιμοποιείται για πρόληψη στον τοκετό, αλλά η ερυθρομυκίνη ή η κλινδαμυκίνη συστήνεται για ασθενείς αλλεργικούς στην πενικιλίνη (Yongwei *et al.*, 2007).

Στα ζώα οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας B αντιπροσωπεύουν ένα παθογόνο του μαστικού αδένος με υψηλή μεταδοτικότητα και οικονομική σημασία. Είναι μια από τις κύριες

αιτίες μαστίτιδας των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων. Πηγές μόλυνσης για τον άνθρωπο είναι ο κολπικός βλεννογόνο, η άνω αναπνευστική οδός, τα ούρα, τα κόπρανα και για τα ζώα το γάλα και οι ιστοί του μαστού (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Ο *Streptococcus agalactiae* αποικίζει και μολύνει ανθρώπους και ζώα. Είναι ένα από τα παθογόνα που συχνά εμπλέκονται στη μαστίτιδα των βοοειδών μαζί με το *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* και το *Streptococcus uberis*. Αυτά τα δυο είδη βρίσκονται στο περιβάλλον των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής και ως τέτοια είναι περισσότερο δύσκολο να εξαλειφθούν από ότι ο *S. agalactiae*. Ανταλλαγές DNA συμβαίνουν πιθανά στις κοινές τους θέσεις και τα ICEs μπορεί να αποτελούν όχημα για αυτές τις μεταφορές. Τα περισσότερα στελέχη *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* και *S. uberis* που είναι ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη μεταφέρουν ένα γονίδιο *ermB*. Τα περισσότερα στελέχη *S. agalactiae* και *S. dysgalactiae* που είναι ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη μεταφέρουν ένα γονίδιο *tet (M)* (Haenni *et al.*, 2010).

Ο *Streptococcus agalactiae* έχει ουσιαστικά εξαλειφθεί από τα κοπάδια στην Ευρώπη, αλλά σε μελέτες που έγιναν στις Η.Π.Α. το 7,7% και το 13,1% των δειγμάτων περιείχαν *Str. agalactiae* (Kalmus *et al.*, 2011).

## 2.5 Μορφολογία – Χαρακτηριστικά του *Streptococcus dysgalactiae*

Ο *Streptococcus dysgalactiae* έχει κοκκοειδή ή ωοειδή κύτταρα σε ζεύγη ή αλυσίδες. Τα στελέχη του προκαλούν α, β ή καθόλου αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι ακριβώς 37°C. Δεν αναπτύσσεται στους 10 °C ή στους 45°C, σε 6,5% NaCl ή σε pH 9,6. Δεν επιβιώνει μετά από θέρμανση στους 60°C για 30 λεπτά. Παράγει οξύ από γλυκόζη, μαλτόζη ριβόζη, άμυλο, σουκρόζη και τρεχαλόζη. Τα περισσότερα στελέχη παράγουν οξύ από γλυκερόλη, όταν επωάζονται αερόβια. Δεν παράγουν οξύ από την αραβινόζη, ινουλίνη, μανιτόλη και ραφινόζη. Η πλειονότητα των στελεχών δεν υδρολύουν το ιππουρικό. Η υδρόλυση της εσκουλίνης δε συμβαίνει πάντα. Τα περισσότερα στελέχη παράγουν υαλουρονιδάση. Η αργινίνη υδρολύεται. Δεν

παράγεται ακετοΐνη, αλκαλική φωσφατάση, α-γαλακτοσιδάση και πυρολιδονική αρυλαμιδάση, αλλά παράγεται λευκίνη αρυλαμιδάση και β-D-γλυκουρονιδάση.

Οικότοποι του *Streptococcus dysgalactiae* είναι η αναπνευστική και η γεννητική οδός διάφορων ζώων και οι μυοσκελετικές λοιμώξεις ανθρώπων και κατοικίδιων ζώων.

Τα διαφορετικά παλαιότερα είδη *Streptococcus dysgalactiae* και *Streptococcus equisimilis* συγχωνεύονται σε ένα μόνο είδος και αντιπροσωπεύονται από τα υποείδη *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* και *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, αντίστοιχα.

Ο *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* διαφέρει ως προς την αιμόλυση (α-αιμόλυση ή καθόλου αιμόλυση) και απομονώνεται κυρίως από βοοειδή. Τα στελέχη μπορεί να αντιδράσουν με τον αντιρό της ομάδας C κατά Lancefield. Δεν υδrolύουν το ιππουρικό.

Ο *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* διαφέρει ως προς τη αιμόλυση. Τα στελέχη είναι β-αιμολυτικά και μπορεί να αντιδράσουν με τον αντιρό των ομάδων A, C, G ή L κατά Lancefield. Η υδρόλυση του ιππουρικού μπορεί να συμβεί. Δεν παράγουν οξύ από τη σορβιτόλη (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

## 2.6 Παθογένεια των στρεπτόκοκκων

Οι στρεπτόκοκκοι σχετίζονται με τα θερμόαιμα ζώα και πτηνά. Κάποια είδη είναι παράσιτα του ανθρώπου και των ζώων και κάποια είναι εξαιρετικά παθογόνα. Πολλά είδη χαρακτηρίζονται ως κοινά και ανευρίσκονται στους βλεννογόνους της στοματικής κοιλότητας, του ανώτερου αναπνευστικού και του γαστρεντερικού συστήματος και κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορεί να προκαλέσουν τοπικές και συστηματικές λοιμώξεις (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Πάνω από 70 είδη στρεπτόκοκκων και εντερόκοκκων εμπλέκονται σε λοιμώξεις ζώων και/ή ανθρώπων. Από αυτά, μόνο λίγα προκαλούν σημαντικές λοιμώξεις στους ανθρώπους (π.χ. *S.*

*pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *viridans* στρεπτόκοκκοι) (Brigante Gg. R. *et al.*, 2007).

Η δράση των στρεπτόκοκκων ως κοινά και ως πιθανά παθογόνα αποδίδεται: α) στην ικανότητα να προσκολλώνται σε οποιαδήποτε επιφάνεια στο φυσικό τους περιβάλλον, β) στην ικανότητα να χρησιμοποιούν γρήγορα τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά υπό κυμαινόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, και γ) στην ικανότητα να ανέχονται, να αντιστέκονται ή ακόμη και να καταστρέφουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Οι πυογόνοι στρεπτόκοκκοι μαζί με τον *Streptococcus pneumoniae* είναι τα μεγαλύτερα παθογόνα. Ο *Streptococcus pyogenes* μπορεί να αποικίσει το λαιμό ή το δέρμα και να προκαλέσει πυογόνες λοιμώξεις και μη πυογόνα επακόλουθα. Τα είδη αυτά είναι η συνηθέστερη αιτία βακτηριακής φαρυγγίτιδας, πυώδους δερματίτιδας και οστρακιάς, όπως και ερυθρίτιδα και άλλων μεταδοτικών λοιμώξεων. Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας A βρέθηκαν υπεύθυνοι για στρεπτοκοκκική νεκρωτική περιτονίτιδα και στρεπτοκοκκικό σύνδρομο τοξικού σοκ. Άλλοι πυογόνοι στρεπτόκοκκοι, συμπεριλαμβανομένου εκείνων της ομάδας C και G κατά Lancefield, είναι ευρέως διαδεδομένοι στα ζώα και στους ανθρώπους, όπου υπάρχουν ως συμβιώτες και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις, όπως σηψαιμία, ενδοκαρδίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, φαρυγγίτιδα, διάμεση ωτίτιδα και κυτταρίτιδα (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας B τύπος III είναι Gram θετικά βακτήρια που προκαλούν σημαντικές λοιμώξεις σε νεογνά, ανοσοκατεσταλμένους ενήλικες και άτομα με υποκείμενες χρόνιες ασθένειες, με αποτέλεσμα τη σοβαρή νοσηρότητα και θνησιμότητα (Maruvada *et al.*, 2009). Οι λοιμώξεις από στρεπτόκοκκους της ομάδας B στα βρέφη ταξινομούνται σε πρώιμης εμφάνισης, που συμβαίνουν στα νεογνά μέσα στην πρώτη εβδομάδα της ζωής τους, και σε καθυστερημένης εμφάνισης, που αναπτύσσονται στα βρέφη ηλικίας πάνω από μιας εβδομάδας, με τις περισσότερες λοιμώξεις να προκύπτουν τους τρεις πρώτους μήνες και εξαιρετικά σπάνια σε μεγαλύτερα βρέφη. Τη δεκαετία του 1970, η νοσηρότητα και η θνησιμότητα από αυτές τις λοιμώξεις ήταν υψηλές. Το 1996, ωστόσο, εκδόθηκαν συστάσεις για την πρόληψη των περιγεννητικών λοιμώξεων από στρεπτόκοκκους της ομάδας B από το Αμερικανικό Κολέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων, από τα Κέντρα για Έλεγχο και Πρόληψη των Ασθενειών και αργότερα από την Αμερικανική Ακαδημία Παιδιατρικής. Ως αποτέλεσμα, οι προσπάθειες



πρόληψης αυξήθηκαν και η επίπτωση των πρώιμων λοιμώξεων μειώθηκε αισθητά. Μια πιο λεπτομερής αναθεωρημένη κατευθυντήρια γραμμή, βασισμένη στις προγεννητικές βακτηριακές καλλιέργειες και τις επιδημιολογικές μελέτες, προτάθηκε το 2002. Πρόσφατα, οι Phares και συν. ανακοίνωσαν μια επιδημιολογική έρευνα επτά χρόνων για τις λοιμώξεις από στρεπτόκοκκους της ομάδας B στις Η.Π.Α. που κατέδειξαν σημαντική πτώση στην επίπτωση των πρώιμων λοιμώξεων στα βρέφη, σε αντίθεση με την αύξηση στις ασθένειες από στρεπτόκοκκους της ομάδας B στους ενήλικες ηλικίας  $\geq 65$  ετών (Murayama *et al.*, 2009).

Οι στρεπτόκοκκοι είναι η δεύτερη σημαντική ομάδα μικροοργανισμών, μετά από τους σταφυλόκοκκους, που είναι υπεύθυνη για τη μαστίτιδα στα πρόβατα. Τα πιο συχνά είδη που ταυτοποιούνται είναι ο *S. agalactiae*, ο *S. uberis* και ο *S. dysgalactiae*, αλλά και άλλα είδη στρεπτοκόκκων, όπως ο *Streptococcus parasanguinis*, εμπλέκονται σε λοιμώξεις των μαστικών αδένων. Ο *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* είναι ο κύριος παράγοντας μαστίτιδας των ιπποειδών, αλλά εμπλέκεται και σε σποραδικές περιπτώσεις μαστίτιδας των βοοειδών και των αιγών (Las Heras *et al.*, 2002). Οι περιβαλλοντικοί στρεπτόκοκκοι, όπως ο *Streptococcus uberis*, έχουν αναδειχθεί ως σημαντικά παθογόνα της μαστίτιδας σε διάφορες περιοχές του κόσμου (Pitkälä *et al.*, 2008).

## 2.7 Ανθεκτικότητα-Ευαισθησία των στρεπτόκοκκων στα αντιβιοτικά

Στο σύνολό τους οι στρεπτόκοκκοι παραμένουν ευαίσθητοι στα περισσότερα αντιβιοτικά, αν και υπάρχουν σημαντικές εξαιρέσεις. Η MIC της πενικιλίνης για την ομάδα A των στρεπτοκόκκων δεν έχει αλλάξει σημαντικά τα τελευταία 70 ή 80 χρόνια, ενώ η αντοχή στα μακρολίδια έχει αυξηθεί στην Ευρώπη. Μεγάλη αιτία ανησυχίας αποτελεί η εμφάνιση και η σταθερή αύξηση της αντοχής στην πενικιλίνη του *Streptococcus pneumoniae* από τα τέλη του 1970 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Αν και οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι που σχηματίζουν μεγάλες αποικίες παραμένουν ευαίσθητοι στις β-λακτάμες, τα μακρολίδια ή οι λινκοσαμίδες συνιστώνται ως εναλλακτικές επιλογές, όταν ενδείκνυται. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι αλλαγές στην ευαισθησία των β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων που

σχηματίζουν μεγάλες αποικίες στην ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη είναι σημαντικές, αν και οι διαφορές στα επίπεδα αντοχής αυτών των παραγόντων υπάρχουν σύμφωνα με γεωγραφικές διακυμάνσεις και ερευνητές (Uh Young *et al.*, 2007). Οι στρεπτόκοκκοι που προκαλούν μαστίτιδα είναι ευαίσθητοι στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, ενώ είναι αξιοσημείωτη η ανθεκτικότητά τους στα μακρολίδια και τις λινκοσαμίδες (Kalmus *et al.*, 2011).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

### 3.1 Ιστορική αναδρομή

Ο Paul Ehrlich ήταν ο πρώτος που διατύπωσε την αρχή της «εκλεκτικής τοξικότητας», με την οποία οριζόταν ότι ένα αντιμικροβιακό φάρμακο είναι ικανό να καταστρέφει ένα μικροοργανισμό χωρίς να επηρεάζει την υγεία του ξενιστή. Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα τα πρώτα αντιμικροβιακά φάρμακα που αναπτύχθηκαν ήταν μικρής δραστηριότητας και πολύ τοξικά για τον ξενιστή. Το 1929 ο Alexander Fleming παρατήρησε ότι η ανάπτυξη αποικιών σταφυλόκοκκου σε πλάκα με άγαρ παρεμποδίζονταν από την παρουσία ενός μύκητα του γένους *Penicillium*, ο οποίος αναπτύχθηκε τυχαία στην καλλιέργεια. Το 1935 ο Domagk διαπίστωσε τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των σουλφοναμιδών, ενώ το 1940 οι Chain και Florey έδειξαν ότι η βενζυλοπενικιλίνη, που παράχθηκε από στελέχη του γένους *Penicillium*, μπορούσε να χρησιμοποιηθεί εναντίον των λοιμώξεων. Την απομόνωση και μαζική παραγωγή βενζυλοπενικιλίνης ακολούθησε μια ραγδαία εκτίναξη στην παραγωγή αντιμικροβιακών φαρμάκων, όπως η στρεπτομυκίνη το 1944, η χλωραμφαινικόλη το 1947, η χλωροτετρακυκλίνη το 1948, οι ημισυνθετικές πενικιλίνες το 1958, οι κεφαλοσπορίνες τη δεκαετία του '60 και οι φθοροκινολόνες τη δεκαετία του '80 (Rang, 1987). Η ανακάλυψη της πενικιλίνης το 1928 ακολουθήθηκε από την ανακάλυψη και την εμπορική παραγωγή πολλών άλλων αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά κατασκευάζονται κατά εκτίμηση σε κλίμακα των 100.000 τόνων το χρόνο παγκοσμίως και η χρήση τους είχε σημαντικές επιπτώσεις στη ζωή των βακτηρίων πάνω στη γη (Nikaido, 2009).

Στα πρώτα αντιμικροβιακά φάρμακα που ανακαλύφθηκαν δόθηκε η ονομασία αντιβιοτικά, όρος που έχει επικρατήσει μέχρι σήμερα, αν και στη σύγχρονη φαρμακολογία συνιστάται ο όρος αντιμικροβιακοί παράγοντες, όπου τα αντιβιοτικά είναι μια κατηγορία τους και συγκεκριμένα αναφέρεται σε εκείνα τα φάρμακα που παράγονται από μικροοργανισμούς, όπως μύκητες και βακτήρια. Στα αντιμικροβιακά συμπεριλαμβάνονται φυσικά (αντιβιοτικά), ημισυνθετικά και συνθετικά φάρμακα που είτε αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών και

ονομάζονται μικροβιοστατικά, είτε τους καταστρέφουν και ονομάζονται μικροβιοκτόνα (Budavari, 1989).

Η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνιατρική πράξη ξεκίνησε μετά το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο. Αποτέλεσε επανάσταση στη θεραπεία πολλών λοιμωδών νοσημάτων των παραγωγικών ζώων, περιορίζοντας την εμφάνιση και εξάπλωση μεταδοτικών νοσημάτων, τα οποία μέχρι τότε προκαλούσαν εκτεταμένες επιζωοτίες (π.χ. φυματίωση, μελιταίος πυρετός). Αρχικά στην κτηνιατρική, η χρήση των αντιβιοτικών γινόταν κυρίως εμπειρικά, αφού ακόμα δεν είχε πραγματοποιηθεί επαρκής αριθμός ελεγχόμενων πειραματικών μελετών που θα καθόριζε με ασφάλεια τη χορηγούμενη δόση των αντιβιοτικών. Χρειάστηκαν περίπου σαράντα με πενήντα χρόνια μέχρις ότου γίνει εφικτός ο σωστός προσδιορισμός της δοσολογίας με βάση τα επιστημονικά ποσοτικά δεδομένα, τη μελέτη της φαρμακοκινητικής, τις φαρμακοδυναμικές παραμέτρους, την *in vitro* ευαισθησία και τα κλινικά δεδομένα της χρήσης των φαρμάκων. Η διαφορά μεταξύ της ιατρικής και της κτηνιατρικής χρήσης των αντιβιοτικών είναι ότι στην κτηνιατρική τα αντιμικροβιακά φάρμακα, εκτός της θεραπευτικής χρήσης, χρησιμοποιούνται τόσο για την πρόληψη των λοιμώξεων στις εκτροφές των παραγωγικών ζώων όσο και ως αυξητικοί παράγοντες για την αύξηση της παραγωγής ζωικών προϊόντων, όπως κρέας, γάλα και αβγά (Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009). Η χρήση των τετρακυκλινών στη θεραπεία της μαστίτιδας μειώθηκε από τις αρχές του 1990 (Pitkälä *et al.*, 2008).

Στην Ιαπωνία οι αντιμικροβιακοί παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν στα παραγωγικά ζώα ως : (1) κτηνιατρικά προϊόντα για τη θεραπεία των ζώων ή μιας ομάδας ζώων που παρουσιάζουν εμφανή κλινική νόσο, και (2) προσθετικά ζωοτροφών για τα αναπτυσσόμενα ζώα με σκοπό τη βελτίωση της φυσιολογικής τους απόδοσης. Η χρήση των αντιβιοτικών ως προσθετικά ζωοτροφών άρχισε τη δεκαετία του 1950 (Harada, Asai, 2010).

### 3.2 Γενικά για τα αντιβιοτικά

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες αποτελούν ένα πολύ σημαντικό κεφάλαιο για τη δημόσια υγεία, καθώς είναι ευρέως διαδεδομένοι και αποτελούν πανάκεια στην καθημερινή ιατρική και κτηνιατρική πράξη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εντοπίζονται παντού στο φυσικό περιβάλλον, αλλά και στα τεχνητά περιβάλλοντα που δημιουργεί ο άνθρωπος, όπως στα τρόφιμα, ιδιαίτερα σε αυτά που έχουν ζωική προέλευση, και στους χώρους παραγωγής και επεξεργασίας τους (Rang, 1987). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι ουσιώδεις για την πρόληψη, τον έλεγχο και τη θεραπεία των βακτηριακών λοιμώξεων στα ζώα και χρησιμοποιούνται ακόμα για την προαγωγή της ανάπτυξης στην κτηνοτροφία σε πολλές χώρες (Harada, Asai, 2010).

Η κύρια λειτουργία των αντιβιοτικών στο φυσικό τους περιβάλλον είναι να αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροβιακών ανταγωνιστών των βακτηρίων που παράγουν τα αντιβιοτικά. Ωστόσο έχουν προταθεί και άλλοι ρόλοι για τα αντιβιοτικά. Κάποια από τα αντιβιοτικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν για σκοπούς σηματοδότησης στις χαμηλές συγκεντρώσεις που πιθανώς συναντιούνται στα περισσότερα φυσικά περιβάλλοντα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια λειτουργία κάποιων αντιβιοτικών μπορεί να είναι η ενδοκυτταρική σηματοδότηση στα φυσικά οικοσυστήματα και να είναι αναστολείς της βακτηριακής ανάπτυξης μόνο στις υψηλές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται για θεραπεία (Martinez, 2009).

Η γεωργική παραγωγικότητα στηρίζεται στη χρήση των αντιβιοτικών για τρεις διαφορετικούς λόγους:

1) Θεραπευτική χρήση για την περιποίηση των μολυσμένων ζώων (διάρροια, πνευμονική φλεγμονή, αποστήματα δέρματος και οργάνων, μαστίτιδα γαλακτοπαραγωγών αγελάδων). Τα ευρέως και στενού φάσματος αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για συστηματική χορήγηση είναι τα ίδια με εκείνα που χρησιμοποιούνται στην ιατρική, αλλά μπορεί να διαφοροποιούνται βάση νόμου μεταξύ των χωρών (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη, αμινογλυκοσίδες, σπεκτινομυκίνη, λινκοσαμίδες, μακρολίδια, νιτροφουράνια, νιτροϊμιδαζόλες, σουλφοναμίδες, συνδυασμοί τριμεθοπρίμης-σουλφοναμίδης, πολυμυξίνη και κινολόνες).

2) Προληπτική χρήση για την αποφυγή της μόλυνσης του κοπαδιού, αν κάποιο ζώο αρχίσει να εμφανίζει συμπτώματα μεταδοτικής ασθένειας. Στις αγελάδες γαλαктоπαραγωγής τα αντιβιοτικά χορηγούνται σε ρουτίνα απευθείας στους μαστούς για τη θεραπεία και την αποφυγή της μαστίτιδας (π.χ. στη θεραπεία ξηρής περιόδου των αγελάδων). Τα ίδια θεραπευτικά αντιβιοτικά χορηγούνται απευθείας στη ζωοτροφή ή στο πόσιμο νερό.

3) Διατροφική χρήση σε υποθεραπευτικό επίπεδο για να διεγείρουν την προαγωγή της ανάπτυξης. Η προσθήκη αντιβιοτικών στις ζωοτροφές σε υποθεραπευτικό επίπεδο είναι ένα αναπόσπαστο μέρος της σύγχρονης κτηνοτροφίας παγκοσμίως. Η εφαρμογή υποθανατηφόρων επιπέδων αντιβιοτικών όπως ασκείται κατά τη χρήση τους και ως αυξητικοί παράγοντες οδηγεί προς την επιλογή και τον εμπλουτισμό ανθεκτικών βακτηρίων.

Συγκεκριμένα στοιχεία έχουν δημοσιευθεί για τη θεραπευτική χρήση των αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα στη Γαλλία το 1989 και περιλαμβάνουν 50.000 κιλά β-λακταμικών αντιβιοτικών, 57.100 κιλά αμινογλυκοσιδών, 99.600 κιλά χλωραμφαινικόλης, 116.800 κιλά τετρακυκλινών, 37.000 κιλά μακρολιδίων, 138.600 κιλά σουλφοναμιδών, 77.200 κιλά νιτροφουρανίων, 3.700 κιλά κινολοξολίνης και 45.300 κιλά νιτροϊμιδαζόλης. Στις Κάτω Χώρες η κτηνιατρική χρήση 300.000 κιλών αντιβιοτικών το 1990 υπολογίστηκε ότι αντιστοιχεί σε 125, 430 και 55 mg/kg το χρόνο για τους χοίρους, τα πουλικά και τα βοοειδή αντίστοιχα. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στη Σουηδία το 1980 (πριν την απαγόρευση των αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες) ήταν 70.700 κιλά δραστικής ουσίας στην ιατρική σε σύγκριση με τα 41.270 κιλά στην κτηνιατρική και την κτηνοτροφία. Βάσει του μεταβολισμού και του σωματικού βάρους, οι άνθρωποι έλαβαν 4,2 φορές περισσότερες αντιβιοτικές ουσίες από τα παραγωγικά ζώα. Η χρήση αντιβακτηριακών (δεν συμπεριλαμβάνονται τα κοκκιδιοστατικά και τα αντιπαρασιτικά) έπεσε μετά από την εφαρμογή της απαγόρευσης σίτισης στα 20.307 κιλά το 1996. Το ποσό των αυξητικών παραγόντων (δραστική ουσία) στη διατροφή των ζώων εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης εκτιμάται ότι είναι 1.520.370 κιλά για το 1982, που αναλύεται σε 67, 187, 115 και 122 mg/kg το χρόνο για τους χοίρους, τα κρεοπαραγωγά ορνίθια, τα μοσχάρια και τα βοοειδή αντίστοιχα. Στις Η.Π.Α. η Εθνική Ακαδημία Επιστημών της Αμερικής εκτίμησε ότι το 1978 παράχθηκαν 6,08 εκατομμύρια κιλά αντιβιοτικών για θεραπεία, ενώ 5,58 εκατομμύρια κιλά ήταν για προσθήκη στις ζωοτροφές. Για την Ε.Ε.

και την Ελβετία αντίστοιχα στοιχεία για το έτος 1997 αναφέρθηκαν ως 5,46 και 5,04 εκατομμύρια κιλά αντίστοιχα (Teuber, 1999).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες χρησιμοποιούνται κάθε χρόνο στα ζώα δεκαεπτά εκατομμύρια λίβρες αντιβιοτικών. Ακριβώς το 90% των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία χορηγούνται ως παράγοντες ανάπτυξης και ως παράγοντες πρόληψης (π.χ. η θεραπεία της ξηρής περιόδου). Πολλά από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στις εκτροφές χορηγούνται από εργάτες που μπορεί να μην είναι εξοικειωμένοι με τις αρχές της θεραπείας με αντιβιοτικά και μπορεί να μην τηρούν τα συνιστώμενα θεραπευτικά σχήματα.

Υπάρχει η ανησυχία ότι τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στα ζώα έχουν δημιουργήσει μια δεξαμενή από ανθεκτικά βακτήρια που μπορούν να μεταδοθούν στους ανθρώπους μέσα από μια ποικιλία προϊόντων τροφίμων. Στην Ευρώπη η αβοπρασίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως προσθετικό στις ζωοτροφές πολλών ειδών ως αυξητικός παράγοντας (Tikofsky *et al.*, 2002).

Το νωπό αίγιο γάλα μπορεί να είναι πιθανή πηγή ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων ζωικής, ανθρώπινης και περιβαλλοντικής προέλευσης. Οι μικροοργανισμοί που μολύνουν το νωπό γάλα μπορεί να προέρχονται από το περιβάλλον της εκτροφής ή από τις αίγες και περιλαμβάνουν τους υπεύθυνους αιτιολογικούς παράγοντες της κλινικής και της υποκλινικής μαστίτιδας.

Η ενδομαστική χορήγηση αντιβιοτικών στις εκτροφές έχει αυξηθεί, αφού αποδείχθηκε αποτελεσματική για τη θεραπεία της υποκλινικής μαστίτιδας κατά την ξηρή περίοδο στα μικρά μηρυκαστικά. Η αποτελεσματικότητα της ενδομαστικής αντιβιοτικής θεραπείας τίθεται σε κίνδυνο από τους σταφυλόκοκκους που σχηματίζουν βιοφίλμ στους μαστούς. Η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών στις εκτροφές γαλακτοπαραγωγής μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή και την εμφάνιση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηριακών στελεχών (Virdis *et al.*, 2010).

Υπάρχει ανάγκη έρευνας για νέους αντιμικροβιακούς παράγοντες, επειδή οι μολυσματικές ασθένειες εξακολουθούν να είναι παγκόσμιο πρόβλημα λόγω της εξέλιξης και της εξάπλωσης των ανθεκτικών στα φάρμακα παθογόνων. Ο ανθεκτικός

στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, που εκτείνονται από ασήμαντες μολύνσεις του δέρματος σε απειλητικές για τη ζωή εν τω βάθει λοιμώξεις, όπως πνευμονία, ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα, μετεγχειρητικές λοιμώξεις, σηψαιμία και σύνδρομο τοξικού σοκ. Ο μεγάλος επιπολασμός των στελεχών του MRSA σε όλο τον κόσμο τον καθιστά σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας, αφού αυτό το Gram-θετικό παθογόνο έχει γίνει πολυανθεκτικό.

Τα φυσικά προϊόντα παραμένουν η πιο σημαντική πηγή νέων και πιθανών φαρμακευτικών μορίων. Οι μύκητες αποτελούν μια ποικιλόμορφη και πολύτιμη πηγή για την ανακάλυψη νέων ωφέλιμων φυσικών προϊόντων. Οι χημικές δυνατότητες των μυκήτων είναι τεράστιες και πρέπει να επινοηθούν νέες προσεγγίσεις για αποτελεσματική πρόσβαση στη χημική ποικιλομορφία για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Η συνεχής ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων είναι σημαντική για να ξεπεραστούν οι δυσκολίες που σχετίζονται με τη θεραπεία των λοιμώξεων που οφείλονται σε ανθεκτικά βακτηριακά παθογόνα και οι ενδοφυτικοί μύκητες αναδύονται ως εναλλακτική πηγή για την παραγωγή νέων αντιμικροβιακών ενώσεων. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την έρευνα σχετικά με τους ενδοφυτικούς μύκητες που παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες (Arivudainambi *et al.*, 2010).

### **3.3 Κατηγορίες αντιβιοτικών**

#### **3.3.1 Μικροβιοστατικά και μικροβιοκτόνα φάρμακα**

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα που αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών λέγονται μικροβιοστατικά και τέτοια είναι:

- οι σουλφοναμίδες
- οι σουλφοναμίδες σε συνδυασμό με τριμεθοπρίμη
- οι τετρακυκλίνες
- τα μακρολίδια
- η χλωραμφαινικόλη
- η νοβοβιοσίνη
- η τιαμουλίνη



ενώ αυτά που καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς ονομάζονται μικροβιοκτόνα και τέτοια είναι:

- οι πενικιλίνες
- οι κεφαλοσπορίνες
- οι αμινογλυκοσίδες
- η κολιστίνη
- η βακιτρακίνη.

Σημειώνεται ότι αυτή η διάκριση γίνεται μόνο κατά προσέγγιση, καθώς η δράση του φαρμάκου είναι άμεσα συνυφασμένη με τη συγκέντρωσή του, καθώς και από το είδος του μικροοργανισμού εναντίον του οποίου χρησιμοποιείται. Φάρμακα, όπως η βενζυλοπενικιλίνη, η λινκομυκίνη ή η τιαμουλίνη σε μικρές συγκεντρώσεις είναι μικροβιοστατικά και σε μεγάλες είναι μικροβιοκτόνα.

### **3.3.2 Αντιμικροβιακό φάσμα**

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα ανάλογα με το φάσμα τους μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες:

- Στενού φάσματος: πρόκειται για εκείνα τα αντιμικροβιακά φάρμακα που αναστέλλουν είτε βακτήρια θετικά κατά Gram, είτε βακτήρια αρνητικά κατά Gram.
- Ευρέος φάσματος: πρόκειται για εκείνα τα αντιμικροβιακά φάρμακα που αναστέλλουν τόσο τα θετικά, όσο και τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια.

### **3.3.3 Κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων**

#### **1. Σουλφοναμίδες**

Οι σουλφοναμίδες είναι συνθετικά φάρμακα, παράγωγα της σουλφανιλαμίδης, είναι ευρέος φάσματος και ευρείας χρήσης, λόγω του χαμηλού τους κόστους. Οι σημαντικότερες είναι η σουλφαθειαζόλη, η σουλφαδιμιδίνη, η σουλφαμεραζίνη και η

σουλφαδιαζίνη. Οι σουλφοναμίδες ανταγωνίζονται το π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η σύνθεση του φολικού οξέος, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ευαίσθητων βακτηρίων.

## **2. Διαμινοπυριμιδίνες**

Οι διαμινοπυριμιδίνες είναι ευρέος φάσματος συνθετικά αντιμικροβιακά φάρμακα, που χρησιμοποιούνται σχεδόν πάντα σε συνδυασμό με σουλφοναμίδες και σημαντικότερες είναι οι τριμεθοπρίμη, η πυριμεθαμένη και η βακιλοπρίμη. Βασικός τρόπος δράσης τους είναι η αναστολή της μετατροπής του διυδροφολικού οξέος σε τετραϋδροφολικό οξύ, το οποίο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των αμινοξέων πουρίνης και θειαμίνης και τη σύνθεση του DNA των ευαίσθητων βακτηρίων.

## **3. Πενικιλίνες**

Οι πενικιλίνες, ανάλογα με το αντιμικροβιακό τους φάσμα διακρίνονται σε:

α) Πενικιλίνες στενού φάσματος, οι οποίες έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό ότι αδρανοποιούνται από τις β-λακταμάσες (πενικιλινάσες). Σημαντικότεροι αντιπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η βενζυλοπενικιλίνη και η προκαϊνούχος πενικιλίνη και δρουν έναντι Gram θετικών βακτηρίων.

β) Πενικιλίνες στενού φάσματος ανθεκτικές στις β-λακταμάσες, με σημαντικότερους εκπροσώπους την κλοξακιλλίνη και την οξακιλλίνη. Η διαφορά τους έναντι των πενικιλινών της προηγούμενης κατηγορίας είναι ότι αυτές είναι δραστικές και έναντι σταφυλόκοκκων που παράγουν β-λακταμάσες.

γ) Πενικιλίνες ευρέος φάσματος ευαίσθητες στις β-λακταμάσες, οι οποίες είναι δραστικές έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, τα οποία όμως δεν έχουν τη δυνατότητα να παράγουν β-λακταμάσες. Πενικιλίνες αυτής της κατηγορίας είναι η αμικιλίνη και η αμοξυκιλλίνη.

δ) Πενικιλίνες ευρέος φάσματος νεότερης γενιάς ευαίσθητες στις β-λακταμάσες, όπως η καρβενικιλίνη και η τικαρκιλίνη, οι οποίες χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση των πρωτέων και των ψευδομονάδων.

Σε όποια από τις προαναφερόμενες κατηγορίες και αν ανήκουν οι πενικιλίνες, ο τρόπος δράσης τους είναι κοινός και έγκειται στην αναστολή της βιοσύνθεσης των βλεννοπρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος των ευαίσθητων βακτηρίων.

#### 4. Κεφαλοσπορίνες

Πρόκειται για συγγενείς ουσίες με τις πενικιλίνες και σε όλα τα εγχειρίδια Φαρμακολογίας κατατάσσονται σε μία κοινή κατηγορία υπό τον όρο β-Λακτάμες, ενώ παρουσιάζουν και παρόμοιο τρόπο δράσης με τις πενικιλίνες. Είναι ημισυνθετικά αντιμικροβιακά φάρμακα, παράγωγα της κεφαλοσπορίνης C, μια ουσία που βρέθηκε στο *Cephalosporium acremonium*. Με βάση την ανθεκτικότητά τους στις β-λακταμάσες (στην προκειμένη περίπτωση κεφαλοσπορινάσες) των Gram αρνητικών βακτηρίων διακρίνονται σε τέσσερις ομάδες ή γενεές:

- I. Κεφαλοσπορίνες πρώτης γενεάς. Τέτοιες είναι η κεφαλεξίνη, η κεφαδροξίλη, ενώ όλοι οι εκπρόσωποι της ομάδας είναι ευαίσθητες στις κεφαλοσπορινάσες.
- II. Κεφαλοσπορίνες δεύτερης γενεάς, όπως είναι η κεφουροξίμη, και οι οποίες είναι ανθεκτικές στις κεφαλοσπορινάσες.
- III. Κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς, οι οποίες είναι επίσης ανθεκτικές στις β-λακταμάσες και τέτοιες είναι η κεφτιοφούρη, η κεφκινόμη και η κεφοπεραζόνη.
- IV. Κεφαλοσπορίνες τέταρτης γενεάς, όπως η κεφεπίμη και η κεφπιρόμη, οι οποίες είναι ανθεκτικές στις β-λακταμάσες.

#### 5. Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες είναι ευρέως φάσματος βακτηριοστατικά αντιμικροβιακά φάρμακα, με κυριότερους εκπροσώπους την τετρακυκλίνη, την οξυτετρακυκλίνη, τη χλωροτετρακυκλίνη, τη μετακυκλίνη και τη δοξυκυκλίνη. Ανάλογα με τη διάρκεια δράσης τους διακρίνονται σε βραχείας διάρκειας (τετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη και χλωροτετρακυκλίνη), σε μέσης διάρκειας (μετακυκλίνη) και μακράς διάρκειας (δοξυκυκλίνη). Οι τετρακυκλίνες χρησιμοποιούνται ευρέως από το 1940, οπότε και ανακαλύφθηκαν, έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, χλαμυδίων, μυκοπλασμάτων, ρικετσιών και πρωτοζωικών παρασίτων. Η μεγάλη αντιμικροβιακή τους δράση σε συνδυασμό με την έλλειψη σοβαρών παρενεργειών οδήγησε στην εκτεταμένη χρήση τους τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα.

Κύριος μηχανισμός δράσης τους είναι η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης με τη σύνδεσή τους στη θέση της υπομονάδας 30S του ριβοσώματος των ευαίσθητων βακτηρίων.

## **6. Αμινογλυκοσίδες**

Οι αμινογλυκοσίδες, των οποίων ο τρόπος δράσης δε διαφέρει από αυτό των τετρακυκλινών, διακρίνονται σε αμινογλυκοσίδες στενού φάσματος και τέτοιες είναι η στρεπτομυκίνη και η διυδροστρεπτομυκίνη και σε ευρέος φάσματος, όπως είναι η νεομυκίνη, η γενταμυκίνη, η σπεκτινομυκίνη, η απραμυκίνη, κ.ά. (Adams, 1995). Πριν το 1990 η στρεπτομυκίνη χρησιμοποιούνταν ευρέως για τη θεραπεία πολλών ασθενειών των ζώων. Η αντοχή στη στρεπτομυκίνη μπορεί να οφείλεται σε έναν εδραιωμένο μηχανισμό αντοχής που συνδέεται γενετικά με άλλα ωφέλιμα γονίδια σε ένα integron ή που επιλέγονται από άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες αξιοποιώντας τον ίδιο μηχανισμό αντοχής (Ray *et al.*, 2006).

## **7. Μακρολίδια**

Τα μακρολίδια είναι δραστικά κυρίως κατά των Gram θετικών βακτηρίων και λιγότερο κατά των Gram αρνητικών, ενώ χρησιμοποιούνται και στην καταπολέμηση των μυκοπλασμάτων. Κύριοι εκπρόσωποι είναι η ερυθρομυκίνη, η τυλοσίνη, η τιλμικοσίνη και η σπραμυκίνη. Οι συγκεκριμένοι αντιμικροβιακοί παράγοντες αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση με τη σύνδεσή τους στη θέση της υπομονάδας 50S του ριβοσώματος των ευαίσθητων βακτηρίων.

## **8. Λινκοσαμίδες**

Οι λινκοσαμίδες, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στην περιοχή της λοίμωξης και το μικροοργανισμό που εμπλέκεται, άλλοτε δρουν ως μικροβιοστατικά και άλλοτε ως μικροβιοκτόνα αντιμικροβιακά φάρμακα. Δύο ουσίες ανήκουν σε αυτή την ομάδα και είναι η λινκομυκίνη και η κλινδαμυκίνη, οι οποίες χρησιμοποιούνται έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων και μυκοπλασμάτων. Οι λινκοσαμίδες λειτουργούν όπως ακριβώς και τα μακρολίδια.

## **9. Πολυμυξίνες**

Πρόκειται για μικροβιοκτόνα αντιμικροβιακά φάρμακα, με αντιμικροβιακό φάσμα κυρίως ως προς τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και λιγότερο τα θετικά. Στην ομάδα

ανήκουν η πυλυμυξίνη A, B, C και D, καθώς και η κολιστίνη ή πολυμυξίνη E. Οι πολυμυξίνες αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των ευαίσθητων βακτηρίων με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η λειτουργία τους.

### **10. Ριφαμυκίνες**

Είναι γνωστές και ως ανσαμυκίνες ή και ριφομυκίνες. Λειτουργούν ως μικροβιοστατικά ή ως μικροβιοκτόνα αντιμικροβιακά φάρμακα, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και το μικροοργανισμό που καλούνται να αντιμετωπίσουν κάθε φορά. Εδώ ανήκουν η ριφαμυκίνη, η ριφαμπικίνη και η ριφαξιμίνη και κατατάσσονται στα ευρέος φάσματος αντιμικροβιακά φάρμακα. Οι ριφαμυκίνες παρεμβαίνουν στη σύνθεση του RNA των ευαίσθητων βακτηρίων αναστέλλοντας την ενέργεια της RNA-πολυμεράσης.

### **11. Κινολόνες**

Οι κινολόνες είναι ευρέος φάσματος συνθετικά μικροβιοκτόνα αντιμικροβιακά φάρμακα. Στην ομάδα ανήκουν το οξολινικό οξύ, η ενροφλοξασίνη, η σιπροφλοξασίνη, το ναλιδιξικό οξύ, κ.ά. (Adams, 1995). Το ναλιδιξικό οξύ είναι ο αντιμικροβιακός παράγοντας από τον οποίο προήλθαν οι φλουοροκινολόνες. Το ναλιδιξικό οξύ δε χρησιμοποιείται στη θεραπεία λοιμώξεων των ζώων, αλλά χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει την αντοχή στις φλουοροκινολόνες (Ray *et al.*, 2006). Δρουν παρεμβαίνοντας στη σύνθεση του DNA των ευαίσθητων βακτηρίων αναστέλλοντας την ενέργεια της DNA-γυράσης.

### **12. Νιτροϊμιδαζόλες**

Είναι ευρέος φάσματος μικροβιοκτόνα αντιμικροβιακά φάρμακα που δρουν και έναντι των πρωτοζώων. Συμπεριλαμβάνουν τη μετρονιδαζόλη, τη διμετριδαζόλη και άλλες ιμιδαζόλες. Λειτουργούν προκαλώντας θραύση στο DNA των ευαίσθητων βακτηρίων.

### **13. Διάφορα άλλα αντιμικροβιακά φάρμακα**

Σε αυτή την κατηγορία κατατάσσονται αντιμικροβιακοί παράγοντες που δεν ανήκουν σε κάποια από τις προαναφερόμενες ομάδες. Τέτοιοι είναι οι :

- Βακιτρακίνη: παρουσιάζει παρόμοιο αντιμικροβιακό φάσμα με τη βενζυλοπενικιλίνη και δρα αναστέλλοντας τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των ευαίσθητων βακτηρίων.
- Νοβοβιοσίνη: πρόκειται για ένα ευρέος φάσματος αντιμικροβιακό φάρμακο, το οποίο συνδέεται με τα ιόντα μαγνησίου που είναι απαραίτητα για τη σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος των ευαίσθητων βακτηρίων και προκαλεί καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ μπορεί να παρεμβαίνει στη σύνθεση του DNA αναστέλλοντας την ενέργεια της DNA-γυράσης.
- Χλωραμφαινικόλη: είναι ένα ευρέος φάσματος αντιμικροβιακό φάρμακο, το οποίο αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση με τη σύνδεσή του στη θέση της υπομονάδας 50S του ριβοσώματος των ευαίσθητων βακτηρίων (Adams, 1995).

### 3.4 Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών

Τα μοντέλα δράσης των αντιβιοτικών ποικίλλουν ανάλογα με τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών περιλαμβάνουν την αναστολή της σύνθεσης των πρωτεϊνών, την αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων και την επιλεκτική διατάραξη του βακτηριακού μεταβολισμού (Cao Shanping *et al.*, 2011). Προκειμένου να γίνει αντιληπτή η διαδικασία εμφάνισης ανθεκτικότητας σε ένα βακτηριακό στέλεχος είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αναφερθούν συνοπτικά οι τρόποι δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Έτσι, η χορηγούμενη χημική ουσία μπορεί να στοχεύει:

1. Τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, είτε καταστρέφοντάς το άμεσα μέσω ενζύμων, είτε αναστέλλοντας τη δράση ενζύμων.
2. Τη σύνθεση των πρωτεϊνών.
3. Το μεταβολισμό του DNA, είτε καταστρέφοντας απευθείας το DNA, είτε αναστέλλοντας τη δράση ενζύμων (Schwarz *et al.*, 2001).

Οι β-λακτάμες είναι από τα πιο σημαντικά κλινικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά για τη θεραπεία της μαστίτιδας. Ο τρόπος δράσης τους εναντίον των Gram-θετικών βακτηρίων, όπως ο *Staphylococcus aureus*, είναι μέσω αλληλεπίδρασης με τρεις μεγάλου μοριακού βάρους και μια μικρού μοριακού βάρους συνδετικές πρωτεΐνες

της πενικιλλίνης. Οι συγκεκριμένες δράσεις αυτών των συνδετικών πρωτεϊνών της πενικιλλίνης δεν είναι ξεκάθαρες, αλλά φαίνεται να παίζουν ρόλο στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος και στην ανάπτυξη του κυττάρου (Tikofsky *et al.*, 2002).

Μηχανισμός δράσης της βανκομυκίνης: Μετά την εμφάνιση της αντοχής στη μεθικιλλίνη του *S. aureus* τη δεκαετία του 1960, τα γλυκοπεπτιδία, ειδικά η βανκομυκίνη, έγιναν ο στυλοβάτης της θεραπείας για σοβαρές λοιμώξεις από MRSA. Η βανκομυκίνη ανακαλύφθηκε από την Elli Lilly τη δεκαετία του 1950, όταν ένας ιεραπόστολος που επισκεπτόταν το Βόρνεο έστειλε ένα δείγμα χρώματος σε ένα συνάδελφο, ο οποίος απομόνωσε τον οργανισμό *Amycolatopsis orientalis* (που ονομαζόταν προηγουμένως *Streptomyces orientalis* και *Nocardia orientalis*), που βρέθηκε ότι παράγει μια ουσία που αναστέλλει τους Gram θετικούς οργανισμούς. Η «λάσπη του Μισισιπί», όπως ήταν γνωστή εξαιτίας του καφέ της χρώματος, χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές δοκιμές στα μέσα της δεκαετίας του 1950 και εγκρίθηκε η χρήση της από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. το 1958.

Η βανκομυκίνη είναι αναστολέας της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus* και άλλων Gram θετικών οργανισμών. Ενώ τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος με το να συνδέονται με το ενεργό κέντρο της τρανσπεπτιδάσης των δεσμευτικών πρωτεϊνών της πενικιλλίνης, η βανκομυκίνη δρα με ένα εντελώς διαφορετικό μηχανισμό. Δεσμεύεται στο C-άκρο D-Ala-D-Ala κατάλοιπο της πρόδρομης πεπτιδογλυκάνης και σχηματίζει ένα σταθερό, ετεροπολικό σύμπλοκο, το οποίο εμποδίζει τη χρήση του προδρόμου στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Η βανκομυκίνη αναστέλλει το τελικό στάδιο σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης και δρα έξω από την κυτοπλασματική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική συσσώρευση των συνδεδεμένων UDP MurNAc-πενταπεπτιδίων πρόδρομων ουσιών. Το σύμπλοκο της βανκομυκίνης περιλαμβάνει ένα αριθμό δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στο πεπτιδικό συστατικό της βανκομυκίνης και το κατάλοιπο D-Ala-D-Ala. Οποιαδήποτε διαδικασία επεμβαίνει στη σύνδεση της βανκομυκίνης με τα κατάλοιπα D-Ala-D-Ala στο κυτταρικό τοίχωμα μειώνει τη δραστηριότητα του φαρμάκου. Η κύρια τοποθεσία σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος στον *S. aureus* είναι το διάφραγμα διαίρεσης και όχι ολόκληρη η κυτταρική μεμβράνη (Howden *et al.*, 2010).

### 3.5 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

#### 3.5.1 Γενικά

Από τη δεκαετία του '40 και μετά η παραγωγική διαδικασία των φαρμακευτικών βιομηχανιών οδήγησε σε έναν τεράστιο όγκο αντιμικροβιακών παραγόντων, των οποίων τα θεαματικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση λοιμώξεων που παλαιότερα δημιουργούσαν σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των ανθρώπων οδήγησε στην αλόγιστη χρήση τους. Στην παγκόσμια κοινότητα ρίζωσε η αντίληψη ότι όποιο πρόβλημα υγείας και να υπάρχει αντιμετωπίζεται εύκολα με κάποιο αντιβιοτικό. Έτσι, ανεπαρκείς γιατροί που αναζητούσαν την εύκολη και γρήγορη αντιμετώπιση του ασθενή τους, αλλά και απλοί πολίτες που υποκαθιστούσαν τους γιατρούς χρησιμοποιώντας για οποιοδήποτε λόγο αυτά τα φάρμακα. Γρήγορα, όμως, τα φάρμακα αυτά κρίνονταν ανεπαρκή, καθώς οι μικροοργανισμοί με τον καιρό έδειχναν να μην επηρεάζονται. Τότε νέα αντιμικροβιακά έκαναν την εμφάνισή τους και έκτοτε εξελίσσεται ένας αγώνας μεταξύ μικροοργανισμών και φαρμάκων (Ungermach, 2000).

Η χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση, την επικράτηση και τη διάδοση της αντιβιοαντοχής στα βακτήρια. Η επίδραση στην υγεία του ανθρώπου προκαλεί ανησυχία από τότε που οι Swann και συν. ανέφεραν ότι τα βακτήρια με αντοχή στα αντιβιοτικά, που προκύπτουν από τη χρήση κτηνιατρικών αντιμικροβιακών παραγόντων, μεταφέρθηκαν στους ανθρώπους μέσω των κτηνοτροφικών προϊόντων και μείωσαν την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών φαρμάκων στους ανθρώπους. Η ανάπτυξη της αντιβιοαντοχής σε βακτήρια ζωικής προέλευσης μειώνει την αποτελεσματικότητα των κτηνιατρικών αντιμικροβιακών φαρμάκων. Οι τάσεις της αντιβιοαντοχής στα βακτήρια σχετίζονται στενά με τη χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων στην κτηνιατρική. Στην πραγματικότητα, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που συμμετέχουν στη συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση των αντιμικροβιακών και την παρουσία της αντιβιοαντοχής. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση, την επικράτηση και τη διάδοση της αντοχής πρέπει να αναγνωριστούν σε κάθε χώρα για να ληφθούν κατάλληλες δράσεις για να περιοριστεί η εμφάνιση, η



επικράτηση και η διάδοση της αντιβιοαντοχής και να βελτιωθεί η υγεία των ζώων και των ανθρώπων.

Η χρήση της χλωραμφαινικόλης στα παραγωγικά ζώα απαγορεύτηκε στην Ιαπωνία το 1998. Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η αντοχή στην χλωραμφαινικόλη εξακολουθεί να υπάρχει στους χοίρους (μέσος όρος 20,2%), στις όρνιθες (12,3%) και στα βοοειδή (3,2%) (Harada, Asai, 2010). Σε έρευνα που έγινε στη Φιλανδία βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση νιτροφουραντοΐνης και την αντοχή στη νιτροφουραντοΐνη, στη χρήση της κεφαλοσπορίνης και την αντοχή στη νιτροφουραντοΐνη, στη χρήση της αμοξικιλίνης και την αντοχή στη φλουοροκινολόνη και αντίστροφα στη χρήση της φλουοροκινολόνης και την αντοχή στην αμπικιλίνη. Είναι ενδιαφέρον ότι δεν υπήρχε καμία συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση φλουοροκινολόνης και την αντοχή στη φλουοροκινολόνη, αξιολογώντας είτε τη συγκεντρωτική χρήση όλων των φλουοροκινολονών είτε τη χρήση ξεχωριστών παραγόντων (Bergman *et al.*, 2009).

Τα τελευταία 60 χρόνια η αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία είναι ο στυλοβάτης της ιατρικής παρέμβασης έναντι των λοιμωδών νόσων που προκαλούνται από βακτηριακά παθογόνα. Η συνεχής μείωση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας ως συνέπεια της εκτεταμένης χρήσης της αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας έχει προβλεφθεί εδώ και καιρό και φαίνεται να είναι αναπόφευκτη. Πολλές προσπάθειες επιτήρησης έχουν πραγματοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες (1997-2007) με ιδιαίτερη προσοχή σε αυτό το φαινόμενο. Ταυτόχρονα, η κάποτε άφθονη παροχή νέων και βελτιωμένων αντιμικροβιακών ουσιών έχει μειωθεί, καθώς η ανάπτυξη φαρμάκων γίνεται ολοένα και πιο δύσκολη και οι φαρμακευτικές εταιρείες επενδύουν σε πιο κερδοφόρες αγορές. Για το λόγο αυτό είναι κρίσιμο να συνειδητοποιηθεί ότι η αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών φαρμάκων, ευρέως αποδεκτή ως κοινό αγαθό, δεν μπορεί να θεωρείται δεδομένη και ότι αυτές οι ουσίες αποκτούν ολοένα και περισσότερο την κατάσταση των μη ανανεώσιμων πόρων. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η κατανάλωση αντιμικροβιακών φαρμάκων είναι σημαντική για τη διάδοση της αντιβιοαντοχής. Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψη συμπληρωματικοί ή εναλλακτικοί παράγοντες (Van de Sande-Bruinsma *et al.*, 2008).

Η ενδογενής ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά θεωρείται κυρίως σα μια εξελικτική διαδικασία που καθοδηγείται από την πίεση επιλογής των αντιβιοτικών: τα βακτήρια προκαλούνται από τα αντιβιοτικά και αναπτύσσουν αντίσταση ως αποτέλεσμα μετάλλαξης ή οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Αντίθετα με την ενδογενή ανθεκτικότητα που έχει αναπτυχθεί στους βακτηριακούς πληθυσμούς πριν τη χρήση των αντιμικροβιακών από τους ανθρώπους, η επίκτητη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι ένα πρόσφατο γεγονός στην εξέλιξη των ανθρώπινων παθογόνων στην οποία η κύρια δύναμη επιλογής είναι η χρήση αντιβιοτικών από τους ανθρώπους. Κάποια γονίδια αντιβιοαντοχής είναι δύσκολο να εξαλειφθούν ακόμη και απουσία της πίεσης επιλογής από τα αντιβιοτικά και έτσι παραμένουν στο περιβάλλον τροποποιώντας το γενετικό ρεπερτόριο και τελικά τη δυναμική των πληθυσμών των περιβαλλοντικών μικροοργανισμών (Martinez, 2009).

Η ανακάλυψη, η εφεύρεση και η παγκόσμια χρήση των αντιβιοτικών και των αντιμικροβιακών παραγόντων στην ιατρική και στην κτηνιατρική, τη γεωργοκτηνοτροφία και τις υδατοκαλλιέργειες έχουν ξεκινήσει ένα «Δαρβινικού» τύπου πείραμα σχετικά με την επιβίωση των ανθεκτικών μικροοργανισμών σε συνδυασμό με την εξάλειψη των ευαίσθητων σε ένα περιβάλλον που περιέχει αντιβιοτικά. Πενήντα χρόνια αυξανόμενης εφαρμογής αντιμικροβιακών παραγόντων έχουν δημιουργήσει μια κατάσταση που οδηγεί σε οικολογική ανισορροπία: στον εμπλουτισμό πολυανθεκτικών βακτηρίων, τόσο παθογόνων όσο και συμβιωτικών, στους ανθρώπινους και τους ζωικούς βιότοπους.

Αν και υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η αθέμιτη ανάπτυξη μιας ανθεκτικής στα αντιβιοτικά ανθρώπινης μικροχλωρίδας στα νοσοκομεία οφείλεται κυρίως στη χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων από τους ιατρούς, ο ρόλος της εφαρμογής της μισής περίπου παγκόσμιας παραγωγής αντιβιοτικών στη γεωργοκτηνοτροφία στην εξέλιξη της αντοχής και στην εξάπλωσή της παραμένει να προσδιοριστεί. Ο όρος εξάπλωση έχει πολλές διαστάσεις, επίσης, στο γεωργικό πλαίσιο: α) μετατόπιση του γονιδίου της ανθεκτικότητας από ένα μέρος του βακτηριακού γενώματος (πλασμίδιο ή χρωμόσωμα) σε ένα άλλο, β) οριζόντια εξάπλωση των γονιδίων της ανθεκτικότητας από ένα μεμονωμένο βακτήριο σε ένα άλλο του ίδιου είδους ή εκτός συνόρων είδους και γένους, π.χ. με σύζευξη, γ) εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηρίων από ζώο σε ζώο και από τα ζώα στο περιβάλλον (π.χ. σε φυτά και στο νερό μέσω της κοπριάς), δ) εξάπλωση

από τα ζώα στον άνθρωπο με άμεση επαφή ή μέσω των τροφίμων, ε) παγκόσμια εξάπλωση μέσω των εισαγωγών/εξαγωγών ζώντων ζώων και προϊόντων, στ) εξάπλωση των βακτηρίων με αντιβιοαντοχή στις εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης κατά τις μεταδόσεις της κοινότητας, π.χ. με την τροφή, τα οικόσιτα ζώα ή με επαφή ατόμου με άτομο (Teuber, 1999).

Από τις ιδέες ως την ανάπτυξη της αντιβιοαντοχής μπορούμε να προβλέψουμε ότι τα βακτήρια που ζουν σε ένα βιότοπο υπό συνεχή πίεση από τα αντιβιοτικά θα εμφανίσουν υψηλό βαθμό αντοχής έναντι των χορηγούμενων ουσιών. Από την άλλη, τα βακτήρια που προέρχονται από περιβάλλοντα με χαμηλό επίπεδο αντιβιοτικών πρέπει να είναι περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά. Αν εισαχθεί ένα καινούργιο αντιβιοτικό για θεραπευτική ή διατροφική χρήση, πρέπει να εμφανιστεί αντοχή. Τέτοιες επιδράσεις έχουν παρατηρηθεί σε κοινά τροφιμογενή παθογόνα.

Τα γονίδια της αντοχής και οι μοριακοί μηχανισμοί μεταφοράς έχει αποδειχθεί ότι είναι οι ίδιοι στα βακτήρια που προέρχονται από τρόφιμα και από παθογόνα (από ζώα και από ανθρώπους) δείγματα.

Η κατάσταση αυτή έχει οδηγήσει σε επιστημονικές και πολιτικές προσπάθειες να χειριστούν τα προβλήματα της αντιβιοαντοχής στην κτηνοτροφία. Από την αναφορά του Swann πριν από 30 χρόνια που πρότεινε περιορισμούς στη χρήση των σημαντικών για την ιατρική αντιβιοτικών στις ζωοτροφές, η επιστημονική συζήτηση συνεχίζεται αμείωτη. Η επίδραση των επιχειρημάτων που αντιτίθενται στη χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και τις υδατοκαλλιέργειες έχει περιοριστεί. Τα κρίσιμα επίπεδα της αντιβιοαντοχής στα ανθρώπινα παθογόνα, όπως ορίστηκαν από τον Harold Neu το 1992 και από άλλους, ξεκίνησαν μια φάση νέας και σε βάθος επιστημονικής εξέτασης της χρήσης αντιβιοτικών, με αποκορύφωμα το 1995 μιας σημαίνουσας αναφοράς από μια ομάδα εργασίας της Αμερικανικής Κοινωνίας για τη Μικροβιολογία. Αναφορικά με τα αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία και τα τρόφιμα δόθηκε μια σαφής δήλωση: «Εξαιτίας της αυξημένης αντιβιοαντοχής των παθογόνων των ζώων και των αλλαγών στις πρακτικές παραγωγής τροφίμων, υπάρχει μια αυξανόμενη απειλή στα τρόφιμα, τη βιομηχανία τροφίμων και ως εκ τούτου στην οικονομία των Η.Π.Α.. Λόγω του αυξημένου εξωτερικού εμπορίου, των μετακινήσεων και της μετανάστευσης, η απειλή της παγκόσμιας εξάπλωσης της αντιβιοαντοχής είναι μεγαλύτερη από ποτέ ».

Το 1997 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δημοσίευσε για πρώτη φορά μια αναφορά για τις ιατρικές επιπτώσεις της χρήσης των αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα. Οι κύριες απειλές διατυπώθηκαν ως εξής: α) αύξηση στον επιπολασμό των ανθεκτικών βακτηρίων στα ζώα και μεταφορά ανθεκτικών παθογόνων στους ανθρώπους μέσω άμεσης επαφής με τα ζώα ή μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων ή νερού, β) μεταφορά αντοχής στα βακτήρια των ανθρώπων, γ) αύξηση της επίπτωσης των ανθρώπινων λοιμώξεων που προκαλούνται από ανθεκτικά παθογόνα, δ) πιθανές θεραπευτικές αποτυχίες στα ζώα και στον άνθρωπο, και ε) τρομακτικές περιπτώσεις αντοχής στα παραγωγικά ζώα σε σχέση με είδη *Salmonella*, *Campylobacter*, *Enterococcus* και την *E. coli*.

Μια άλλη λεπτομερής αναφορά για τις επιδράσεις της αντιβιοαντοχής στην τροφική αλυσίδα κυκλοφόρησε από το Υπουργείο Γεωργίας, Αλιείας και Τροφίμων του Ηνωμένου Βασιλείου τον Αύγουστο του 1998. Αναφέρει ότι η μείωση της αντιβιοαντοχής στην τροφική αλυσίδα είναι ένας τρόπος μείωσης της επίδρασης στους ανθρώπους, αλλά πρέπει να συμπεριληφθούν ιατρικοί και κτηνιατρικοί τομείς (Teuber, 1999).

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έχει δυο κύριες λειτουργίες τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική. Αρχικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοδηγήσει την επιλογή των αντιβιοτικών για τη θεραπεία του ασθενή. Δευτερευόντως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο ελέγχου για τον έλεγχο της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (Tikofsky *et al.*, 2002).

Η αντιβιοαντοχή αποτελεί μεγάλη ανησυχία για τους καταναλωτές εξαιτίας της ζωονοσογόνου προοπτικής. Στη Δανία απαγορεύεται η προληπτική χρήση αντιβιοτικών και η θεραπεία ξηρής περιόδου των αγελάδων μπορεί να γίνει νόμιμα μόνο σε αγελάδες με πραγματική ή πρόσφατη κλινική μαστίτιδα ή με θετική βακτηριολογική καλλιέργεια. (Bennedsgaard *et al.*, 2006).

Οι ανθεκτικοί μικροοργανισμοί σε πολλούς αντιμολυσματικούς παράγοντες έχουν αυξηθεί παγκοσμίως. Η βακτηριακή αντοχή αποτελεί μεγάλη υπόθεση για τις κοινοτικές ρυθμίσεις και ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA) αποτελεί

συχνή αιτία ενδονοσοκομειακών και ενδοκοινοτικών λοιμώξεων. Αυτό είναι περισσότερο εμφανές σε χώρες με περιορισμένες πηγές. Η οικολογική πίεση που ασκείται από τη χρήση των αντιβιοτικών είναι η κύρια κινητήρια δύναμη για την εμφάνιση της αντοχής. Ηρωικές προσπάθειες γίνονται σε ακαδημαϊκά ιδρύματα και σε φαρμακοβιομηχανίες ως αντίδραση στην αυξημένη ιατρική ανάγκη και στην αυξανόμενη αντοχή των βακτηρίων στις επιμέρους κατηγορίες των αντιβιοτικών και κυρίως μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών. Δυστυχώς, η εμφάνιση νέων αντιβιοτικών δε συμβαδίζει με την αύξηση του επιπολασμού των πολυανθεκτικών παθογόνων. Για να μειωθεί η ανθρώπινη θνησιμότητα και η νοσηρότητα που σχετίζεται με τις μολυσματικές νόσους που προκαλούνται από πολυανθεκτικά βακτηριακά παθογόνα είναι αναγκαία η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων που να είναι αποτελεσματικοί έναντι των ανθεκτικών στα φάρμακα μεταλλάξεων (Cao Shanping *et al.*, 2011).

Προγράμματα επιτήρησης της αντιβιοαντοχής στα παραγωγικά ζώα και στα τρόφιμα έχουν σκοπό να παρέχουν νέα δεδομένα που είναι απαραίτητα για να στηρίξουν τη συνετή χρήση των αντιβιοτικών στο γεωργοκτηνοτροφικό τομέα. Έτσι, μπορεί να προκύψει το συμπέρασμα ότι η υποστήριξη της συντριπτικής πλειοψηφίας στον έλεγχο των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και τις σχετιζόμενες βιομηχανίες θα αποκτήσει ώθηση, με συνεπαγόμενα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου (Teuber, 1999).

Από την άποψη της δημόσιας υγείας είναι πιθανό τα παθογόνα που παρουσιάζουν αντιβιοαντοχή και οι συμβιούντες μικροοργανισμοί να μεταδοθούν στους ανθρώπους μέσω της άμεσης επαφής με τα ζώα ή μέσω της τροφικής αλυσίδας. Στα βοοτροφικά συστήματα η πιο προφανής πίεση επιλογής για την αντιβιοαντοχή είναι η εφαρμογή των αντιβιοτικών για θεραπεία (π.χ. στη μαστίτιδα, χωλότητα, ασθένειες του αναπνευστικού και καθαριότητα) και για πρόληψη και παραγωγικά οφέλη (π.χ. φαρμακευτικά υποκατάστατα γάλακτος). Αυτές οι πρακτικές μπορούν να προάγουν την αντιβιοαντοχή με δυο πιθανούς μηχανισμούς: επιτρέπουν στους πληθυσμούς των βακτηρίων που παρουσιάζουν αντιβιοαντοχή να επεκταθούν σε αριθμούς, παρέχοντας ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα για τα ανθεκτικά στελέχη και επιτρέπουν στα γονίδια της αντοχής να διαδοθούν επιτυχώς σε νέους βακτηριακούς ξενιστές, αν αυτά τα γονίδια φιλοξενούνται σε στοιχεία που μπορούν να μεταδοθούν οριζόντια, όπως είναι τα πλασμίδια και τα συζεύξιμα τρανσποζόνια. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στις φλουοροκινολόνες, τα

αντιβιοτικά μπορούν να επιλέξουν de novo χρωμοσωμικές μεταλλάξεις που παρέχουν αντίσταση και επιτρέπουν τη σχετικά ταχεία εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών.

Η προοπτική για επιλογή και εξάπλωση των βακτηρίων με αντιβιοαντοχή είναι τόσο επίκαιρη όσο ήταν και πριν από έξι δεκαετίες, όταν είχαν αρχίσει να εμφανίζονται για πρώτη φορά ερωτήσεις για την επιλογή της αντιβιοαντοχής. Για παράδειγμα μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι οι γαλακτοπαραγωγοί στην πολιτεία της Ουάσιγκτον χρησιμοποιούν σε ρουτίνα αντιβιοτικά (74,2-97,0%) για τη θεραπεία κοινών προβλημάτων υγείας. Οι μελέτες παρατήρησης μπορούν να αποδείξουν συσχέτιση, αλλά δεν μπορούν να δείξουν άμεση αιτιολογική σύνδεση ανάμεσα στα αντιβιοτικά και την ανάπτυξη την αντοχής των βακτηρίων σε ατομικό επίπεδο ζώου. Αυτό έχει αντιμετωπιστεί με πειραματικές προσεγγίσεις.

Η μαστίτιδα είναι η πιο συνηθισμένη κατάσταση που δικαιολογεί τη χρήση αντιβιοτικών στις γαλακτοπαραγωγές εκτροφές. Η μαστίτιδα προκαλείται από μια ποικιλία Gram-θετικών και Gram-αρνητικών οργανισμών και η ενδομαστική έγχυση πενικιλίνης ήταν η πρώτη αντιμικροβιακή θεραπεία για την κατάσταση αυτή. Στις Η.Π.Α. η πρακτική αυτή χρονολογείται από τα μέσα του 1940 μέχρι σήμερα. Συνεπώς, από μια δραστική προοπτική θα περιμέναμε η αντιβιοαντοχή στην πενικιλίνη να είναι υψηλή και αυτή φαίνεται να είναι η υπόθεση σχετικά με τα άλλα φάρμακα, αν και η αντοχή στην πενικιλίνη είναι ακόμη πολύ συχνή (Call *et al.*, 2008).

Η αντίσταση στη μεθικιλίνη του *Staphylococcus aureus* αποτελεί ένα αυξανόμενο πρόβλημα για την ιατρική και ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *Staphylococcus epidermidis* πρόσφατα ανακτήθηκε από αγελαδινό γάλα που προερχόταν από Σουηδική βιολογική εκτροφή γαλακτοπαραγωγής (Ruegg, 2009).

Στην Κορέα τα ανθεκτικά βακτήρια είναι περισσότερο διαδεδομένα από άλλες βιομηχανικές χώρες και η παρουσία τους υποδεικνύει υψηλό επίπεδο αντιμικροβιακής πίεσης επιλογής, όπως και τη νοσοκομειακή εξάπλωση ανθεκτικών βακτηρίων (Uh Young *et al.*, 2007).

Η σημερινή ραγδαία αύξηση της αντιβιοαντοχής ανάμεσα στα παθογόνα του ανθρώπου συμπίπτει επικίνδυνα με την έλλειψη ανακάλυψης νέων αντιβιοτικών. Μια υποσχόμενη

εναλλακτική είναι μια ομάδα μικρών πεπτιδίων, που είναι γνωστά ως αντιμικροβιακά πεπτίδια ή αμυντικά πεπτίδια του ξενιστή, που συναντώνται σε όλες τις μορφές ζωής, αλλά δεν έχουν ακόμη αξιοποιηθεί ευρέως για φαρμακευτικούς σκοπούς (Pietiäinen *et al.*, 2009).

### **3.5.2 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και τρόφιμα**

Οι συνήθειες της ιατρικής πρακτικής πέρασαν και στην κτηνιατρική πράξη και ιδιαίτερα στα παραγωγικά ζώα, των οποίων τα προϊόντα καταλήγουν στον άνθρωπο. Σε ζώα, όπως τα βοοειδή και τα αιγοπρόβατα, η θεραπευτική αγωγή χορηγείται μεμονωμένα στο ζώο που παρουσιάζει πρόβλημα, αλλά και πάλι, όταν δεν τηρούνται οι χρόνοι αναμονής για την αποβολή του φαρμάκου από τον οργανισμό του ζώου, κατάλοιπα της χημικής ουσίας μπορούν να περάσουν στο κρέας ή στο γάλα και να φτάσουν στην ανθρώπινη κατανάλωση. Το πρόβλημα, όμως, μπορεί να πάρει ανεξέλεγκτες διαστάσεις στις πτηνοτροφικές και στις χοιροτροφικές μονάδες. Έτσι, η χορήγηση οποιασδήποτε θεραπευτικής αγωγής αφορά ολόκληρο τον πληθυσμό και όχι μεμονωμένα ζώα. Συνεπώς, η ασυνείδητη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων μπορεί να δώσει τόνους κρέατος και εκατομμύρια αβγών με κατάλοιπα αυτών των φαρμάκων (Ungermach, 2000).

Η παραγωγή του κρέατος, του γάλακτος και των αβγών στη σύγχρονη κτηνοτροφία έχει αποκτήσει βιομηχανικές διαστάσεις. Ζώα διατηρούνται σε μεγάλους αριθμούς για τα διάφορα στάδια της παραγωγής (αναπαραγωγή, ανάπτυξη, πάχυνση, παραγωγή γάλατος και αβγών) σε συγκεκριμένες εκτροφές (Teuber, 1999).

Τα αντιβιοτικά, εκτός της θεραπευτικής χρήσης τους στην ιατρική και την κτηνιατρική, χρησιμοποιούνται και σε άλλους τομείς, όπως είναι η κτηνοτροφία, οι ιχθυοκαλλιέργειες και η γεωργία, προκειμένου να εξασφαλίσουν τη βιωσιμότητα, αλλά και την αύξηση της παραγωγικότητας των ζώων και των φυτών. Η ευρεία, όμως, χρήση τους έχει οδηγήσει σε ανησυχητική αύξηση των αντιβιοανθεκτικών στελεχών που απομονώνονται από τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Τα σημαντικότερα προβλήματα που δημιουργούν τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά τροφιμογενή παθογόνα είναι: α) η

αναποτελεσματικότητα του αντιβιοτικού με αποτέλεσμα την αύξηση της δόσης του, παράταση του χρόνου χορήγησης και αύξηση του κόστους της θεραπείας, β) η ενίσχυση της παθογόνου δράσης του βακτηρίου, με αποτέλεσμα την πρόκληση πιο μακροχρόνιας και πιο σοβαρής νόσου, γ) ο αυξημένος κίνδυνος μόλυνσης των ανθρώπων που ήδη κάνουν χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων για την καταπολέμηση άλλων νόσων (λόγω μείωσης της ανθεκτικότητας αποικισμού), φαινόμενο που παρατηρείται πολύ συχνά στα ανθεκτικά στελέχη *Salmonella* spp., δ) η δημιουργία μιας δεξαμενής παραγόντων αντοχής που μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα παθογόνα του ανθρώπου, και ε) η διασπορά ζωνοδόσων στο ζωικό κεφάλαιο με κίνδυνο την άμεση ή έμμεση μόλυνση του ανθρώπου.

Η παρουσία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης αποτελεί ένα αναδυόμενο πρόβλημα δημόσιας υγείας. Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας, ειδικά στις περιπτώσεις που δεν τηρούνται οι κανόνες σωστής υγειονομικής πρακτικής. Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί βιολογικό κίνδυνο, τόσο για τον άνθρωπο, όσο και για τα ζώα. Λόγω της παγκοσμιοποίησης και της ελεύθερης μετακίνησης ανθρώπων, ζώων και τροφίμων δεν περιορίζεται στα στενά όρια μιας χώρας. Δεδομένου ότι η ασφάλεια των τροφίμων σχετίζεται με οτιδήποτε επηρεάζει την τροφική αλυσίδα, η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στις εκτροφές των ζώων αποτελεί σοβαρό παράγοντα κινδύνου για τον άνθρωπο, είτε με τη μορφή καταλοίπων στα τρόφιμα, είτε ως αίτιο δημιουργίας ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Τα αντιμικροβιακά φάρμακα χρησιμοποιούνται σε πολλούς τομείς της παραγωγής τροφίμων, όπως είναι η ζωική παραγωγή, οι ιχθυοκαλλιέργειες και η γεωργία, προκειμένου να εξασφαλίσουν τη βιωσιμότητα, αλλά και την αύξηση της παραγωγικότητας.

Τα παθογόνα βακτήρια μπορούν να μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας. Η παρουσία βακτηρίων ζωικής προέλευσης στα τρόφιμα αναφέρεται συχνά. Ορισμένα από τα βακτήρια αυτά παρουσιάζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Αρχικά αυτό αποδείχθηκε για τις σαλμονέλλες και στη συνέχεια για άλλα τροφιμογενή παθογόνα. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι υπάρχουν βανκομυκίνη ανθεκτικοί εντερόκοκκοι (VRE), γεγονός που αποδεικνύει ότι και τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας των τροφίμων εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Φαίνεται ότι μαζί με τα βακτήρια που εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά μεταφέρεται και το



γενετικό υλικό που κωδικοποιεί την αντοχή. Μεταφορά της μικροβιακής αντοχής στα βακτήρια της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας έχει παρατηρηθεί, αν και ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό πραγματοποιείται δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η μεταφορά αντοχής από βακτήρια ζωικής προέλευσης σε άλλα βακτήρια της ανθρώπινης χλωρίδας, αν και λιγότερο συχνή, είναι αποδεδειγμένη. Παρατηρείται ανάπτυξη αντοχής στα βακτήρια ζωικής προέλευσης, ανεξάρτητα από το αν γίνεται χρήση για θεραπευτικούς και προληπτικούς λόγους ή χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες. Η αντοχή αποδεικνύεται πιο εύκολα στα παθογόνα των ζώων παρά στα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η μικροβιακή αντοχή παρουσιάζει διακυμάνσεις από πληθυσμό σε πληθυσμό, από εκτροφή σε εκτροφή, καθώς και από χώρα σε χώρα, καθώς εξαρτάται από τη χρήση και από τη συχνότητα έκθεσης σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Αυτό είναι φανερό στις περιπτώσεις που απλά αντιβιοτικά, όπως η βενζυλλική πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη, παραμένουν αποτελεσματικά στη θεραπευτική αγωγή έπειτα από χρήση 50 ετών (Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009).

Το αγελαδινό και το αιγοπρόβειο γάλα συγκεντρώνεται αμέσως σε κλειστό σύστημα ψυχόμενης δεξαμενής και από εκεί μεταφέρεται υπό ψύξη στη γαλακτοβιομηχανία, όπου ακολουθεί παστερίωση. Τα περισσότερα γαλακτοκομικά προϊόντα παρασκευάζονται από παστεριωμένο γάλα. Ωστόσο, σε κάποιες περιοχές της Βρετανίας και της Ουαλίας, όπως επίσης σε αρκετές αγροτικές περιοχές της Ελλάδας, πωλείται μη παστεριωμένο γάλα. Από την παστερίωση λίγες είναι οι βλαστικές μορφές που επιβιώνουν και οι οποίες προέρχονται από ενδεχόμενες μαστίτιδες ή επιμόλυνση του γάλακτος από κόπρανα των ζώων κατά την άμελξη. Το παστεριωμένο γάλα χαρακτηρίζεται από σημαντικά μειωμένο μικροβιακό φορτίο, χωρίς όμως να καταστρέφονται όλες οι βλαστικές μορφές μικροβίων σε αυτό (Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009). Για δείγματα νωπού γάλακτος η μόλυνση με τροφιμογενή παθογόνα έχει προσδιοριστεί στο 50% περίπου (Teuber, 1999).

Άλλες πηγές αποτελούν η κατανάλωση κρέατος, πουλερικών, αβγών, οστρακοειδών και λαχανικών (Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009). Το κρέας σε περίπτωση που είναι ωμό ή ατελώς ψημένο αποτελεί έναν άμεσο τρόπο μετάδοσης της μικροχλωρίδας του ζώου στον άνθρωπο, καθώς είναι σχεδόν αδύνατο να σφαγεί ζώο χωρίς να επιμολυνθεί το σφάγιο με μέρος του εντερικού περιεχομένου του ζώου ή με τη φυσιολογική χλωρίδα

του δέρματός του (Teuber, 1999; Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009). Τα αβγά εμπλέκονται, εφόσον τουλάχιστον στο κέλυφος είναι αναπόφευκτα μολυσμένα με την κοπρανώδη μικροχλωρίδα των ωοπαραγωγών ορνίθων (Teuber, 1999).

Μείζονος σημασίας είναι και η πρόληψη της διασποράς ανθεκτικών στα αντιβιοτικά τροφιμογενών μικροοργανισμών. Επιπλέον, βακτήρια που αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά μπορούν να εμφανίσουν αντοχή και στα συντηρητικά των τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη *S. aureus* και *S. epidermidis* εμφάνισαν αντοχή σε οργανικές κατιονικές ενώσεις, όπως η χλωρεξιδίνη και τα τεταρτοταγή άλατα του αμμωνίου, ενώ ανθεκτικά στελέχη *E. coli* ήταν ανθεκτικά και σε κοινά οικιακά απολυμαντικά (Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009).

### **3.5.3 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και αυξητικοί παράγοντες**

Στην κτηνοτροφία και στη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων τεράστιο κεφάλαιο αποτελεί η προληπτική χορήγηση αυτών των ουσιών. Συγκεκριμένα, ο εγκλεισμός των ζώων στα χοιροστάσια και στα πτηνοτροφεία ενέχει τον κίνδυνο απώλειας ολόκληρου του ζωικού πληθυσμού, εξαιτίας κάποιου λοιμώδους νοσήματος, αλλά και από ήπια αναπνευστικά προβλήματα, τα οποία όμως διογκώνονται λόγω του κλειστού χώρου και του κακού αερισμού. Έτσι, οι παραγωγοί, χωρίς πολλές φορές την κτηνιατρική συμβουλή, χορηγούσαν στην τροφή ή στο νερό αντιμικροβιακούς παράγοντες σε μια προσπάθεια πρόληψης των νοσημάτων. Ως αποτέλεσμα, έβλεπαν τα κέρδη τους να διογκώνονται, καθώς ο ζωικός πληθυσμός της εκτροφής τους όχι μόνο δεν αρρώσταινε, αλλά απαλλαγμένος από την οποιαδήποτε μικροβιακή επίδραση, αύξανε το δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής και κατά συνέπεια απέδιδαν σφάγια με μεγαλύτερο βάρος. Αυτό παρατηρούνταν σε πανευρωπαϊκό επίπεδο, αλλά σύντομα απαγορεύτηκε από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα, που από το 1988 (Κανονισμός 70/524/ΕΟΚ που απαγορεύει τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων ως πρόσθετα στις ζωοτροφές) και μετά δεν επιτρέπει τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων ως αυξητικούς παράγοντες.

Βέβαια, σε ευρωπαϊκό επίπεδο τα προβλήματα από την αλόγιστη χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων στην κτηνοτροφία, άρχισαν ήδη από τα μέσα της

δεκαετίας του '80 να γίνονται εμφανή και οι σκανδιναβικές χώρες με πρώτη τη Σουηδία έσπευσαν να τους απαγορεύσουν, ενώ μετά την απόδειξη ότι τα κτηνιατρικά αντιμικροβιακά λειτουργούν όπως και εκείνα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση άρχισε η πανευρωπαϊκή απαγόρευση που αναφέρθηκε προηγουμένως. Εκτός Ευρωπαϊκής Ένωσης η κατάσταση απέχει πολύ από το να θεωρηθεί ελεγχόμενη, ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες επιτρέπεται κανονικά η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων ακόμη και ως αυξητικοί παράγοντες. Είναι χαρακτηριστικό ότι ακόμα και για ουσίες που υπάρχουν συγκεκριμένα όρια της συγκέντρωσής τους σε τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση αυτά είναι πολλαπλάσια των αντίστοιχων ευρωπαϊκών. Και τέτοιο παράδειγμα είναι η πενικιλίνη στο γάλα, που ενώ στην Ευρώπη το MRL είναι 100 μg/ml στην άλλη πλευρά του Ατλαντικού είναι τριπλάσιο (Ungermach, 2000, Van den Bogaard, 2000).

Στην Ευρώπη η αβοπρασίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως προσθετικό στις ζωοτροφές πολλών ειδών ως αυξητικός παράγοντας. Σε ξεχωριστές έρευνες των Aarestrup (1995) και Witte (2000) οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι απομονώθηκαν σε κόπρανα χοιροτροφικών και πτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων που χρησιμοποιούσαν αβοπρασίνη στις ζωοτροφές, ενώ στις εκμεταλλεύσεις που δε χρησιμοποιούνταν αβοπρασίνη δεν ανιχνεύθηκαν ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι. Πολλά από τα γονίδια της αντιβιοαντοχής βρίσκονται σε πλασμίδια που μπορούν να αυτομεταφερθούν σε άλλα γένη και είδη βακτηρίων (Tikofsky *et al.*, 2002).

Στην Ευρώπη η αβοπρασίνη, που περιλαμβάνει διασταυρούμενη αντοχή με τη βανκομυκίνη, απαγορεύτηκε ως αντιμικροβιακός αυξητικός παράγοντας το 1996, κυρίως με βάση τους υψηλού επιπέδου ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη εντερόκοκκους στα έντερα και το κρέας των παραγωγικών ζώων. Από την 1<sup>η</sup> Ιουλίου 1999 η Ε.Ε. απαγόρευσε τη χρήση στις ζωοτροφές της σπειραμυκίνης, της βιργινιαμυσίνης, της τυλοσίνης και της βασιτρασίνης, εξαιτίας προβλημάτων διασταυρούμενης αντοχής με τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην ιατρική. Επιστημονικές αναφορές για την αντιβιοαντοχή των λακτόκοκκων και των εντερόκοκκων στα τυριά νοπού γάλακτος πυροδότησε το 1998 την απόφαση της Ελβετικής βουλής να απαγορευτούν όλα τα αντιμικροβιακά προσθετικά των ζωοτροφών από την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου 1999. Επιπρόσθετα, οι Ελβετοί αγρότες θα πρέπει να διατηρούν αρχείο των χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών για θεραπεία και για πρόληψη στα ζώα τους (Teuber, 1999).

Στη Βρετανία ήδη από το 1969 η έκθεση της επιτροπής Swann πρότεινε τη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στα ζώα μόνο μετά από κτηνιατρική συνταγογράφηση και την απαγόρευση της χορήγησης πενικιλίνης και τετρακυκλίνης σε υποθεραπευτικές δόσεις ως προαγωγών ανάπτυξης. Έκτοτε, και άλλες συμβουλευτικές επιτροπές υιοθέτησαν τις συστάσεις της επιτροπής Swann και πρότειναν την αναστολή χορήγησης αντιμικροβιακών ουσιών, που χρησιμοποιούνται και στη θεραπευτική του ανθρώπου, ως αυξητικών παραγόντων. Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1970 οι περισσότερες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης απαγόρευαν τη χρήση πενικιλινών και τετρακυκλινών ως αυξητικών παραγόντων των ζώων. Αντίθετα, στις Η.Π.Α. η χρήση τους συνεχίστηκε να επιτρέπεται. Σε αντίθεση με τις ευρωπαϊκές οδηγίες, το 1989 η Επιτροπή του Ινστιτούτου Ιατρικής των Η.Π.Α., μετά από εμπειριστατωμένη μελέτη επίπτωσης του κινδύνου στον άνθρωπο, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι οι υποθεραπευτικές δόσεις των αντιμικροβιακών αυξητικών παραγόντων στα ζωικά σιτηρέσια αποτελούν κίνδυνο για τον άνθρωπο. Όμως, το 1999 η έκθεση του National Research Council Committee on Drug Use in Food Animals κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων στα παραγωγικά ζώα δεν στερείται επιπτώσεων. Η κύρια ανησυχία που εξέφρασαν ήταν ότι η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στα παραγωγικά ζώα προάγει την ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά και τη μεταφορά αυτής στα παθογόνα μικρόβια που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο (Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009).

### **3.5.4 Επιπτώσεις της αντιβιοαντοχής στη Δημόσια Υγεία**

Η αλόγιστη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων που παρατηρήθηκε τις τελευταίες δεκαετίες τόσο στην αντιμετώπιση νοσημάτων του ανθρώπου, όσο και στην κτηνιατρική πράξη, όπου εκτός από τη θεραπευτική χορηγούνται και προληπτικά για την αποφυγή λοιμώξεων που θα μείωναν την παραγωγή, οδήγησε στην εμφάνιση πολλών επιπτώσεων για τη δημόσια υγεία. Συγκεκριμένα, μικροοργανισμοί απέκτησαν ανθεκτικότητα έναντι αυτών των φαρμάκων με αποτέλεσμα ακόμα και συνδυασμοί τους να μην είναι ικανοί να αντιμετωπίσουν λοιμώξεις (Adams, 1995). Η εμφάνιση της αντιβιοαντοχής στα παθογόνα βακτήρια, τόσο στις ενδονοσοκομειακές όσο και στις εξωνοσοκομειακές

λοιμώξεις, αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας (Svara, Rankin, 2011). Η φαρμακοποιία έχει στραφεί σε νέους τύπους φαρμάκων, με τα οποία επιδιώκεται γονιδιακή θεραπεία, αλλά το κατάλοιπο των αντιβιοάντοχων στελεχών έχει απομείνει και ήδη απειλεί σοβαρά να προκαλέσει ιδιαίτερα προβλήματα στον άνθρωπο (Adams, 1995).

Από την εισαγωγή για τη θεραπεία του ανθρώπου πριν 60 χρόνια, τα αντιβιοτικά έδειξαν αξιοσημείωτη επιτυχία και αποτελούν μια από τις σημαντικότερες ιατρικές εφευρέσεις για τη μείωση της ανθρώπινης νοσηρότητας και θνησιμότητας. Δυστυχώς, η εντατική χρήση και η κατάχρηση των αντιβιοτικών είχε σαν αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ανάμεσα σε πολλά παθογόνα του ανθρώπου, μειώνοντας τις πιθανότητες για θεραπεία των λοιμώξεων και διακυβεύοντας τις ιατρικές διαδικασίες, όπως τις μεταμοσχεύσεις οργάνων ή τα εμφυτεύματα προσθετικής, όπου οι λοιμώδεις επιπλοκές είναι συνήθεις και η θεραπεία με αντιβιοτικά χρειάζεται για την πρόληψη ή τη θεραπεία αυτών των λοιμώξεων (Martinez, 2009).

Οι ερευνητές Mc Dermott και Swartz έχουν προτείνει τρεις υποθέσεις για τις επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία από τη χρήση αντιμικροβιακών στα ζώα και την παρουσία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης:

1. Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά παθογόνα στελέχη μολύνουν το τρόφιμο κατά τη διάρκεια της σφαγής ή κατά την επεξεργασία του. Το τρόφιμο καταναλώνεται από τον άνθρωπο και η ενδεχόμενη λοίμωξη που ακολουθεί απαιτεί θεραπεία με αντιβιοτικά.
2. Επιλέγονται συμβιωτικά βακτήρια των ζώων, τα οποία μολύνουν το τρόφιμο. Μετά την κατανάλωση του τροφίμου από τον άνθρωπο τα βακτήρια αυτά έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν παράγοντες αντιβιοαντοχής σε άλλα, παθογόνα ή συμβιωτικά, βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου.
3. Τα αντιβιοτικά παραμένουν στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ως κατάλοιπα και προκαλούν την επιλογή των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων μετά την κατανάλωση του τροφίμου.

Η υπόθεση που προτείνει ο Walters είναι πιο αναλυτική, περιλαμβάνοντας τα γεγονότα που πρέπει να συμβούν, ώστε ένα ανθεκτικό στα αντιβιοτικά τροφιμογενές παθογόνο να προκαλέσει νόσο στον άνθρωπο. Έτσι, προτείνει τα εξής στάδια:

1. Να υπάρχουν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια σε μια ομάδα ζώων.
2. Να συμβεί επιλογή ενός προϋπάρχοντος στελέχους που φέρει γονίδια αντοχής ή να γίνει μετάλλαξη που οδηγεί σε μικροβιακή αντοχή.
3. Να προκληθεί κοπρανώδης επιμόλυνση του σφάγιου κατά τη διαδικασία της κατεργασίας με αποτέλεσμα την πώλησή του με βακτήρια.
4. Να συμβεί επαναμόλυνση μετά το μαγείρεμα λόγω λανθασμένων χειρισμών ή θερμική επεξεργασία χαμηλότερης θερμοκρασίας ή μικρότερης διάρκειας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση των βακτηρίων.
5. Να καταναλώσει ο άνθρωπος μολυσμένα τρόφιμα με αποτέλεσμα την αποίκιση ή τη μόλυνσή του με βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.
6. Να απαιτηθεί επίσκεψη στον ιατρό ή νοσηλεία, ανάλογα με τη σοβαρότητα της λοίμωξης, και πιθανή χρήση αντιβιοτικού της ίδιας κλάσης με εκείνο που χρησιμοποιήθηκε στην εκτροφή των ζώων.
7. Ως αποτέλεσμα έχουμε την αύξηση του χρόνου θεραπείας ή ακόμη και το θάνατο του ασθενούς (Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009).

### **3.5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση ανθεκτικότητας**

Για να εμφανιστεί το φαινόμενο της ανθεκτικότητας ενός βακτηριακού στελέχους σε ένα ή και περισσότερα αντιμικροβιακά φάρμακα φαίνεται να απαιτείται η συνεργική δράση πολλών παραγόντων, όπως:

α) Το αντιμικροβιακό φάρμακο. Η ίδια η φαρμακευτική ουσία και ο τρόπος με τον οποίο άγεται είναι ο πρώτος παράγοντας που παίζει ρόλο. Η δόση του φαρμάκου ανάλογα με το ύψος της ασκεί και διαφορετική πίεση στον μικροβιακό πληθυσμό, ενώ αντίστοιχα διαφορετική πίεση ασκεί και η οδός χορήγησης, με τη λήψη από το στόμα να οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα αντιβιοαντοχής. Τέλος, ένα αντιμικροβιακό ευρέος φάσματος θεωρείται παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ανθεκτικότητας.

β) Ο μικροβιακός πληθυσμός. Παρατηρείται διαφορά μεταξύ των ειδών των βακτηριακών στελεχών και της ικανότητας που έχουν να εκδηλώνουν ανθεκτικότητα,

ενώ η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ευαίσθητων στους αντιμικροβιακούς παράγοντες βακτηρίων φαίνεται να μην επιτρέπει την αύξηση της ανθεκτικότητας.

γ) Ο ξενιστής. Το ίδιο το άτομο επηρεάζει την εκδήλωση του φαινομένου. Άτομα αγχώδη ή και φιλάσθενα εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά αντιβιοάντοχων στελεχών, ενώ και στους νεότερους οργανισμούς συμβαίνει κάτι αντίστοιχο.

δ) Το περιβάλλον. Οι ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και οι κακές συνθήκες υγιεινής αυξάνουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας (Catry *et al.*, 2003).

Η μικροβιακή αντίσταση αυξάνεται σε ανησυχητικό βαθμό, καθιστώντας πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες αναποτελεσματικούς. Υπάρχει επιτακτική ανάγκη να αναπτυχθούν νέοι αντιμικροβιακοί παράγοντες και να βελτιστοποιηθούν οι διαθέσιμοι παράγοντες, ώστε να κάμψουν την αυξανόμενη επικράτηση της αντίστασης. Υπάρχουν πειραματικές και κλινικές αποδείξεις ότι η δοσολογία έκθεσης μπορεί να έχει επίδραση στην έκβαση των ασθενών και την ανάπτυξη της αντοχής. Η θανάτωση των μικροβίων από μη δεσμευμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες κατατάσσεται παραδοσιακά σε εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση και σε δοσοεξαρτώμενη (Tam, 2011).

Αν η χρήση των αντιβιοτικών είναι η κύρια πίεση επιλογής που ενθαρρύνει την ανάπτυξη της αντιβιοαντοχής, τότε μειώνοντας τη χρήση των αντιβιοτικών θα πρέπει να μειωθεί η αντοχή στα αντιβιοτικά. Παρατηρήθηκε μείωση στην αντοχή στην τετρακυκλίνη σε στελέχη *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από ανθρώπους και χοίρους μετά από την απαγόρευση της χρήσης της τετρακυκλίνης σαν αυξητικός παράγοντας στις ζωοτροφές το 1974. Παρομοίως, όταν η αβοπρασίνη απαγορεύτηκε σαν προσθετικό ζωοτροφών για τα πουλερικά το 1995 στη Δανία, η επίπτωση των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από κρεοπαραγωγή ορνίθια μειώθηκε από 80% σε 5% (Tikofsky *et al.*, 2002).

### 3.5.6 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

#### 3.5.6 α) Μηχανισμοί άμυνας των μικροοργανισμών

Η χρόνια έκθεση των μικροοργανισμών στην ασφυκτική δράση των αντιμικροβιακών παραγόντων είχε ως αποτέλεσμα να δημιουργηθούν ανθεκτικά στελέχη, τα οποία έχουν την ικανότητα να παραμένουν ανεπηρέαστα, έχοντας αναπτύξει έναν από τους παρακάτω μηχανισμούς άμυνας (Catry *et al.*, 2003, Nel, 2005) :

1. Χημική απενεργοποίηση του φαρμάκου. Αυτό επιτυγχάνεται με υδρόλυσή του από ένζυμα, όπως οι β-λακταμάσες, οι πενικιλινάσες και οι κεφαλοσπορινάσες, ή με προσθήκη κάποιας χημικής ομάδας στη χημική φαρμακευτική ουσία, η οποία την καθιστά ανενεργή.
2. Μετατροπή του στόχου δράσης του φαρμάκου. Σε αυτή την περίπτωση συνήθως κάποια μετάλλαξη έρχεται να μεταβάλλει το σημείο πρόσδεσης του φαρμάκου στην κυτταρική μεμβράνη και η χημική ουσία να «αποπροσανατολίζεται» και να μη βρίσκει στόχο δράσης. Ενώ και στις δυο περιπτώσεις που περιγράφηκαν αποκτάται ανθεκτικότητα σε μια ή το πολύ δυο ομάδες αντιμικροβιακών φαρμάκων, οι οποίες συνήθως συγγενεύουν χημικά, στις επόμενες δυο περιπτώσεις δημιουργούνται πολυανθεκτικά στελέχη κάνοντας ιδιαίτερα δύσκολη την αντιμετώπισή τους.
3. Μείωση της διαπερατότητας του φαρμάκου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Σε αυτή την περίπτωση, που παρατηρείται σε Gram αρνητικά βακτήρια, απώλεια των πορινών (υδάτινα κανάλια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης) οδηγεί σε αδυναμία εισόδου της χημικής ουσίας στο εσωτερικό του κυττάρου και κατά συνέπεια σε ανθεκτικότητα.
4. Μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του φαρμάκου. Ορισμένες φορές και ενώ η χημική ουσία έχει εισέλθει στο βακτηριακό κύτταρο δημιουργείται το φαινόμενο drug efflux. Συγκεκριμένα, ενεργοποιούνται κάποιες αντλίες



αποχέτευσης λιπόφιλων μορίων, που έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα και κατά συνέπεια την αναστολή της δράσης του.

5. Δημιουργία βιοφίλμ. Στον πέμπτο μηχανισμό εκδήλωσης ανθεκτικότητας έναντι των αντιμικροβιακών φαρμάκων περιγράφεται η προστατευτική δράση μιας βιοκοινότητας μικροοργανισμών στα μεμονωμένα βακτηριακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, στη δομή ενός βιοφίλμ συμμετέχουν πολλοί μικροοργανισμοί, καθώς και προϊόντα αυτών, δημιουργώντας ένα προστατευτικό τείχος, μη επιτρέποντας σε εξωτερικούς παράγοντες να προσεγγίσουν το εσωτερικό. Έτσι, η χημική ουσία δε φτάνει στο στόχο δράσης και η βιοκοινότητα καθίσταται αντιβιοάντοχη.

Στις τέσσερις πρώτες περιπτώσεις που αναφέρθηκαν εκδηλώνονται κάποιες διαφορές στη λειτουργία του βακτηριακού κυττάρου που έχουν ως αποτέλεσμα την απόκτηση ανθεκτικότητας ή και πολυανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακά φάρμακα. Οι διαφορές αυτές οφείλονται σε γονίδια, τα οποία λόγω του αποτελέσματος της έκφρασής τους ονομάζονται γονίδια ανθεκτικότητας. Κατά βάσει δυο είναι οι τρόποι εμφάνισής τους : α) ως αποτέλεσμα μεταλλαξιογένεσης, αν και αποτελεί την εξαίρεση και όχι τον κανόνα και κυρίως β) ως αποτέλεσμα της οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού (HGT, Horizontal Gene Transfer) (Martinez, 2009). Πρόκειται είτε για γονίδια του βακτηρίου ξενιστή που υπέστησαν μετάλλαξη είτε για γονίδια βακτηρίων που παράγουν τα ίδια αντιβιοτικά και έχουν μηχανισμούς αυτοπροστασίας είτε τέλος γονίδια βακτηρίων του εδάφους που διαθέτουν φυσική ανθεκτικότητα.

Οι μηχανισμοί αντοχής μπορεί να προκύψουν είτε μέσα από μεταλλάξεις στα βακτηριακά χρωμοσωμικά γονίδια που κωδικοποιούν την ευαισθησία στα αντιβιοτικά είτε μέσω της μεταφοράς εξωχρωμοσωμικών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια, τα ιντεγκρόνια και τα τρανσποζόνια. Τα στοιχεία μπορεί να μεταφερθούν μεταξύ των βακτηρίων μέσω σύζευξης (επαφή κυττάρου με κύτταρο), μεταγωγής (εισαγωγή βακτηριοφάγου) ή μετασχηματισμού (πρόσληψη γυμνού DNA). Η σύζευξη θεωρείται ο πιο σημαντικός τρόπος μεταφοράς (Tikofsky, 2002).

Η μεταφορά αυτών των γονιδίων πραγματοποιείται όταν υπάρχουν συνθήκες στενής γειννίας των βακτηριακών κυττάρων (όπως συμβαίνει στον εντερικό σωλήνα, στις καλλιέργειες εκκίνησης, σε ζυμωμένα τρόφιμα, κ.ά.) με σύζευξη, αλλά και μέσω βακτηριοφάγων ιών.

Τα γενετικά στοιχεία που μεταφέρονται είναι:

α) Πλασμίδια: πρόκειται για μικρά εξωχρωμοσωματικά κομμάτια DNA που πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό υλικό και είναι δυνατό να μεταφερθούν τόσο ενδοκυτταρικά, δηλαδή να ενσωματωθούν στο βακτηριακό χρωμόσωμα, αλλά και από κύτταρο σε κύτταρο, που είναι και το πλέον σημαντικό, διότι προσδίδει ιδιότητες σε ένα βακτηριακό κύτταρο που δεν τις είχε. Το φαινόμενο ονομάζεται σύζευξη και είναι ένα από τα φαινόμενα της οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού (Teuber *et al.*, 1999). Τα πλασμίδια εμπλέκονται άμεσα στην απόκτηση αντοχής σε πολλά αντιβιοτικά. Αυτό είναι ιδιαίτερα προβληματικό, αφού τα πλασμίδια μπορούν να υπερπηδήσουν πολλά εμπόδια των ειδών και των γενών και η αναλογία της μεταφοράς πλασμιδίων φαίνεται να αυξάνεται περισσότερο σε πιο ετερογενείς κοινότητες. Έτσι, τα πλασμίδια επιτρέπουν την εξάπλωση της ανθεκτικότητας και εξακολουθούν να υφίστανται σε θέσεις που δεν είναι απαραίτητα αντικείμενο των αντιβιοτικών. Η δόση των αντιβιοτικών και το διάστημα μεταξύ των θεραπειών είναι πιθανό να επηρεάζουν την εξέλιξη της ανθεκτικότητας που μεταδίδεται με τα πλασμίδια (Svara, Rankin, 2011).

β) Transposons: είναι ένα κομμάτι γενετικού υλικού που περιέχει ένα γονίδιο ή μια μικρή ομάδα γονιδίων που έχει τη δυνατότητα να κινείται τόσο ενδοκυτταρικά όσο και μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Τα πιο γνωστά τρανσποζόνια είναι αυτά των σταφυλόκοκκων.

γ) Intergons: είναι σχηματισμοί που αποτελούνται από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια ιντεργκράση (συμβάλλει στη διαδικασία ενσωμάτωσης σε μόριο DNA) και μια ομάδα γονιδίων που αποτελούν τη γονιδιακή κασέτα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων γενετικών στοιχείων είναι τα δυο intergrons της *Salmonella typhimurium* που οδηγούν σε πολυανθεκτικότητα (Catry *et al.*, 2003).

Τα κινητά γενετικά στοιχεία (MGE, Mobile Genetic Elements) παίζουν σημαντικό ρόλο στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT, Horizontal Gene Transfer) στα βακτήρια. Ανάμεσα σε αυτά, στοιχεία ενσωμάτωσης και σύζευξης (ICEs, Integrative and Conjugative Elements) (γνωστά και ως τρανσποζόνια σύζευξης) είναι αυτομεταφερόμενα στοιχεία που είναι ευρέως διαδεδομένα στα βακτήρια και χαρακτηρίζονται από ενοποιητικές ιδιότητες και από ιδιότητες σύζευξης. Εκτός από τα γονίδια που εμπλέκονται στην κινητικότητα τους, στη ρύθμιση ή στη συντήρησή τους, μεταφέρουν και άλλους καθοριστικούς παράγοντες, ειδικά γονίδια αντιβιοαντοχής. (Haenni *et al.*, 2010).

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι φαίνεται να υπάρχει μεταφορά γονιδίων ανάμεσα στα βακτήρια ξεπερνώντας το φραγμό του είδους, του γένους, αλλά και μεταξύ πιο απομακρυσμένων συγγενικά βακτηρίων, ακόμα και μεταξύ Gram διαφορετικών βακτηρίων (Salyers *et al.*, 2004).

Δεδομένου ότι τα παθογόνα του ανθρώπου ήταν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά πριν τη χρήση αυτών των φαρμάκων για τη θεραπεία των λοιμώξεων, η προέλευση των καθοριστικών παραγόντων της αντιβιοαντοχής με οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT) πρέπει απαραίτητα να τοποθετείται στη μη παθογόνο μικροβιόσφαιρα. Σε κάποιες περιπτώσεις, οι ανθρώπινες κοινότητες μπορούν να παρέχουν αντιβιοαντοχή στα παθογόνα. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, τα γονίδια της αντιβιοαντοχής προέρχονται από την περιβαλλοντική μικροχλωρίδα. Ο όρος αντιβιοτικό επινοήθηκε αρχικά για να αναφέρεται στις ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και ήταν ικανές να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, αν και κάθε είδους φάρμακο, φυσικό ή συνθετικό, που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων ονομάζεται συχνά αντιβιοτικό στις μέρες μας. Εφόσον πολλά αντιβιοτικά παράγονται από περιβαλλοντικά βακτήρια, δεν αποκλείεται ότι οι οργανισμοί που παράγουν αντιβιοτικά μπορεί να είναι η προέλευση των γονιδίων αντοχής που αποκτώνται με οριζόντια μεταφορά, επειδή αυτοί οι μικροοργανισμοί πρέπει να έχουν συστήματα για να αποφεύγουν τη δράση των αντιμικροβιακών που παράγουν. Αν και αυτό έχει αποδειχθεί επίσημα σε λίγες περιπτώσεις, κάποια γονίδια αντοχής μπορεί να έχουν άλλους λειτουργικούς ρόλους στου οργανισμού καταγωγής τους, εκτός από την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Ανεξάρτητα από το λειτουργικό τους ρόλο σε μη κλινικά (φυσικά) περιβάλλοντα, είναι εμφανές ότι τα γονίδια αντιβιοαντοχής προέρχονται από περιβαλλοντικά βακτήρια, έτσι ώστε οι αλλαγές στα φυσικά οικοσυστήματα μπορεί να επιδράσουν στην αντιβιοαντοχή και επακόλουθα στην υγεία του ανθρώπου. Κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να προκαλούν λοιμώξεις μόνο σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (π.χ. σε ασθενείς με AIDS, που κάνουν χημειοθεραπεία ή μετά από μεταμόσχευση), σε εξασθενημένα άτομα ή σε άτομα με βασικές παθήσεις. Αυτοί οι οργανισμοί, που συνήθως δε μολύνουν υγιείς ανθρώπους, θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα. Σε κάποιες περιπτώσεις, τα συμβιωτικά βακτήρια του ανθρώπου προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις. Ωστόσο, κάποια περιβαλλοντικά βακτήρια είναι επίσης εξέχοντα ευκαιριακά παθογόνα. Ένα από τα χαρακτηριστικά των ευκαιριακών παθογόνων με περιβαλλοντική καταγωγή είναι ότι συνήθως παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία στα αντιβιοτικά (Martinez, 2009).

### **3.5.6 β) Βιοχημικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας**

#### **1. Μετάλλαξη της πρωτεΐνης-στόχο**

Οι συνθετικές ουσίες, όπως οι φλουοροκινολόνες, είναι απίθανο να απενεργοποιηθούν από τους ενζυμικούς μηχανισμούς που περιγράφονται παρακάτω. Ωστόσο, τα βακτήρια μπορούν να γίνουν ανθεκτικά μέσω μεταλλάξεων που καθιστούν την πρωτεΐνη-στόχο λιγότερο ευαίσθητη στον παράγοντα. Η αντοχή των φλουοροκινολονών οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις στα ένζυμα-στόχο, τις DNA-τοποϊσομεράσες. Η ευκολία με την οποία αυτού του είδους η ανθεκτικότητα μεταφέρεται σε άλλα κύτταρα με πλασμίδια εξαρτάται από τον τρόπο δράσης του φαρμάκου. Στις φλουοροκινολόνες, που σκοτώνουν τα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν οποιοδήποτε ένζυμο ευαίσθητο στο φάρμακο, η προσθήκη του γονιδίου που κωδικοποιεί ένα ανθεκτικό στο φάρμακο ένζυμο δεν καθιστά το βακτήριο πλήρως ανθεκτικό και η μεταφορά μέσω πλασμιδίου του μεταλλαγμένου γονιδίου-στόχο είναι απίθανο να συμβεί. Παρ' όλα αυτά, οι μεταλλάξεις θα επικρατούν όλο και περισσότερο με την κλωνική επιλογή παρουσία της πίεσης επιλογής.

Τα σουλφονικά φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμούς. Επιλέγουν για αντοχή στα φάρμακα τις μεταλλάξεις των αντίστοιχων ενζύμων. Στην περίπτωση αυτή, η υψηλού επιπέδου παραγωγή των ανθεκτικών στα φάρμακα ενζύμων-στόχων από πλασμίδια μπορούν να κάνουν ανθεκτικά τα βακτήρια και τα γονίδια αντοχής έχουν εξαπλωθεί ευρέως στα πλασμίδια.

## 2. Αδρανοποίηση του φαρμάκου

Αυτός είναι συνηθισμένος μηχανισμός αντοχής για αντιβιοτικά φυσικής προέλευσης, όπως οι αμινογλυκοσίδες (καναμυκίνη, τομπραμυκίνη, αμικασίνη), οι οποίες αδρανοποιούνται με ενζυμική φωσφορυλίωση (μέσω της αμινογλυκοσιδικής φωσφορυλτρανσφεράσης), με ακετυλίωση (μέσω της αμινογλυκοσιδικής ακετυλτρανσφεράσης) ή με αδενυλίωση (μέσω της αμινογλυκοσιδικής αδενυλτρανσφεράσης ή νουκλεοτιδοτρανσφεράσης) και οι β-λακτάμες (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και καρμπαπενέμες, όπως η ιμιπενέμη), οι οποίες αδρανοποιούνται με ενζυμική υδρόλυση από τις β-λακταμάσες, συνήθως στο περιπλάσμιο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα αδρανοποίησης μπορούν εύκολα να παράγουν ανθεκτικότητα ως πρόσθετα γενετικά συστατικά στα πλασμίδια.

Οι αμινογλυκοσίδες αδρανοποιούνται μέσω τροποποιήσεων που μειώνουν τα καθαρά θετικά φορτία αυτών των πολυκατιονικών αντιβιοτικών.

Β-λακτάμες: Μόνο λίγα χρόνια μετά την εμφάνιση της πενικιλίνης στην κλινική πράξη, ο *S. aureus* ανέπτυξε αντοχή που οφειλόταν σε μια β-λακταμάση που κωδικοποιούνταν για το λόγο αυτό από ένα γονίδιο πλασμιδίου. Οι β-λακταμάσες κατατάσσονται σε πολλές φυλογενετικές οικογένειες. Η κατηγορία Α περιλαμβάνει τα ένζυμα του *S. aureus* και τα TEM ένζυμα, ενώ η κατηγορία C αντιπροσωπεύει ένζυμα που κωδικοποιούνται από χρωμοσώματα (π.χ. AmpC) που βρίσκονται σε πολλά Gram αρνητικά βακτήρια. Αυτές οι δυο κατηγορίες έχουν παρόμοιο μηχανισμό με τις πρωτεάσες της σερίνης, ενώ τα ένζυμα της κατηγορίας Β είναι μεταλλοένζυμα που υδrolύουν αποτελεσματικά τις καρμπαπενέμες.

Ως απάντηση στην αντοχή στις β-λακτάμες, αναπτύχθηκαν ποικίλες β-λακτάμες. Οι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς, όπως η κεφαλοριδίνη και η κεφαζολίνη, υδρολύθηκαν γρήγορα από τα TEM και AmpC, οι κεφαμισίνες (όπως η κεφοξιτίνη) και οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς ήταν αρχικά ανθεκτικές και στους δυο τύπους ενζύμων. Ωστόσο, η χρήση τους στη κλινική πράξη ακολουθήθηκε από την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών. Οι κεφαλοσπορίνες τέταρτης γενιάς (κεφεπίμη, κεφπιρόμη) είναι περισσότερο ανθεκτικές στην υδρόλυση από το ένζυμο AmpC. Ωστόσο, η συνεχής πίεση επιλογής είχε ως αποτέλεσμα την επιλογή πλασμιδίων που παράγουν μεταλλάξεις κοινών ενζύμων που μπορούν σήμερα να υδρολύουν τις τρίτης και κάποιες φορές τις τέταρτης γενιάς κεφαλοσπορίνες. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται ESB� (Extended Spectrum B-lactamases, ευρέως φάσματος β-λακταμάσες).

### 3. Απόκτηση γονιδίων για λιγότερο ευαίσθητες πρωτεΐνες-στόχους από άλλα είδη

Οι αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τους στόχους της πενικιλίνης, τη DD-τρανσπεπτιδάση ή τις συνδετικές πρωτεΐνες της πενικιλίνης (PBPs), αποκάλυψαν ότι η αντοχή στην πενικιλίνη του *Streptococcus pneumoniae* οφειλόταν στην παραγωγή πρωτεϊνών, μέρη από τις οποίες προέρχονταν από άλλους οργανισμούς. Ο *Streptococcus pneumoniae* είναι ένας οργανισμός ικανός για φυσική μεταμόρφωση και μπορεί να εισάγει ξένο DNA. Παρόμοιος μηχανισμός αντοχής στην πενικιλίνη βρέθηκε, επίσης, και σε ένα άλλο οργανισμό ικανό για φυσική μεταμόρφωση, τη *Neisseria meningitidis*. Ακραία περίπτωση αυτής της εκδοχής είναι η γέννηση του MRSA. Τα στελέχη του MRSA περιέχουν μια νέα ανθεκτική στην πενικιλίνη PBP, που ονομάζεται PBP-2A ή 2', η έκφραση της οποίας συχνά προκαλείται από τη μεθικιλίνη και άλλες β-λακτάμες. Το γονίδιο για αυτή τη νέα PBP βρίσκεται σε ένα μεγάλο τμήμα DNA, το οποίο προφανώς προήλθε από έναν οργανισμό διαφορετικό του *S. aureus* και περιέχει επίσης άλλα γονίδια αντοχής. Ο *S. aureus* δεν είναι φυσικά μεταμορφώσιμος και δεν είναι ξεκάθαρο πως έγινε αυτή η οριζόντια μεταφορά του μεγάλου τμήματος DNA.

#### 4. Παράκαμψη του στόχου

Η βανκομυκίνη, ένα προϊόν ζύμωσης από στρεπτομύκητες, έχει έναν ασυνήθιστο τρόπο δράσης. Αντί να αναστέλλει κάποιο ένζυμο, δεσμεύεται σε ένα υπόστρωμα, το συνδεδεμένο με λιπίδια δισακχαροπενταπεπτιδίο, έναν πρόδρομο της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Εξαιτίας αυτού του μηχανισμού, πολλοί θεωρούσαν ότι ήταν αδύνατο να αναπτυχθεί ανοχή στη βανκομυκίνη. Ωστόσο, η ανοχή στη βανκομυκίνη είναι σήμερα διαδεδομένη στους εντερόκοκκους, συνήθεις κατοίκους της εντερικής μας οδού. Επειδή οι εντερόκοκκοι είναι φυσικά ανθεκτικοί στις β-λακτάμες, τις αμινογλυκοσίδες, τα μακρολίδια και την τετρακυκλίνη, αυτά τα ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη εντερόκοκκων επικρατούν στο νοσοκομειακό περιβάλλον, αποικίζουν τους ασθενείς και προκαλούν λοιμώξεις που δε θεραπεύονται εύκολα. Η μελέτη του μηχανισμού ανοχής έδειξε ότι το άκρο του πενταπεπτιδίου, D-Ala-D-Ala, όπου δεσμεύεται η βανκομυκίνη, είχε αντικατασταθεί στο ανθεκτικό στέλεχος από μια εστερική δομή, D-Ala-D-λακτικό οξύ, που δε δεσμεύεται με τη βανκομυκίνη. Η παραγωγή αυτής της αλλοιωμένης δομής απαιτεί τη συμμετοχή πολλών εισαγόμενων γονιδίων.

#### 5. Παρεμπόδιση της πρόσβασης του φαρμάκου στο στόχο

Η πρόσβαση του φαρμάκου στο στόχο μπορεί να μειωθεί τοπικά. Μπορεί, επίσης, να μειωθεί από μια ενεργή διαδικασία εκροής. Στα Gram αρνητικά βακτήρια η πρόσβαση μπορεί να μειωθεί γενικά με μείωση της εκροής σε ολόκληρη την εξωτερική μεμβράνη.

#### 3.5.6 γ) Πηγές γονιδίων ανοχής

Υπάρχουν πολλά γονίδια ανοχής που στηρίζονται σε πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς. Προέρχονται από:

### 1. Οργανισμούς που παράγουν αντιβιοτικά

Κάποια από τα γονίδια αντοχής στις αμινογλυκοσίδες προέρχονται από στρεπτομύκητες που παράγουν αυτά τα αντιβιοτικά. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την αντοχή στη βανκομυκίνη φαίνεται ότι προέρχονται με παρόμοιο τρόπο. Η ανθεκτικότητα σε αυτή την περίπτωση απαιτεί την παραγωγή πολλών νέων ενζύμων και είναι απίθανο τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα να εξελίχθηκαν στις δεκαετίες μετά την ανακάλυψη της βανκομυκίνης. Πράγματι, τα γονίδια στα ανθεκτικά στη βανκομυκίνη κλινικά στελέχη εντερόκοκκων βρέθηκε ότι είναι ομόλογα με εκείνα που βρέθηκαν στους στρεπτομύκητες που παράγουν βανκομυκίνη και οργανώνονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, παρατήρηση που δεν αφήνει καμία αμφιβολία για την καταγωγή αυτών των γονιδίων αντοχής.

### 2. Μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος, ειδικά του εδάφους

Κάποια γονίδια αντοχής βρίσκονται στο χρωμόσωμα περιβαλλοντικών βακτηρίων. Κλασική περίπτωση είναι το γονίδιο *ampC* στο περιβαλλοντικό γένος των Εντεροβακτηριακών, όπως τα *Enterobacter*, *Serratia* και *Proteus*, και στον οργανισμό του εδάφους *P. aeruginosa*. Αυτά τα γονίδια δε δείχνουν σημάδια ότι έχουν εισαχθεί στο πρόσφατο παρελθόν (Nikaido, 2009).

## 3.5.7 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας του *Staphylococcus aureus* στα αντιβιοτικά

### 3.5.7 α) β-λακταμάσες (μηχανισμός ενζυμικής αδρανοποίησης του αντιβιοτικού)

Σύντομα μετά την εισαγωγή των β-λακταμικών αντιβιοτικών αναγνωρίστηκαν ανθεκτικά στελέχη *Staphylococcus aureus* που μετέφεραν ένζυμα που υδρολύουν τις β-λακτάμες. Έχουν περιγραφεί πάνω από 200 διαφορετικοί τύποι β-λακταμασών. Το ένζυμο (*blaZ*) που κωδικοποιεί αυτά τα ένζυμα μπορεί να βρίσκεται είτε σε πλασμίδια είτε σε χρωμόσωμα και μπορεί να μεταφέρεται οριζόντια μέσω πλασμιδίων. Η έκφραση του *blaZ* ρυθμίζεται από δυο γονίδια: το *blaI* που καταστέλλει τη μεταγραφή του *blaZ* και το *blaR1* που παίζει ρόλο στην επαγωγή του *blaZ* παρουσία των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Tikofsky *et al.*, 2002).



### 3.5.7 β) Τροποποιημένη PBP-σύνθεση PBP2a (μηχανισμός μεταβολής του μορίου-στόχου), Ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)

Οι ανθεκτικές στις β-λακταμάσες πενικιλίνες, όπως η μεθικιλίνη και οι κεφαλοσπορίνες, εισήχθησαν μεταγενέστερα. Ωστόσο, στελέχη του *Staphylococcus aureus* (ανθεκτικός στην πενικιλίνη *Staphylococcus aureus* ή MRSA) που είναι ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά σύντομα αναγνωρίστηκαν. Η αντοχή στη μεθικιλίνη είναι αποτέλεσμα απόκτησης ξένου DNA, του καθοριστικού παράγοντα *mec*, που ενσωματώνεται σε ένα συγκεκριμένο χρωμόσωμα. Το γονίδιο *mecA*, που βρίσκεται σε αυτόν τον παράγοντα, κωδικοποιεί την εναλλακτική συνδετική πρωτεΐνη της πενικιλίνης 2a (PBP2a), μια πρωτεΐνη με χαμηλή συγγένεια με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Εφόσον το PBP2a δεν αναστέλλεται από τις β-λακτάμες, ο *S. aureus* μπορεί να συνεχίσει να συνθέτει πεπτιδογλυκάνη για ένα σταθερό δομικά κυτταρικό τοίχωμα.

Επιπρόσθετα με το *mecA*, κι άλλα γονίδια σχετίζονται με τη ρύθμιση της αντίστασης στη μεθικιλίνη και εντοπίζονται σε αυτό τον καθοριστικό παράγοντα: *mecI* και *mecR1*. Οι λειτουργίες τους είναι παρόμοιες με εκείνες του *blaI* και του *blaR1*. Το *mecI* καταστέλλει τη μεταγραφή του *mecA* και του *mecR1* για τη μεταγωγή. Το ρυθμιστικό σύστημα *bla* μπορεί, επίσης, να βρεθεί στους ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη *S. aureus*, αλλά θα εκτελεί λιγότερο αυστηρό έλεγχο της έκφρασης από το ρυθμιστικό σύστημα *mec*. Πρόσθετοι παράγοντες, όπως τα γονίδια *fem* (παράγοντας απαραίτητος για την αντοχή στη μεθικιλίνη), τα γονίδια *lrm* (λιπόφιλες πρωτεΐνες) και τα γονίδια *aux* (βοηθητικά) επηρεάζουν επίσης την έκφραση της αντοχής στη μεθικιλίνη.

Η οριακή αντοχή στις β-λακτάμες αρχικά θεωρούνταν ότι οφειλόταν σε εξωτερικούς μηχανισμούς που οδηγούσαν στην υπερπαραγωγή β-λακταμασών. Ωστόσο, η οριακή αντοχή είναι πιθανώς πιο περίπλοκη. Μπορεί, επίσης, να εμπλέκονται εγγενείς μηχανισμοί που οδηγούν σε τροποποίηση των συνδετικών πρωτεϊνών της πενικιλίνης (όπως το *mecA* που κωδικοποιεί το PBP2a) ή μεταλλαγές στα κανονικά PBPs. Επιπρόσθετα, υπάρχουν πιο γενικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας, όπως μειωμένη διαπερατότητα της μεμβράνης ή ενεργή εκροή συνδεδεμένη με τη μεμβράνη. Συνδυασμοί δύο ή περισσότερων από τους παραπάνω μηχανισμούς μπορούν να εξηγήσουν την ποικιλία της αντιβιοαντοχής μέσα στο πεδίο ανθεκτικότητας.

Άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας του *S. aureus* στα αντιβιοτικά, εκτός από τις β-λακτάμες, έχουν μελετηθεί λιγότερο διεξοδικά. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα, αλλά η ερυθρομυκίνη, η πιρλιμυσίνη και η τετρακυκλίνη παίρνουν μέρος στα θεραπευτικά πρωτόκολλα για τις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες (Tikofsky *et al.*, 2002).

Ακραία περίπτωση αυτής της εκδοχής είναι η δημιουργία του MRSA. Τα στελέχη του MRSA περιέχουν μια νέα ανθεκτική στην πενικιλίνη PBP, που ονομάζεται PBP-2A ή 2', η έκφραση της οποίας συχνά προκαλείται από τη μεθικιλίνη και άλλες β-λακτάμες. Το γονίδιο για αυτή τη νέα PBP βρίσκεται σε ένα μεγάλο τμήμα DNA, το οποίο προφανώς προήλθε από έναν οργανισμό διαφορετικό του *S. aureus* και περιέχει επίσης άλλα γονίδια αντοχής. Ο *S. aureus* δεν είναι φυσικά μεταμορφώσιμος και δεν είναι ξεκάθαρο πώς έγινε αυτή η οριζόντια μεταφορά του μεγάλου τμήματος DNA (Nikaido, 2009).

Στα μικρά μηρυκαστικά η εξάπλωση των στελεχών MRSA είναι αμφιλεγόμενη. Τα στελέχη MRSA χαρακτηρίζονται από την παρουσία του γονιδίου *mecA* που κωδικοποιεί τη χαμηλής συγγένειας συνδετική πρωτεΐνη της πενικιλίνης, η οποία μεσολαβεί για την αντοχή σε όλες τις κατηγορίες των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Λίγες μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα στελέχη του *S. aureus*, που απομονώθηκαν από γάλα προβατίνων με υποκλινική μαστίτιδα, δεν μετέφεραν το γονίδιο *mecA* ή ότι τα λίγα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στη μεθικιλίνη ήταν πιθανώς ανθρώπινης καταγωγής (Virdis *et al.*, 2010).

### **3.5.7 γ) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στα μακρολίδια**

Η ερυθρομυκίνη είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο ενδομαστικά αντιβιοτικό και είναι διαθέσιμο για θεραπεία και κατά τη γαλακτοπαραγωγική περίοδο και κατά την ξηρή περίοδο των αγελάδων. Έχουν περιγραφεί πολλαπλοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας. Κάποια στελέχη *S. aureus* κατέχουν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη γονίδια μεθύλασης (*ermA*, *ermB* και *ermC*) που κωδικοποιούν μια αλλαγή στο ριβοσωμικό RNA που εμποδίζει τη σύνδεση των μακρολιδίων, με αποτέλεσμα ένα υψηλό επίπεδο αντοχής. Σε μια μελέτη που έγινε από τους Khan *et al.* (2000) το γονίδιο *ermA*, που εντοπίζεται σε

ένα τρανσποζόνιο, φαίνεται να κυριαρχεί. Βρέθηκε στο 91% των στελεχών του *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα αγελαδινού γάλακτος. Οι μηχανισμοί εκροής μακρολιδίων έχει, επίσης, προσδιοριστεί ότι εμποδίζουν τη συσσώρευση των αντιβιοτικών στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου. Τα γονίδια *msrA* που κωδικοποιούν τις αντλίες εκροής βρίσκονται σε μεταθετά πλασμίδια και παρέχουν χαμηλού επιπέδου αντοχή σε σύγκριση με τα γονίδια *erm* (Tikofsky *et al.*, 2002).

### 3.5.7 δ) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στα γλυκοπεπτίδια

Το αντιβιοτικό γλυκοπεπτίδιο βανκομυκίνη πρωτοεμφανίστηκε το 1958. Ακολούθως, η βανκομυκίνη είναι η θεραπεία εκλογής για σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούνται από MRSA, ο οποίος γίνεται ολοένα περισσότερο διαδεδομένος παγκοσμίως ((Tikofsky *et al.*, 2002, Howden *et al.*, 2010). Για πολλά χρόνια δεν υπήρχε καμία ένδειξη ότι η αντοχή του *S. aureus* στη βανκομυκίνη θα αποτελούσε πρόβλημα (Howden *et al.*, 2010). Οι μέσης ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη *S. aureus* είναι σπάνιοι, αλλά αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Ιαπωνία και σχετίζονταν με αποτυχημένη θεραπευτική αγωγή (Tikofsky *et al.*, 2002). Επομένως, οι αρχικές αναφορές μειωμένης ευαισθησίας στη βανκομυκίνη κλινικών στελεχών *S. aureus* στην Ιαπωνία το 1997 προκάλεσαν σημαντική ανησυχία στην ιατρική κοινότητα (Howden *et al.*, 2010). Από τότε ακολούθησαν και άλλες αναφορές ανθεκτικών στη βανκομυκίνη σταφυλοκόκκων. Ο γενετικός μηχανισμός της αντοχής στη βανκομυκίνη των *S. aureus* δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά σχετίζεται φαινοτυπικά με επιτάχυνση της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος που οδηγεί σε λέπτυνση του κυτταρικού τοιχώματος. Θεωρητικά, αυτό το λεπτό κυτταρικό τοίχωμα είναι ικανό να παγιδεύει μεγάλες ποσότητες βανκομυκίνης και να προστατεύει το σημείο-στόχο (Tikofsky, 2002). Από τότε υπάρχει αβεβαιότητα σχετικά με την ιδανική εργαστηριακή ανίχνευση και τη σχέση της μειωμένης ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη του *S. aureus*, τις αλλαγές των breakpoints του CLSI για τη βανκομυκίνη έναντι του *S. aureus* και αυξημένη ανησυχία σχετικά με την αποτελεσματικότητα της βανκομυκίνης στη θεραπεία των λοιμώξεων από *S. aureus*. Η μειωμένη ευαισθησία στην τεϊκοπλανίνη του *S. aureus* αναφέρθηκε πριν από τις πρώτες αναφορές κλινικών στελεχών *S. aureus* από την Ιαπωνία με μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη (Howden *et al.*, 2010).

### **5.7.5 ε) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στις λινκοσαμίδες**

Ο επικρατέστερος μηχανισμός αντοχής για τις λινκοσαμίδες, στις οποίες ανήκει η πιρλιμυσίνη, είναι η ενζυμική μεταλλαγή του ριβοσωμικού RNA (Tikofsky *et al.*, 2002).

### **3.5.7 στ) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στις τετρακυκλίνες**

Η τετρακυκλίνη χρησιμοποιούνταν αρχικά ως παρεντερική και όχι ως ενδομαστική θεραπεία. Έχουν περιγραφεί τρεις μηχανισμοί αντοχής στην τετρακυκλίνη: προστασία του ριβοσωμικού RNA, αυξημένη δραστηριότητα των αντλιών εκροής και αδρανοποίηση του αντιβιοτικού από ένζυμα. Τα γονίδια της αντοχής που κωδικοποιούν τους μηχανισμούς αυτούς βρίσκονται σε μεταθέτες (τρανσποζόνια), σε συζεύξιμα πλασμίδια ή σε συζεύξιμους μεταθέτες. Μια κατηγορία συζεύξιμων μεταθετών μπορεί να αυτομεταφερθεί από στρεπτόκοκκους σε μια ποικιλία gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων. Το κυρίαρχο γονίδιο στους σταφυλόκοκκους, που κωδικοποιεί την ενεργό εκροή της τετρακυκλίνης, είναι το TetA (K) και εντοπίζεται πάνω σε ένα πλασμίδιο (Tikofsky *et al.*, 2002).

### **3.5.7 ζ) Μειωμένη ευαισθησία και αντοχή στη λινεζολίδα (οξάζολιδινόνες)**

Η ανάπτυξη αντίστασης στη λινεζολίδα σε κλινικά στελέχη *S. aureus* και εντερόκοκκων περιλαμβάνει μια γενιά μεταλλάξεων σε ένα από τα πολλαπλά 23S rRNA αντίγραφα του γονιδίου που αποτελούν στόχο του φαρμάκου και ακολουθούνται από ομόλογους ανασυνδυασμούς ανάμεσα στα εναπομείναντα 23S rRNA αντίγραφα του γονιδίου, π.χ. μια διαδικασία μετατροπής γονιδίου. Επιπλέον της ανθεκτικότητας στη λινεζολίδα, η μετατροπή γονιδίου εμπλέκεται επίσης στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στην πενικιλίνη των πνευμονιόκοκκων και, πιθανώς, στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στα μακρολίδια

των σταφυλόκοκκων, η οποία, όπως και η ανθεκτικότητα στη λινεζολίδα, φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αλλαγών στα rRNA οπερόνια (Miller *et al.*, 2008).

### 3.5.8 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των *Streptococcus* spp. στα αντιβιοτικά

Πολλά ICEs έχουν περιγραφεί στους στρεπτόκοκκους, ειδικά στο *Streptococcus pneumoniae* και τον *Streptococcus pyogenes*. Τα πιο πολλά από αυτά ανήκουν στην οικογένεια Tn916-Tn1545 και μεταφέρουν τον ευρέως διαδεδομένο παράγοντα αντοχής στην τετρακυκλίνη *tet* (M), όπως και επιπρόσθετους παράγοντες ανθεκτικότητας, όπως τα γονίδια αντοχής στην ερυθρομυκίνη *erm* (B) ή *mef* (A). Το γονίδιο *erm* (B) κωδικοποιεί μια μεθυλάση που προκαλεί μια μεταγραφική μεθυλίωση του 23S rRNA, έχοντας ως αποτέλεσμα διασταυρούμενη αντοχή στα μακρολίδια, τις λινκοσαμίδες και τη στρεπτογραμμίνη B (φαινότυπος MLS<sub>B</sub>). Αντιθέτως, το γονίδιο *mef* (A) κωδικοποιεί μια αντλία εισροής φαρμάκων που επηρεάζει μόνο τα 14- και 15-μακρολίδια (φαινότυπος M) (Haenni M. *et al.*, 2010).

Δυο κύριοι μηχανισμοί ευθύνονται για την ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη σε πολλά Gram θετικά βακτήρια: η τροποποίηση της τοποθεσίας-στόχου και η ενεργητική εκροή. Η τροποποίηση της τοποθεσίας-στόχου επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση της ανθεκτικής στην ερυθρομυκίνη μεθυλάσης που κωδικοποιείται από την κατηγορία *erm* γονιδίων. Οι μεθυλάσες προκαλούν μεταβολή στη διαμόρφωση του προκαρυωτικού ριβοσώματος, που οδηγεί σε μειωμένη σύνδεση των αντιβιοτικών μακρολίδια-λινκοσαμίδη-στρεπτογραμμίνης<sub>B</sub> (MLS<sub>B</sub>) στην τοποθεσία-στόχο στην υποομάδα 50S του ριβοσώματος. Η φαινοτυπική έκφραση της ανθεκτικότητας των MLS<sub>B</sub> στους στρεπτόκοκκους μπορεί να είναι είτε ενεργητική είτε επαγόμενη. Η εκροή των μακρολιδίων, που πραγματοποιείται από μια πρωτεΐνη της μεμβράνης που κωδικοποιείται από την κατηγορία *mef* γονιδίων, έχει εμφανιστεί πρόσφατα στο *Streptococcus pyogenes* και τον *Streptococcus pneumoniae* σε πολλές χώρες. Ως τη δεκαετία του 1980, οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι που σχηματίζουν μεγάλες αποικίες θεωρούνταν γενικά ευαίσθητοι στην ερυθρομυκίνη και την κλινδαμυκίνη, αλλά η ανθεκτικότητα εξαπλώθηκε ραγδαία τη δεκαετία του 1990. Ο επιπολασμός των ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων που σχηματίζουν

μεγάλες αποικίες ποικίλει και εξαρτάται από τη χώρα, την πίεση επιλογής, την ορολογική ομάδα, τον ορότυπο, την ηλικία και την εποχή (Uh Young *et al.*, 2007).

Στα είδη του *Streptococcus agalactiae* ανακαλύφθηκαν δυο νέες ομάδες ICEs: μια ομάδα ενσωματωμένη στο γονίδιο *rplL*, που κωδικοποιεί την 50S υποομάδα της πρωτεΐνης L7/L12 και η άλλη ομάδα στο γονίδιο της tRNA λυσίνης. Και οι δυο μεταφέρουν ένα τρανσποζόνιο με ένα οπερόνιο *mer* που κωδικοποιεί μια αναγωγή του υδραργύρου και ένα σύστημα μεταφοράς υδραργύρου, που αποτελούν τον κύριο μηχανισμό ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αυτό το βαρύ μέταλλο (Haenni *et al.*, 2010).

### 3.5.9 Ανθεκτικά στελέχη

Πολλά στελέχη παθογόνων έγιναν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά και κάποια έχουν γίνει ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, γνωστό ως το φαινόμενο της πολυανθεκτικότητας. Πράγματι, κάποια στελέχη έχουν γίνει ανθεκτικά πρακτικά σε όλους τους συνηθισμένους διαθέσιμους παράγοντες (Nikaido, 2009).

Ορισμένα παραδείγματα ανθεκτικών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες βακτηριακών στελεχών είναι τα ακόλουθα:

α) MRSA: πρόκειται για τη σύγχρονη μάστιγα των Μονάδων Εντατικής Θεραπείας ανά τον κόσμο και οφείλεται σε στελέχη του *Staphylococcus aureus* με ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη. Τα γονίδια που ελέγχουν την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό εδρεύουν σε τρανσποζόνια (Catry *et al.*, 2003). Ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) δεν είναι ανθεκτικός μόνο στη μεθικιλίνη (η οποία αναπτύχθηκε για να αντιμετωπιστούν οι *S. aureus* που παράγουν πενικιλινάσες), αλλά συνήθως και στις αμινογλυκοσίδες, τα μακρολίδια, την τετρακυκλίνη, τη χλωραμφαινικόλη και τις λινκοσαμίδες. Αυτά τα στελέχη είναι, επίσης, ανθεκτικά στα απολυμαντικά και ο MRSA μπορεί να δράσει ως κύρια πηγή ενδοноσοκομειακών λοιμώξεων. Η έρευνα είχε χρόνο να αντιδράσει απέναντι στην απειλή από τον MRSA. Έτσι, υπάρχουν πρόσφατα αναπτυγμένοι παράγοντες που είναι δραστικοί έναντι του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη MRSA, όπως η λινεζολίδα και η κινोπριστίνη/δαλφοπριστίνη (Nikaido, 2009).

β) Gram αρνητικά βακτήρια: Σε πολλά βακτήρια της κατηγορίας η ανθεκτικότητα οφείλεται σε συνδυασμό φραγμού της εξωτερικής μεμβράνης και του φαινομένου drug efflux και η μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας γίνεται μέσω πλασμιδίων (Catry *et al.*, 2003).

γ) *Salmonella typhimurium* DT104: δημιουργία πολυανθεκτικών στελεχών μέσω της μεταφοράς intergrons.

δ) *Listeria* spp.: ενώ στο παρελθόν ήταν ένα από τα πιο ευαίσθητα βακτήρια, τα τελευταία χρόνια φαίνεται να εμφανίζει ανθεκτικότητα που οφείλεται σε μεταφορά γονιδίων μέσω πλασμιδίων και τρανσοζονίων.

ε) Εντερόκοκκοι: Μετά τα MRSA στελέχη είναι τα πλέον γνωστά για την ανθεκτικότητά τους στη βανκομυκίνη (VRE) και πιστεύεται ότι η διάδοσή τους οφείλεται στην αλόγιστη κτηνιατρική πράξη (Catry *et al.*, 2003). Σύμφωνα με τη μελέτη των Sorrensen και συν., είναι δυνατή η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά τροφιμογενών στελεχών στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Σε αυτή τη μελέτη περιγράφεται η απομόνωση ανθεκτικών στη βανκομυκίνη στελεχών *Enterococcus faecium*, που προέρχονταν από πτηνά και ανθεκτικών στη βιρτζινιαμυκίνη στελεχών *E. faecium*, που προέρχονταν από χοίρους σε κόπρανά εθελοντών που κατανάλωναν ελεγχόμενα μολυσμένο κρέας πουλερικών και χοιρινό κρέας. Σε έρευνα των Levy και συν. παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού αντοχής στα αντιβιοτικά των στελεχών *E.coli* που απομονώθηκαν από εκτροφή πτηνών μετά από χορήγηση σιτηρεσίου εμπλουτισμένου σε τετρακυκλίνη (Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009).

Η ανθεκτικότητα των στρεπτόκοκκων και των εντερόκοκκων στις διάφορες κατηγορίες αντιμικροβιακών αυξάνεται παγκοσμίως. Η μειωμένη ευαισθησία ή η ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη και σε άλλες β-λακτάμες έχει αναφερθεί με ιδιαίτερη συχνότητα στην περίπτωση του *Streptococcus pneumoniae* και των viridans (από το λατινικό “viridis” που σημαίνει “πράσινο”) στρεπτόκοκκων. Η ανθεκτικότητα στα μακρολίδια και τις φλουοροκινολόνες έχει περιγραφεί στους viridans και τους β-αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους. Ιδιαίτερα η αντοχή στα γλυκοπεπτίδια είναι μια αυξανόμενη απειλή ανάμεσα στα είδη των εντερόκοκκων, ειδικά στον *Enterococcus faecium* και τον

*Enterococcus faecalis*. Εφόσον τα κλινικά στελέχη όλων των προηγούμενων ειδών μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες λοιμώξεις (σήψη, μηνιγγίτιδα, ενδοκαρδίτιδα), η ταχεία και ακριβής ταυτοποίηση και ο έλεγχος της αντιμικροβιακής ευαισθησίας είναι εξαιρετικά σημαντικοί. Για τα βακτήρια αυτά, η αξιολόγηση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με τις μεθόδους της διάχυσης δίσκων παρουσιάζει προβλήματα, αφού η τεχνική δεν παρέχει ποσοτικές τιμές. Στο πλαίσιο αυτό, το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, πρώην NCCLS) καθιέρωσε ότι τα στελέχη του *Streptococcus pneumoniae* δεν πρέπει να αναφέρονται ως ανθεκτικά στην πενικιλίνη ή μέσης ευαισθησίας με βάση μόνο τη ζώνη οξακιλλίνης  $\leq 19\text{mm}$ . Για τα στελέχη αυτά, οι τιμές της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) για την πενικιλίνη και την κεφοταξίμη/καφτριαζόνη ή τη μεροπενέμη είναι υποχρεωτικές. Η σωστή ανίχνευση της αντοχής στη βανκομυκίνη των εντερόκοκκων είναι, επίσης, κρίσιμη, αφού η διάχυση είναι δύσκολη για μεγάλα μόρια και τα ερμηνευτικά κριτήρια βασίζονται σε περιορισμένες διαφορές στη ζώνη αναστολής. Οι τιμές της MIC μπορεί να παρέχουν περαιτέρω βοήθεια στη διάκριση των ειδών των εντερόκοκκων που μεταφέρουν διάφορους καθοριστικούς παράγοντες τύπου *van* (Brigante *et al.*, 2007).

Η πολυανθεκτικότητα στα βακτήρια προκύπτει από τη συσσώρευση, σε πλασμίδια ή τρανσποζόνια ανθεκτικότητας, γονιδίων, που το καθένα κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένο παράγοντα και/ή από τη δράση πολυδύναμων αντλιών εκροής, κάθε μια από τις οποίες μπορεί να αντλήσει προς τα έξω πάνω από έναν τύπο φαρμάκου (Nikaido, 2009).

Όταν πρωτοεμφανίστηκε η πενικιλίνη στις αρχές της δεκαετίας του 1940 ο *S. aureus* ήταν ομοιόμορφα ευαίσθητος σε αυτό το φάρμακο. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 αναπτύχθηκε ευρεία αντοχή στην πενικιλίνη, που ακολουθήθηκε τη δεκαετία του 1970 από αυξημένη αντοχή στους νέους ημισυνθετικούς ανθεκτικούς στις πενικιλινάσες αντιμικροβιακούς παράγοντες (π.χ. μεθικιλίνη, οξακιλλίνη, ναφκιλλίνη). Ως τη δεκαετία του 1990, η αντοχή στις ημισυνθετικές πενικιλίνες είχε εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο, συμβιβάζοντας τη χρήση αυτών των φαρμάκων για εμπειρική θεραπεία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων σε ένα αριθμό περιοχών. Αυτό οδήγησε σε αυξημένη εξάρτηση από τη βανκομυκίνη για τη θεραπεία των επιβεβαιωμένων λοιμώξεων από ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA), όπως



και για την εμπειρική θεραπεία λοιμώξεων σε πληθυσμούς όπου ο επιπολασμός των MRSA είναι υψηλός (CDC, 2006). Μελέτες από τη Γαλλία και το Ηνωμένο Βασίλειο ανέφεραν υψηλό επιπολασμό του ανθεκτικού στην πενικιλίνη *S. aureus* (36,2%, 56%), ενώ στη Νορβηγία και τις Κάτω Χώρες βρέθηκε χαμηλό ποσοστό ανθεκτικών στελεχών (4-0%) (Kalmus *et al.*, 2011).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα για τα πρότυπα αντιβιοαντοχής για τα συνήθη χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά υποδηλώνουν ότι η επίπτωση για τα στελέχη του *Staphylococcus aureus* που παράγουν β-λακταμάση και είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη φαίνεται να έχει παραμείνει σε αρκετά σταθερό επίπεδο (40-60%) τα τελευταία είκοσι χρόνια. Η Νορβηγία, η Σουηδία και η Δανία αποτελούν εξαίρεση, γιατί είχαν μια συνεχή χαμηλότερη αναλογία ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών (10-20%) από τις άλλες χώρες.

Το ποσοστό ίασης μετά τη θεραπεία για την κλινική και την υποκλινική μαστίτιδα έχει αποδειχθεί ότι είναι χαμηλότερο για τα στελέχη των β-λακταμάση θετικών *S. aureus* σε σύγκριση με τα στελέχη των β-λακταμάση αρνητικών *S. aureus* (Bennedsgaard *et al.*, 2006).

Αναφορές που έγιναν τη δεκαετία του 1990 πρότειναν ότι η ευαισθησία του *S. aureus* στη βανκομυκίνη άλλαξε. Το Μάιο του 1996 η πρώτη επιβεβαιωμένη λοίμωξη από *S. aureus* μέσης ευαισθησίας στη βανκομυκίνη (VISA) αναφέρθηκε σε ασθενή στην Ιαπωνία. Επακόλουθα, λοιμώξεις από στελέχη VISA αναφέρθηκαν σε ασθενείς στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Ευρώπη και την Ασία. Αν και ενδοноσοκομειακή εξάπλωση στελεχών VISA δεν παρατηρήθηκε σε νοσοκομεία στις Η.Π.Α., αναφορές από τη Γαλλία και τη Δανία προτείνουν ότι η μετάδοση συνέβη σε ένα νοσοκομείο και η μετάδοση ετερο-ανθεκτικών στελεχών *S. aureus* (π.χ. στελέχη ευαίσθητα στη βανκομυκίνη που περιέχουν μη ευαίσθητους στη βανκομυκίνη υποπληθυσμούς) συνέβη στην Ιαπωνία, το Χονγκ Κονγκ και αλλού. Από το Σεπτέμβριο του 2006 έχουν αναφερθεί έξι λοιμώξεις από ανθεκτικό στη βανκομυκίνη *S. aureus* (VRSA) σε ασθενείς από τις Ηνωμένες Πολιτείες. Όλα τα στελέχη VRSA περιείχαν το ανθεκτικό στη βανκομυκίνη γονίδιο, *vanA*, που συχνά βρίσκεται στους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη εντερόκοκκους.

Η βανκομυκίνη είναι αναποτελεσματική για τη θεραπεία των λοιμώξεων από VRSA. Τα δεδομένα που έχουν δημοσιευθεί υποδηλώνουν ότι οι λοιμώξεις που οφείλονται σε στελέχη *S. aureus* για τα οποία οι MICs της βανκομυκίνης είναι  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με βανκομυκίνη. Οι ασθενείς που έχουν μολυνθεί από αυτά τα στελέχη μπορεί να μην παρουσιάσουν κλινική βελτίωση μετά από θεραπεία με βανκομυκίνη, ειδικά όταν οι ασθενείς έχουν μόνιμους καθετήρες ή μη αναγνωρίσιμη εστία λοίμωξης.

Οι ορισμοί του CDC για την κατηγοριοποίηση των στελεχών *S. aureus* με μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη βασίζονται στα εργαστηριακά breakpoints που καθιερώθηκαν από το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI). Τα breakpoints του CLSI για το *S. aureus* και τη βανκομυκίνη τροποποιήθηκαν τον Ιανουάριο του 2006:

- Ευαίσθητος στη βανκομυκίνη *S. aureus* (Vancomycin-susceptible *S. aureus*, VSSA): MIC βανκομυκίνης  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$
- Μέσης ευαισθησίας στη βανκομυκίνη *S. aureus* (Vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA): MIC βανκομυκίνης = 4-8  $\mu\text{g/ml}$
- Ανθεκτικός στη βανκομυκίνη *S. aureus* (Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA): MIC βανκομυκίνης  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$

Τα ακρωνύμια VSSA, VISA και GISA (μέσης ευαισθησίας στα γλυκοπεπτίδια *S. aureus*, στα γλυκοπεπτίδια ανήκουν και η βανκομυκίνη και η τεϊκοπλανίνη) χρησιμοποιούνται για να υποδείξουν τα στελέχη του *S. aureus* με μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη. Ο όρος VRSA έχει χρησιμοποιηθεί από Ιάπωνες και Ευρωπαίους ερευνητές για να δηλώσουν στελέχη *S. aureus* για τα οποία οι MICs της βανκομυκίνης είναι 8  $\mu\text{g/ml}$  και έχουν συσχετιστεί με φαινομενικά αποτυχημένες θεραπείες. Στις Η.Π.Α. ο όρος VRSA χρησιμοποιείται για στελέχη *S. aureus* για τα οποία οι MICs της βανκομυκίνης είναι  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ . Τα ακρωνύμια VISA και GISA προέρχονται από ερμηνευτικά κριτήρια που εκδόθηκαν από το CLSI. Ενώ ο όρος GISA μπορεί να είναι πιο συγκεκριμένος για στελέχη μέσης ευαισθησίας στη βανκομυκίνη και την τεϊκοπλανίνη, δεν είναι όλα τα VISA στελέχη μέσης ευαισθησίας στην τεϊκοπλανίνη. Επομένως, ο όρος VISA είναι ο πιο ακριβής και ευρέως χρησιμοποιούμενος όρος.

Στις μέρες μας, τα στελέχη VISA (MIC βανκομυκίνης = 4-8  $\mu\text{g/ml}$ ) χαρακτηρίζονται από ένα μηχανισμό αντοχής που δεν μπορεί να μεταφερθεί στα ευαίσθητα στελέχη και σχετίζεται συνήθως με έκθεση στη βανκομυκίνη. Επομένως, η πιθανότητα μετάδοσης με επαφή και η διατήρηση του VISA φαινότυπου απουσία πίεσης από τη βανκομυκίνη πρέπει να αναμένεται να είναι χαμηλή.

Αντίθετα, τα στελέχη VRSA (MIC βανκομυκίνης  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ) χαρακτηρίζονται από την έκφραση του γονιδίου *vanA* που εδρεύει στο στοιχείο Tn1546 που αποκτήθηκε από έναν *Enterococcus* spp. Επομένως, αυτή η ανθεκτικότητα μπορεί πιθανότατα να μεταφερθεί σε ευαίσθητα στελέχη ή σε άλλους οργανισμούς (CDC, 2006).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ

### 4.1 Γενικά για τη βιολογική παραγωγή

Αν και η βιολογική γεωργία είναι η παλαιότερη μορφή γεωργίας στη γη, το ενδιαφέρον για αυτές τις μεθόδους έχει επανεμφανιστεί τα τελευταία χρόνια. Οι προπολεμικές τεχνολογίες εκβιομηχανίστηκαν τη δεκαετία του 1940 και έκαναν εφικτή την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων τροφίμων οικονομικά. Δυστυχώς, αυτό είχε σα συνέπεια περιβαλλοντικά και κοινωνικά κόστη.

Ως απάντηση στη βιομηχανοποίηση, το ενδιαφέρον επιστρέφει σε πιο βιώσιμες μεθόδους καλλιέργειας στην Ευρώπη και στις Ηνωμένες Πολιτείες. Στην Αυστρία ο Rudolf Steiner ήταν υποστηρικτής της βιοδυναμικής γεωργίας, ενώ στην Αγγλία ο Northbourn επινόησε τον όρο «βιολογικός». Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει βιώσιμα συστήματα γεωργίας που ήταν δυναμικά και ισορροπημένα και στηρίζονταν ελάχιστα σε εξωτερικούς πόρους.

Το 1940 ο Arthur Howard δημοσίευσε τη Γεωργική Διαθήκη (*An Agricultural Testament*), μια πραγματεία για τη γονιμότητα του εδάφους και την αποκατάσταση. Στις Ηνωμένες Πολιτείες ο J.I. Rodale διάβασε το έργο του Howard και εγκατέστησε μια εκτροφή στην Πενσυλβάνια για να εφαρμόσει τις γνώσεις που απέκτησε. Το 1942 άρχισε να δημοσιεύει το Βιολογική Γεωργία και Κηπουρική. Ο Rodale προώθησε την ιδέα ότι η μακροπρόθεσμη υγεία του εδάφους εξαρτάται από τα υψηλά επίπεδα οργανικής ύλης για την αποκατάσταση της ισορροπίας των θρεπτικών συστατικών και τη διατήρηση της υγρασίας. Υποστήριξε επίσης ότι τα εξωτερικά χημικά πρόσθετα κατέστρεφαν τη μικροβιακή χλωρίδα που ήταν απαραίτητη για υγιές έδαφος. Το Ινστιτούτο Rodale δημιουργήθηκε το 1947. Αποστολή αυτού του οργανισμού ήταν να διεξάγει έρευνα και να προωθήσει την εκπαίδευση στις βιώσιμες γεωργικές πρακτικές και την κομποστοποίηση. Το ενδιαφέρον για αυτές τις γεωργικές πρακτικές συνέχισε να αυξάνεται στη δεκαετία του 1980. Η συμμετοχή του USDA βοήθησε να ιδρυθεί πρόγραμμα Αειφόρου Γεωργικής Έρευνας και Εκπαίδευσης (Sustainable Agricultural Research and Education, SARE) που παρέχει χρηματοδότηση για πρωτοβουλίες στις

βιώσιμες μεθόδους. Το Ινστιτούτο Rodale δημιουργήθηκε το 1947. Αποστολή αυτού του οργανισμού ήταν να διεξάγει έρευνα και να προωθήσει την εκπαίδευση στις βιώσιμες γεωργικές πρακτικές και την κομποστοποίηση. Το ενδιαφέρον για αυτές τις γεωργικές πρακτικές συνέχισε να αυξάνεται στη δεκαετία του 1980.

Στο επίπεδο του USDA, τα ποιοτικά πρότυπα για το βιολογικό γάλα δε διαφέρουν από εκείνα για το συμβατικό γάλα. Στο επίπεδο του επεξεργαστή, μπορεί να υπάρχουν διαφορές, όπως αναλύεται παρακάτω για την υγεία του μαστού.

Το γάλα είναι μια γενναιόδωρη πηγή πολύτιμων θρεπτικών συστατικών (ενέργεια, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, βασικά μέταλλα και βιταμίνες) και οι καταναλωτές ενημερώνονται όλο και περισσότερο για τη σχέση της διατροφής με την υγεία. Πολλοί αναζητούν βιολογικό κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα και περιμένουν ότι τα προϊόντα αυτά θα έχουν μεγαλύτερα οφέλη για την υγεία από τα παραγόμενα με συμβατικές μεθόδους προϊόντα. Πολλές έρευνες καταναλωτών έχουν αναγνωρίσει το ενδιαφέρον για τα οφέλη της υγείας, όπως επίσης για τη διατήρηση του περιβάλλοντος και ανησυχίες για την ευζωία των ζώων ως κινητήριους παράγοντες για την αγορά βιολογικών προϊόντων (Tikofsky, 2005).

Το ενδιαφέρον των καταναλωτών για την υγεία και την ασφάλεια των τροφίμων συνεχώς αυξάνεται και δημιουργεί ένα υψηλό επίπεδο στην αγορά για τα τρόφιμα που είναι ελεύθερα από πιθανή έκθεση σε φυτοφάρμακα, ορμόνες και αντιβιοτικά. Για να ανταποκριθεί σε αυτό το αυξανόμενο ενδιαφέρον η βιολογική γεωργία έχει καταστεί ένας από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους τομείς της αμερικανικής κτηνοτροφίας (Tikofsky *et al.*, 2002).

Τα βοοειδή, τα πρόβατα και οι αίγες αποτελούν σημαντικό ζωικό κεφάλαιο στις βιολογικές εκμεταλλεύσεις. Στο ιστορικό πλαίσιο της βιολογικής καλλιέργειας τα μηρυκαστικά αυτά θεωρούνταν κυρίως ως παραγωγοί φυσικού λιπάσματος. Τα βασικά πρότυπα και οι αρχές της βιολογικής καλλιέργειας της IFOAM αποτέλεσαν την πλατφόρμα για πολλές διαπραγματεύσεις κρατικών ρυθμίσεων της βιολογικής κτηνοτροφίας. Καθορίζουν τις ελάχιστες απαιτήσεις για πιστοποίηση ως προϊόν βιολογικής παραγωγής στην εγχώρια αγορά και για τρόφιμα που εισάγονται από άλλες χώρες. Ο κανονισμός της Ευρωπαϊκής Ένωσης 1804/99/EK είναι ένας από τους πιο

ακριβής νομοθετικούς κανονισμούς της παγκόσμιας βιολογικής κτηνοτροφίας (Kyriazakis και Zervas, 2002).

Η στάση απέναντι στα ζωικά προϊόντα έχει αλλάξει απότομα στην Ευρώπη τις τελευταίες δεκαετίες, αλλά προφανώς υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των χωρών. Σταθμίζοντας τις διάφορες στάσεις στις διάφορες περιοχές της Ευρώπης, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι μέχρι πριν από 30 χρόνια οι ανησυχίες σχετικά με την αγορά κρέατος αφορούσαν κυρίως την τιμή, αλλά μόλις λίγα χρόνια αργότερα η προσοχή μετακινήθηκε προς την ποιότητα, την υγεία και τη διατροφή. Τα τελευταία 20 χρόνια, το θέμα της υγείας γίνεται όλο και περισσότερο σημαντικό, όπως έδειξε η εμπειρία από τη μεγάλη λίστα των κρίσεων των ζωικών προϊόντων: *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, ΣΕΒ (BSE), φυματίωση, πυρετός των χοίρων και αφθώδης πυρετός. Εξαιτίας της προσοχής των μέσων ενημέρωσης και των θεμάτων διατροφής, οι καταναλωτές δε θεωρούν πλέον τα ζωικά προϊόντα υγιεινά. Οι βιολογικοί παραγωγοί πρέπει να εκμεταλλευτούν αυτή την απίστευτη αλλαγή στάσης για να κερδίσουν μερίδιο στην αγορά. Στις μέρες μας οι Ευρωπαίοι καταναλωτές πιστεύουν ότι τα βιολογικά τρόφιμα δεν περιέχουν κατάλοιπα, παράγονται με περιβαλλοντικά φιλικό τρόπο και με σεβασμό στην ευζωία, έχουν καλύτερη γεύση και είναι περισσότερο υγιεινά. Εφόσον τα βιολογικά τρόφιμα θεωρούνται ως πιο ακριβά στην παραγωγή, η υψηλότερη τιμή τους θεωρείται επίσης δικαιολογημένη. Προφανώς, όλες αυτές οι πεποιθήσεις δεν έχουν αποδειχθεί επιστημονικά, αλλά αυτό δε θεωρείται μεγάλης σημασίας από τους καταναλωτές (Rosati, Aumaitre, 2004).

Τα τελευταία χρόνια υπήρξε αυξημένη προσοχή στη βιολογική γεωργία. Σύμφωνα με πρόσφατες στατιστικές, το 3,9% της καλλιεργούμενης γης, το 2,1% της συνολικής παραγωγής γάλακτος και το 2,6% (6.800 αγελάδες) των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στη Νορβηγία διαχειρίζονται βιολογικά (Garino *et al.*, 2010).

Πολλοί καταναλωτές είναι αυξανόμενα σκεπτικοί σχετικά με τις συμβατικές μεθόδους στην παραγωγή τροφίμων και οι έμποροι τροφίμων ενδιαφέρονται ολοένα και περισσότερο να διαφοροποιήσουν τα προϊόντα τους στην αγορά. Το 2007 η Ένωση Βιολογικού Εμπορίου ανέφερε ότι οι πωλήσεις των οργανικών βιολογικών τροφίμων αυξήθηκαν κατά 18% που αντιστοιχεί σε 20 εκατομμύρια δολάρια σε πωλήσεις (περίπου 2,8% του συνόλου των πωλήσεων τροφίμων στις Η.Π.Α.). Τα γαλακτοκομικά

προϊόντα (16%) είναι δεύτερα μετά τα φρούτα και τα λαχανικά (40%) ως ποσοστό του συνόλου των πωλήσεων βιολογικών τροφίμων (Ruegg, 2009).

#### **4.1.1 Η βιολογική παραγωγή γάλακτος**

Η βιολογική γαλακτοκομική παραγωγή μπορεί να οριστεί από ένα σύνολο βασικών ιδεών και αξιών. Στο συνολικό επίπεδο του αγροκτήματος, η ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών, η εγγύτητα μεταξύ της κοινότητας των αγροκτημάτων και των καταναλωτών και η αρμονία των επιπέδων στο αγρόκτημα (π.χ. αριθμός ζώων ανά εκτάριο) είναι σημαντικά (Vaarst, 2001).

Η αυξημένη ζήτηση των καταναλωτών για βιολογικά γαλακτοκομικά προϊόντα είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των γαλακτοπαραγωγικών εκμεταλλεύσεων που μετατρέπονται σε βιολογικές. Ανάμεσα στο 2000 και το 2005 ο αριθμός των πιστοποιημένων βιολογικών αγελάδων στις Η.Π.Α. αυξήθηκε από 38.196 σε 87.082 (USDA, 2006) και αναμένεται συνεχιζόμενη αύξηση. Μεγάλο μέρος αυτής της αύξησης αναμένεται να είναι αποτέλεσμα της μετατροπής ήδη υπάρχοντων συμβατικών εκμεταλλεύσεων σε βιολογικές.

Η απαίτηση των καταναλωτών για βιολογικά τρόφιμα οφείλεται κατά ένα μέρος στην ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων που παράγονται με συμβατικές μεθόδους. Μια έρευνα που ανατέθηκε από βιολογικές εκμεταλλεύσεις έδειξε ότι το 70% των Αμερικανών καταναλωτών εξέφρασε τουλάχιστον μέτρια ανησυχία για τους κινδύνους για την υγεία που σχετίζονται με τη χρήση εντομοκτόνων και αντιβιοτικών στην παραγωγή τροφίμων (Roper Public Affairs, 2004).

Παρόλο που οι καταναλωτές μπορεί να αντιλαμβάνονται ότι το γάλα από τα βιολογικά κοπάδια είναι καλύτερο ποιοτικά από το γάλα των συμβατικών κοπαδιών, υπάρχει ένας διάχυτος μύθος ανάμεσα στους επαγγελματίες του γαλακτοκομικού τομέα ότι η ποιότητα του γάλακτος που παράγεται από βιολογικές γαλακτοπαραγωγές εκτροφές είναι σημαντικά χαμηλότερη από την ποιότητα του γάλακτος που παράγεται από

ανάλογες συμβατικές γαλακτοπαραγωγές εκτροφές. Καμία από τις δύο απόψεις δεν επαληθεύεται από τα διαθέσιμα δεδομένα.

Οι προτιμήσεις των καταναλωτών για διαφοροποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν σαν αποτέλεσμα τη δραματική ανάπτυξη του τομέα της βιολογικής γαλακτοπαραγωγής και η ανάπτυξη αυτή αναμένεται να συνεχιστεί. Είναι σημαντικό για τους ερευνητές να καταλάβουν ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές στα βιολογικά πρότυπα μεταξύ των χωρών και σε μερικές χώρες υπάρχουν επιπλέον διαφορές ανάμεσα στις εταιρείες πιστοποίησης. Συνέπεια αυτών των διαφορών είναι ότι ο όρος βιολογική παραγωγή δεν καθορίζει πλήρως την έκθεση στα αντιβιοτικά ή σε άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται συχνά για τη διαχείριση της υγείας των ζώων (Ruegg, 2009).

Οι συνολικές πωλήσεις βιολογικών γαλακτοκομικών προϊόντων ήταν για το 2000 ο πιο γρήγορα αυξανόμενος τομέας της αμερικανικής γαλακτοκομικής βιομηχανίας με ύψος 200 εκατομμύρια δολάρια. Το πρόσθετο όφελος της παραγωγής βιολογικού γάλακτος (με μικρότερη αντιβιοαντοχή) θα δημιουργήσει ένα ισχυρά ανταγωνιστικό πλεονέκτημα για τα βιολογικά προϊόντα για το κοινό με συνείδηση για την υγεία (Tikofsky *et al.*, 2002).

Τα βιολογικά γαλακτοκομικά προϊόντα θεωρούνται από τους καταναλωτές ως υγιεινά και πιο φυσικά και είναι πρόθυμοι να τα αγοράσουν σε υψηλές τιμές. Συνεπώς, τα γαλακτοκομικά προϊόντα που φέρουν ειδικές οργανικές ετικέτες αντιπροσωπεύουν πάνω από 25% των συνολικών πωλήσεων γαλακτοκομικών προϊόντων στις Ελβετικές αλυσίδες υπεραγορών. Ωστόσο, η διαφορά τιμών μεταξύ βιολογικών και συμβατικών προϊόντων μειώνεται και τα υψηλά πρότυπα παραγωγής έχουν γίνει σημαντικό θέμα για τους παραγωγούς βιολογικών προϊόντων. Αυτές οι απαιτήσεις προκαλούν τους αγρότες και τους κτηνιάτρους τους να υιοθετήσουν οικονομικά λιγότερο αποτελεσματικές, αλλά οικολογικά βιώσιμες μεθόδους διαχείρισης της υγείας των ζώων (Busatoa *et al.*, 2000).

Με τον αυξανόμενο αριθμό των γαλακτοπαραγωγών που μετατρέπονται σε βιολογικοί γαλακτοπαραγωγοί, φαίνεται ότι εμφανίζονται διαφορετικές στρατηγικές παραγωγής βιολογικού γάλακτος. Οι νέοι βιολογικοί παραγωγοί έχουν σκοπό να διατηρήσουν τα υπάρχοντα επίπεδα παραγωγής γάλακτος και να εκπληρώσουν την ποσότητά τους, ενώ η βιολογική παραγωγή γάλακτος χαρακτηρίζεται ιστορικά από μειωμένα επίπεδα



παραγωγής, χαμηλές εξωτερικές εισροές και μικτή δομή των επιχειρήσεων. Οι νέοι βιολογικοί παραγωγοί επιχειρούν να επιτύχουν τους στόχους τους κάνοντας πλήρη χρήση των ανοχών των οργανικών προτύπων σχετικά με τις αγορές ζωοτροφών. Τα πρότυπα παραγωγής επιτρέπουν μια συγκεκριμένη αναλογία της διατροφής να παρέχεται από συμπυκνωμένες ζωοτροφές (έως 40% για τα βοοειδή) και έως 10% της ξηρής ουσίας της διατροφής να προέρχεται από συγκεκριμένα συμβατικά συστατικά.

Οι διαφορετικές στρατηγικές παραγωγής βιολογικού γάλακτος είναι, επομένως, πιθανό να αναπτυχθούν μεταξύ των δυο γενικών στόχων:

- (α) μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας μέσα στο πλαίσιο των περιορισμών των βιολογικών προτύπων, και
- (β) μεγιστοποίηση της αποδοτικότητας των πόρων και της αειφορίας (Hovi και Bouilhol, 2001).

Η Αυστρία έχει το μεγαλύτερο ποσοστό γαλακτοπαραγωγών αγελάδων σε βιολογικά κοπάδια και ακολουθούν η Ελβετία και οι σκανδιναβικές χώρες. Η Γερμανία και οι Κάτω Χώρες, οι άλλες δυο σημαντικές χώρες παραγωγής γάλακτος, έχουν χαμηλότερο ποσοστό βιολογικών εκτροφών (Rosati, Aumaitre, 2004).

Στη Δανία η βιολογική γαλακτοπαραγωγή έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια. Κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου πέντε ετών ο αριθμός των βιολογικών κοπαδιών γαλακτοπαραγωγής αυξήθηκε από 132 σε 722 το Δεκέμβριο του 2000 (σχεδόν στάσιμος από το 1999 έως και σήμερα) (Vaarst, 2001).

Ενίοτε, η θετική τάση της παραγωγής βιολογικού γάλακτος δεν εκπληρώνεται εξαιτίας προβλημάτων στη αγορά σχετικά με μειωμένη ζήτηση, υψηλό κόστος παραγωγής, ανεπάρκεια των μέσων παραγωγής ή άλλων πιο ειδικών τοπικών λόγων (Rosati, Aumaitre, 2004).

#### 4.1.2 Η βιολογική παραγωγή στην Ελλάδα

Υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον και ζήτηση για βιολογικά ζωικά προϊόντα από τους αγρότες, τους καταναλωτές, τους εμπόρους λιανικής και τις υπεραγορές. Ωστόσο, υπάρχουν κάποια προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι :

- Η έλλειψη ικανοποιητικών βιολογικών ζωοτροφών
- Προβλήματα υγείας και υγιεινής των ζώων
- Η επεξεργασία των βιολογικών προϊόντων ζωικής προέλευσης
- Το σωστά οργανωμένο εμπόριο των βιολογικών προϊόντων
- Η αξιοπιστία του ποιοτικού ελέγχου και του συστήματος πιστοποίησης, και
- Η προώθηση των βιολογικών προϊόντων στους καλά ενημερωμένους καταναλωτές.

Τα πρώτα βιολογικά προϊόντα ζωικής προέλευσης παράχθηκαν στην Ελλάδα το 1996, στα Γρεβενά και ως το 2001, 1000 εκτάρια και 10.500 πρόβατα είχαν μετατραπεί σε βιολογικά από μια ομάδα αγροτών. Το βιολογικό γάλα που παραγόταν χρησιμοποιούνταν από το τυροκομείο «Κουρέλλας» για την παραγωγή βιολογικής φέτας, που εξαγόταν κυρίως στη Γερμανία.

Στην Κοζάνη το πρωτότυπο Κέντρο Ζωικής Παραγωγής και Εκπαίδευσης της Βλάστης, που βρίσκεται υπό την επίβλεψη του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Υπουργείου Γεωργίας, έχει 450 προβατίνες γαλακτοπαραγωγής για την παραγωγή βιολογικού γάλακτος και κρέατος. Νέοι αγρότες εκπαιδεύονται στα συστήματα βιολογικής παραγωγής στο εκπαιδευτικό αυτό κέντρο (Kyriazakis, Zervas, 2002).

Υπάρχουν τρεις βασικοί παράγοντες που περιορίζουν τη βιολογική παραγωγή των μικρών μηρυκαστικών στην Ελλάδα:

1. Προβλήματα που σχετίζονται με τη δομή της κτηνοτροφίας στην Ελλάδα που αφορούν:

α) τους παραγωγούς, η πλειοψηφία των οποίων δεν έχει πρόσβαση σε πληροφορίες και τείνουν να είναι καχύποπτοι σε κάθε νέα εξέλιξη. Το επίπεδο μόρφωσής τους είναι στοιχειώδες και οι περισσότεροι είναι παλαιότερης γενιάς.

β) τη στοιχειώδη υποδομή. Για παράδειγμα, μη βιώσιμα τυροκομεία, απουσία εναλλακτικών εμπορικών δικτύων, έλλειψη διαφήμισης των τοπικών προϊόντων και προβληματική συσκευασία και τυποποίηση των προϊόντων. Επιπλέον, οι αποστάσεις που χωρίζουν τις μονάδες εκτροφής από τις αγορές και τους παραγωγούς ζωοτροφών μπορεί να είναι οικονομικά απαγορευτικές.

### 3. Πάγιες πρακτικές των κτηνοτρόφων:

Αυτές περιλαμβάνουν τη βόσκηση των κοπαδιών σε συμβατικές καλαμιές, καθώς επίσης και οι κοινόχρηστοι βοσκότοποι, μια πρακτική που δεν οδηγεί μόνο στην υπερβόσκηση, αλλά και σε υψηλό παρασιτικό φορτίο αυτών των εδαφών και διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των ζώων.

### 3. Νομαδική κτηνοτροφία:

Κάποιες προδιαγραφές του Κανονισμού είναι ολοφάνερα περισσότερο εφαρμόσιμες στα κράτη μέλη με εντατικά συστήματα κτηνοτροφίας και δεν παίρνουν υπόψη τους τη νομαδική φύση της προβατοτροφίας και της αιγοτροφίας στην Ελλάδα. Τα σημεία στα οποία τα παραδοσιακά εκτατικά συστήματα βόσκησης αντιμετωπίζουν δυσκολία στη συμμόρφωση με τις κατευθυντήριες γραμμές του Κανονισμού, και συνεπώς στην πιστοποίηση για τα προϊόντα τους, έχουν ως εξής:

α) Η καταγραφή των βοσκοτόπων με ένα σύστημα επιθεώρησης και πιστοποίησης δεν είναι πρακτική, λόγω της ιδιοσυγκρασίας των δικαιωμάτων ιδιοκτησίας.

β) Οι εγκαταστάσεις αποθήκευσης της κόπρου είναι συνήθως ανύπαρκτες, όπως και κάθε μορφή διαχείρισης της κόπρου.

γ) Η επαρκής προστασία από τις καιρικές συνθήκες δεν παρέχεται πάντα από τα πρόχειρα στέγαστρα στα οποία στεγάζονται τα ζώα.

δ) Ο ευνουχισμός δεν γίνεται πάντα από εξειδικευμένο προσωπικό.

ε) Σε συγκεκριμένες περιόδους του χρόνου η βόσκηση είναι αδύνατη και το κοπάδι μπορεί να υποφέρει από πείνα.

στ) Τα αποθέματα νερού δε θεωρούνται πάντα κατάλληλα για πόση.

- ζ) Η ομοιοπαθητική κτηνιατρική θεραπεία βρίσκεται σε εμβρυικό στάδιο και δεν έχει εγκριθεί ακόμα κανένα ομοιοπαθητικό προϊόν.
- η) Υπάρχουν σημαντικά προβλήματα ευζωίας σχετικά με τη μεταχείριση των ζώων κατά τη μεταφορά, την περίοδο πριν τη σφαγή και την περίοδο κατά τη σφαγή.
- θ) Στους κοινόχρηστους κοινοτικούς βοσκοτόπους ο διαχωρισμός των εδαφών βόσκησης των βιολογικών κοπαδιών δεν είναι πάντα εφικτός. Σε κάποιες περιοχές τα αποτελέσματα της υπερβόσκησης των βοσκοτόπων αυτών είναι ολοφάνερα.
- ι) Είναι εξαιρετικά δύσκολο να πειστούν οι χειριστές, πολλοί από τους οποίους είναι αναλφάβητοι, για την ανάγκη να κρατούνται αρχεία, να τεκμηριώνονται οι εμπορικές συναλλαγές, να αναπτύσσουν σχέδιο διαχείρισης, κτλ. (Kyriazakis, Zervas, 2002).

## **4.2 Νομοθεσία**

### **4.2.1 Γενικά**

Τα εθνικά πρότυπα για τη βιολογική παραγωγή ποικίλλουν από χώρα σε χώρα. Η διαδικασία πιστοποίησης των βιολογικών εκτροφών γίνεται συνεχώς περισσότερο κωδικοποιημένη και με περισσότερους κανονισμούς. Οι χώρες έχουν διαφορετικά πρότυπα σχετικά με τις πρακτικές που εφαρμόζονται στη βιολογική παραγωγή. Αυτές οι πρακτικές ποικίλλουν σημαντικά όσον αφορά τις αποδεκτές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη διαχείριση της υγείας των ζώων. Τα καναδικά πρότυπα ορίστηκαν το 2006 ( Canadian General Standards Board, 2006) και οι κανόνες για τα βιολογικά για τις χώρες στην Ευρωπαϊκή Ένωση εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά το 1991 και αναθεωρήθηκαν για τελευταία φορά το 2007 (EC 837/2007). Στην Ε.Ε. η εφαρμογή των βιολογικών κανόνων που διέπουν τη θεραπεία των άρρωστων ζώων μπορεί να επηρεάζεται από τους κατά τόπου νόμους για την ευζωία ή από τους κτηνιατρικούς κανονισμούς.

Από τον Οκτώβριο του 2002 το Εθνικό Βιολογικό Πρόγραμμα μαζί με την Υπηρεσία Αγροτικού Εμπορίου του USDA έχει ορίσει τα πρότυπα των Η.Π.Α. για τη βιολογική παραγωγή και διαχείριση (USDA, 2008). Μόνο οι εκμεταλλεύσεις που εκπληρώνουν τα

πρότυπα του USDA μπορούν να παράγουν νόμιμα πιστοποιημένα βιολογικά προϊόντα. Ωστόσο, η διαδικασία πιστοποίησης εκτελείται από μια ποικιλία διαπιστευμένων από τον USDA ιδιωτικών πιστοποιημένων γραφείων. Τα εθνικά πρότυπα για τα βιολογικά προϊόντα καθορίζουν τις μεθόδους, τις πρακτικές και τις ουσίες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή και το χειρισμό των καλλιεργειών, των κτηνοτροφικών προϊόντων και των επεξεργασμένων αγροτικών προϊόντων. Οι απαιτήσεις ισχύουν για την παραγωγική διαδικασία, αλλά δεν ισχύουν για τις ιδιότητες των τροφίμων. Ένας περιεκτικός κατάλογος των βιολογικών προτύπων για την κτηνοτροφική παραγωγή υπάρχει στην ιστοσελίδα του USDA (USDA, 2008). Οι απαιτήσεις δηλώνουν ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα πρέπει να προέρχονται από ζώα που βρίσκονταν υπό βιολογική διαχείριση για τουλάχιστον ένα χρόνο, εκτός από τη μεταβατική περίοδο κατά την οποία ολόκληρα κοπάδια γαλακτοπαραγωγής μετατρέπονται σε βιολογικά. Κατά τη διάρκεια των εννέα πρώτων μηνών της περιόδου προσαρμογής ο παραγωγός μπορεί να ταΐζει το κοπάδι το λιγότερο 80% βιολογικές τροφές. Μετά την ολοκλήρωση της περιόδου προσαρμογής και αφού το κοπάδι έχει μετατραπεί σε βιολογικό, όλα τα γαλακτοπαραγωγικά ζώα πρέπει να βρίσκονται υπό βιολογική διαχείριση και να τρέφονται με βιολογικά προϊόντα από το τελευταίο τρίμηνο της κυοφορίας και μετά.

Όπως τα οργανικά πρότυπα του Καναδά και της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τα οργανικά πρότυπα των Η.Π.Α. για τη διαχείριση της υγείας των ζώων δίνουν έμφαση στη διαχείριση της πρόληψης της υγείας των ζώων. Οι παραγωγοί ενθαρρύνονται «να καθιερώσουν και να διατηρήσουν πρακτικές πρόληψης της υγείας των ζώων» και «να καθιερώσουν κατάλληλη στέγαση, συνθήκες βόσκησης και πρακτικές υγιεινής για να ελαχιστοποιήσουν την εμφάνιση και την εξάπλωση ασθενειών και παρασίτων» (USDA, 2008). Δίνεται έμφαση στη μείωση του στρες: «Τα ζώα σε μια βιολογική εκτροφή πρέπει να εκτρέφονται κάτω από συνθήκες που ευνοούν την άσκηση, την ελευθερία των κινήσεων και τη μείωση του στρες ανάλογα με το είδος. Επιπρόσθετα, όλες οι φυσικές μετατροπές που γίνονται στα ζώα σε μια βιολογική εκτροφή πρέπει να διεξάγονται για την προώθηση της ευζωίας των ζώων και με τρόπο που ελαχιστοποιεί το στρες και τον πόνο» (USDA, 2008).

Παρόλο που τόσο τα Καναδέζικα βιολογικά πρότυπα όσο και τα βιολογικά πρότυπα της Ε.Ε. αποθαρρύνουν τη χρήση των αντιβιοτικών ή των απαγορευμένων συνθετικών ενώσεων και τα δυο πρότυπα περιλαμβάνουν διατάξεις που επιτρέπουν την

περιορισμένη χρήση των αντιβιοτικών, χωρίς να συνεπάγεται η απώλεια του βιολογικού χαρακτήρα των ζώων, κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και με εκτεταμένες περιόδους αναμονής. Αντίθετα, τα αμερικανικά βιολογικά πρότυπα περιέχουν μια μοναδική και αυστηρή απαγόρευση ως προς τη χρήση των περισσότερων συμβατικών θεραπειών. Αν και η χρήση των κτηνιατρικών βιολογικών ουσιών (π.χ. εμβόλια) ενθαρρύνεται, μόνο ουσίες που συγκεκριμένα περιλαμβάνονται στον κατάλογο των συνθετικών ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία των άρρωστων ζώων.

Ο κανονισμός αναφέρει εν μέρει:

Οι παραγωγοί μιας βιολογικής εκμετάλλευσης ζώων δεν πρέπει να θεραπεύουν κανένα ζώο της εκμετάλλευσης με αντιβιοτικά, με καμία συνθετική ουσία που δεν συμπεριλαμβάνεται στον Εθνικό Κατάλογο των επιτρεπτών συνθετικών ουσιών για χρήση στη ζωική παραγωγή ή με καμία ουσία η οποία περιέχει μη συνθετική ουσία που περιλαμβάνεται στον Εθνικό Κατάλογο των απαγορευμένων μη συνθετικών ουσιών για χρήση στη βιολογική ζωική παραγωγή. Ο παραγωγός δεν πρέπει να παρέχει κανένα ζωικό φάρμακο, εκτός από τα εμβόλια, απουσία ασθένειας. Η χρήση των ορμονών για την ενίσχυση της ανάπτυξης απαγορεύεται στη βιολογική ζωική παραγωγή, όπως και η χρήση των συνθετικών παρασιτοκτόνων σε τακτική βάση. Οι παραγωγοί δεν πρέπει να παρέχουν συνθετικά παρασιτοκτόνα στα προς σφαγή ζώα ή να παρέχουν οποιοδήποτε ζωικό φάρμακο κατά παράβαση της Ομοσπονδιακής Πράξης για τα Τρόφιμα, τα Φάρμακα και τα Καλλυντικά (USDA,2008).

Ο παραγωγός δεν πρέπει να μην παρέχει ιατρική φροντίδα σε ένα άρρωστο ζώο με σκοπό τη διατήρηση της βιολογικής του κατάστασης. Όλα τα απαραίτητα φάρμακα και οι απαραίτητες θεραπείες πρέπει να χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση της υγείας του ζώου, όταν όλες οι αποδεκτές από τα βιολογικά πρότυπα μέθοδοι έχουν αποτύχει. Τα ζώα που έχουν θεραπευτεί με απαγορευμένα υλικά πρέπει να αναγνωρίζονται ξεκάθαρα και δεν πρέπει να πωλούνται, να σημαίνονται ή να παρουσιάζονται σε βιολογικά (USDA,2008) (Ruegg, 2009).

Μέχρι τα τέλη του 1980 υπήρχε στις Η.Π.Α. μια ποικιλία κρατικών και ιδιωτικών φορέων πιστοποίησης που πιστοποιούσαν τις εκτροφές ως βιολογικές, παρέχοντας στους καταναλωτές τη διαβεβαίωση ότι τα βιολογικά προϊόντα παράγονταν νόμιμα. Οι όροι και οι νομοθεσίες ποίκιλλαν ευρέως από φορέα σε φορέα. Για να περιοριστούν οι

περιπτώσεις απάτης στην αγορά των βιολογικών προϊόντων και να προωθηθεί το βιολογικό εμπόριο θεσπίστηκε το 1990 η Πράξη Παραγωγής Βιολογικών Τροφίμων (Organic Foods Production Act). Η πράξη αυτή διέταξε τη δημιουργία του Εθνικού Βιολογικού Προγράμματος (National Organic Program, NOP) και δημιουργήθηκαν ομοιόμορφα ομοσπονδιακά πρότυπα. Όλοι οι παραγωγοί, οι χειριστές, οι επεξεργαστές και οι φορείς πιστοποίησης, που παράγουν πάνω από 5000 δολάρια το χρόνο σε ακαθάριστες εισπράξεις, έπρεπε να συμμορφώνονται με αυτούς τους ομοσπονδιακούς κανονισμούς ως τον Οκτώβριο του 2002.

Η βιολογική γεωργία στις Ηνωμένες Πολιτείες περιλαμβάνει μια βασική ιδέα ως ακρογωνιαίο λίθο της. Τα βιολογικά προϊόντα πρέπει να χρησιμοποιούν υλικά και μεθόδους που προστατεύουν τις φυσικές πηγές, επαναφέρουν την υγεία του εδάφους, ελέγχουν τη μόλυνση του αέρα, της γης και του νερού και προάγουν ένα υγιές και ποικίλο οικοσύστημα. Η ακεραιότητα των βιολογικών προϊόντων πρέπει να διατηρείται σε όλη την παραγωγή, την επεξεργασία και το χειρισμό, έτσι ώστε να μην υπάρχει συνένωση βιολογικών και συμβατικών προϊόντων ή επιμόλυνση των βιολογικών τροφίμων ή υλικών με απαγορευμένες ουσίες.

Τα πιο πολλά συνθετικά λιπάσματα, ζιζανιοκτόνα, φυτοφάρμακα και θεραπείες είναι απαγορευμένα προς χρήση στις βιολογικές εκτροφές. Η υγεία του εδάφους προάγεται με την αμειψισπορά, τη χλωρή λίπανση, την κάλυψη καλλιέργειας, την κομποστοποίηση και τη χρήση των ορυκτών που εξορύσσονται. Η διατήρηση της υγείας των ζώων επικεντρώνεται στην πρόληψη και τη σωστή διατροφή, τη διαχείριση για μείωση του άγχους και στα συστήματα σταβλισμού που επιτρέπουν στα ζώα να εκδηλώσουν τη φυσική τους συμπεριφορά (Tikofsky, 2005).

#### **4.2.2 Οδηγίες και Κανονισμοί των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής για τη βιολογική παραγωγή**

Το Εθνικό Βιολογικό Πρόγραμμα (National Organic Program) στεγάζεται στο Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (USDA) υπό τη διεύθυνση του Γραμματέα Γεωργίας. Τα βιολογικά πρότυπα βασίζονται σε σύσταση μιας

δεκαπενταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, της Εθνικής Επιτροπής Βιολογικών Προτύπων (National Organic Standards Board, NOSB). Οι παραγωγοί, οι καταναλωτές και οποιοσδήποτε ενδιαφέρεται μπορεί να θέσει θέματα που σχετίζονται με τη βιολογική παραγωγή ή εμπορεύματα υπό εξέταση στην NOSB.

Ο υπουργός γεωργίας έχει καθιερώσει έναν Εθνικό Κατάλογο Επιτρεπόμενων και Απαγορευμένων Ουσιών με βάση τις συστάσεις του NOSB. Αυτός ο Εθνικός Κατάλογος αναγνωρίζει τις συνθετικές ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τις μη συνθετικές που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιολογική παραγωγή. Κάθε άτομο μπορεί να κάνει αίτηση στην NOSB για να ζητήσει να προστεθεί ή να αφαιρεθεί μια ουσία από τον Εθνικό Κατάλογο.

Όλοι οι κρατικοί και οι ιδιωτικοί φορείς πιστοποίησης πρέπει να διαπιστευθούν από τον USDA. Οι φορείς πιστοποίησης μπορεί να έχουν πιο αυστηρές απαιτήσεις για τη βιολογική πιστοποίηση από τους κανονισμούς του NOP, αλλά δεν μπορούν ποτέ να εισάγουν εξαιρέσεις από τους βιολογικούς κανόνες.

Για να είναι ικανοί να φέρουν τη σφραγίδα «USDA βιολογικό» στη συσκευασία και για να διαφημίζουν προϊόντα ως «πιστοποιημένα βιολογικά», όλη η παραγωγή, οι χειρισμοί και η επεξεργασία πρέπει να συμφωνούν με τους κανονισμούς του USDA. Οι κανονισμοί αυτοί, αναφορικά με τη βιολογική γαλακτοβιομηχανία, αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

Η γη για καλλιέργεια και τα βοσκοτόπια μεταπηδούν σε πλήρες βιολογικό καθεστώς σε μια περίοδο τριών ετών. Κανένα συνθετικό χημικό (εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, λιπάσματα, μυκητοκτόνα) ή φυτά και σπόροι που έχουν τροποποιηθεί γενετικά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργειες ή σε βοσκότοπο. Η μετάβαση ξεκινά από την ημερομηνία της τελευταίας εφαρμογής απαγορευμένης ουσίας. Διχασμένες επιχειρήσεις (να υπάρχουν ταυτόχρονα συμβατικά και βιολογικά εδάφη ή κοπάδια στην ίδια εκμετάλλευση) δεν επιτρέπονται. Πρέπει, επίσης, να υπάρχει μια νεκρή ζώνη ανάμεσα στα βιολογικά και τα συμβατικά εδάφη. Το μέγεθος και η κατασκευή εξαρτάται από την τοπογραφία του εδάφους, τον τύπο της καλλιέργειας, την αποστράγγιση και την κατεύθυνση του ανέμου.



Κατά τον τελευταίο χρόνο της μετάβασης, ο παραγωγός επιτρέπεται να κάνει μόνο μια μετάβαση του γαλακτοπαραγωγού κοπαδιού του. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρόνου μετάβασης, όλα τα πρότυπα διαχείρισης των ζώων πρέπει να συμφωνούν με τους ομοσπονδιακούς κανονισμούς.

Τα ζώα πρέπει να καταναλώνουν 100% βιολογικές ζωοτροφές κατά τη διάρκεια των τριών τελευταίων μηνών της μετάβασης. Προς το παρόν τα πρότυπα επιτρέπουν να τρέφονται οι αγελάδες με 80% βιολογικές και 20% συμβατικές ζωοτροφές κατά τη διάρκεια των εννέα πρώτων μηνών του έτους μετάβασης. Αυτό αναμένεται να αλλάξει σε 100% απαιτήσεις για βιολογικές ζωοτροφές κατά τη διάρκεια του έτους μετάβασης εξαιτίας της πρόσφατης εκδίκησης. Όλα τα ζώα άνω των έξι μηνών πρέπει να έχουν πρόσβαση στη βόσκηση κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάπτυξης και σε υπαίθριους χώρους άσκησης κατά τη διάρκεια του έτους. Τα μοσχάρια πρέπει να μεγαλώνουν με πλήρες γάλα και τα υποκατάστατα γάλακτος δεν επιτρέπονται, εκτός από περιπτώσεις ανάγκης (και τότε πρέπει να μην περιέχουν αντιβιοτικά και rBST).

Η βιολογική γαλακτοκομία δε βασίζεται απλά στα «υποκατάστατα εισερχόμενων υλών» (αντικατάσταση με εναλλακτικές θεραπείες για απαγορευμένες συμβατικές ουσίες). Οι πρακτικές πρόληψης είναι το κλειδί για τη διατήρηση της υγείας των ζώων στις βιολογικές εκτροφές και οι πρακτικές αυτές πρέπει να τεκμηριώνονται στο σχέδιο εκτροφής. Αντιβιοτικά, ορμόνες και οι περισσότερες συνθετικές θεραπείες δεν επιτρέπονται στα ζώα που τα προϊόντα τους θα πιστοποιηθούν ως βιολογικά. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το Ευρωπαϊκό σύστημα, όπου περιορισμένες ποσότητες αντιβιοτικών και συνθετικών θεραπειών μπορούν να χορηγηθούν, αλλά μόνο από αρμόδιο κτηνίατρο. Ο Εθνικός Κατάλογος δίνει κάποιες οδηγίες για τα επιτρεπόμενα, τα νόμιμα και τα απαγορευμένα προϊόντα για χρήση, αν και το βάρος πέφτει στους Αμερικάνους παραγωγούς να είναι βέβαιοι ότι οποιοδήποτε προϊόν χρησιμοποιούν είναι σύμφωνο με τους ομοσπονδιακούς κανονισμούς. Εναλλακτικές θεραπείες (βότανα, ομοιοπαθητική, υποστηρικτική θεραπεία, βελονισμός) χρησιμοποιούνται συχνά, όταν είναι απαραίτητο. Οι εμβολιασμοί επιτρέπονται και τα συνθετικά αντιπαρασιτικά επιτρέπονται σε αυστηρά περιορισμένη βάση, όταν έχουν αποτύχει οι εναλλακτικές θεραπείες. Για ανθρωπιστικούς λόγους, όταν έχουν εξαντληθεί οι εναλλακτικές μέθοδοι, δεν πρέπει να απαγορεύεται καμία θεραπεία για το ασθενές ζώο απλά για να διατηρηθεί η βιολογική του κατάσταση. Το ζώο πρέπει να δεχθεί θεραπεία και μετά να

απομακρυνθεί από την εκτροφή (να πουληθεί σε συμβατική εκτροφή ή να σφαχθεί). Επιτρέπεται η αποκεράτωση, αλλά απαγορεύεται η κοπή της ουράς.

Η πιστοποίηση πρέπει να ανανεώνεται ετησίως με έξοδα του κτηνοτρόφου και όλη η γραφική δουλειά, το έδαφος και το ζωικό κεφάλαιο ελέγχονται από τον επιθεωρητή πιστοποίησης κατά τη διάρκεια μιας πολυήμερης επίσκεψης. Η εκτροφή πρέπει να κρατά λεπτομερή αρχεία για όλα τα εισερχόμενα στις καλλιέργειες και τους βοσκοτόπους, για τις σοδειές, να κρατά αποδείξεις από όλες τις αγορές (ζωοτροφές, ζώα, θεραπείες) και τη ζωική παραγωγή και αρχεία υγείας. Όλα τα ζώα πρέπει να είναι μονίμως αναγνωρίσιμα. Τα αρχεία αυτά αξιολογούνται από τον επιθεωρητή σε ετήσια βάση. Αιφνιδιαστικές επιθεωρήσεις στον τόπο της εκτροφής μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια του έτους. Οι παραβάσεις μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα καθυστέρηση της μετάβασης, πρόστιμα ή ανάκληση της βιολογικής κατάστασης (Tikofsky, 2005).

#### **4.2.3 Η βιολογική Νομοθεσία στην Ελβετία**

Στην Ελβετία οι κανονισμοί και τα κριτήρια πιστοποίησης για την παραγωγή στις βιολογικές γαλακτοκομικές εκτροφές τέθηκαν το 1997. Οι κανονισμοί αυτοί ορίζουν ότι το 95% της συνολικής ξηρής ουσίας που προσλαμβάνουν με την τροφή οι αγελάδες πρέπει να έχει παραχθεί βιολογικά. Απαγορεύεται η χρήση των αυξητικών παραγόντων, των ορμονών και των γενετικά τροποποιημένων συστατικών των ζωοτροφών και η προληπτική χρήση των χημειοθεραπευτικών ουσιών. Οι θεραπευτικές παρεμβάσεις πρέπει να βασίζονται κυρίως σε εναλλακτικές μεθόδους και τα αντιβιοτικά πρέπει να χρησιμοποιούνται με φειδώ και μόνο με συνταγή κτηνιάτρου. Η συμμόρφωση με αυτούς τους κανονισμούς παρακολουθείται συνεχώς από την υπηρεσία επέκτασης αγροκτήματος του Ερευνητικού Ινστιτούτου Βιολογικής Γεωργίας της Ελβετίας (Busato A. *et al.*, 2000). Η αυξημένη ζήτηση για βιολογικά προϊόντα έχει οδηγήσει σε νέους κανονισμούς στη γεωργοκτηνοτροφία της Ελβετίας. Στη βιολογική εκτροφή γαλακτοπαραγωγής δεν επιτρέπεται η προληπτική χρήση αντιβιοτικών. Στις περιπτώσεις υποκλινικής μαστίτιδας μπορούν να δοθούν αντιβιοτικά μόνο αν έχει αποτύχει η ομοιοπαθητική θεραπεία και αν το προφίλ της αντιβιοαντοχής των απομονωθέντων παθογόνων έχει καθοριστεί. Ανεξάρτητα από τα προληπτικά αυτά μέτρα, η συχνότητα

της αντιβιοαντοχής στα παθογόνα της μαστίτιδας από βιολογικές εκτροφές δε βρέθηκε να διαφέρει από εκείνη στα παθογόνα της μαστίτιδας από συμβατικές εκτροφές (Walther, Perreten, 2007).

#### **4.2.4 Η βιολογική Νομοθεσία στη Δανία**

Στη Δανία η βιολογική γεωργία περιλαμβάνει ένα σύνολο κυβερνητικών νόμων και κανόνων, των οποίων ο σκοπός είναι πάνω από όλα να εξηγήσουν πρακτικά πως οι βιοκαλλιεργητές μπορούν να ανταποκριθούν στο βιολογικό τρόπο παραγωγής:

- 85% οργανικές τροφές, όχι προσθετικά ζωοτροφών. Μια πρόσφατη συμφωνία μεταξύ των γαλακτοπαραγωγών και των γαλακτοβιομηχανιών ότι οι βιολογικές αγελάδες τρέφονται με 100% βιολογικές ζωοτροφές.
- Ο τοκετός πρέπει να γίνεται σε κελιά τοκετού.
- Οι αγελάδες και τα μοσχάρια πρέπει να παραμένουν μαζί το λιγότερο 24 ώρες μετά τον τοκετό.
- Όλα τα ζώα πρέπει να έχουν στρωμένους και χωρίς απορρίμματα χώρους κατάκλισης.
- Η ομαδική στέγαση των μοσχαριών πρέπει να γίνεται μετά από μια εβδομάδα.
- Το ένστικτο θηλασμού του μοσχαριού πρέπει να ικανοποιείται (μέσω της χρήσης κουβάδων θηλασμού, αγελάδων-τροφών ή τυφλών θηλών).
- Ζώα μεγαλύτερα των τριών μηνών πρέπει να έχουν πρόσβαση στη βόσκηση για 150 ημέρες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού.
- Όλες οι θεραπείες με αντιβιοτικά των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων πρέπει να χορηγούνται από κτηνίατρο. Η αρχική θεραπεία των μοσχαριών με αντιβιοτικά και άλλα φάρμακα πρέπει να χορηγείται από κτηνίατρο, αλλά στα μοσχάρια ο κτηνοτρόφος μπορεί να χορηγεί συνεχόμενη θεραπεία για 5 ημέρες, αν η ταυτοποίηση του μοσχαριού και η ημερομηνία αναγράφονται ξεκάθαρα στον περιέκτη του φαρμάκου.
- Δεν επιτρέπεται καμία προληπτική θεραπεία.

Ο κανονισμός ΕΚ (No. 1804/1999) ευνοεί ρητά την ομοιοπαθητική θεραπεία σε σχέση με την αλλοπαθητική θεραπεία ( ορίζεται λίγο ως πολύ ως βιο-ιατρική περίθαλψη) (Vaarst, 2001).

#### **4.2.5 Η βιολογική Νομοθεσία στη Νορβηγία**

Η νομοθεσία που διέπει τη Νορβηγική βιολογική γεωργία βασίζεται σε αρχές που προέρχονται από τη Διεθνή Ομοσπονδία των Κινημάτων Βιολογικής Γεωργίας (IFOAM). Τουλάχιστον το 50% των ζωοτροφών σε μια βιολογική εκτροφή πρέπει να παράγεται στην ίδια την εκτροφή και οι χονδροειδείς ζωοτροφές πρέπει να αποτελούν το 60% της ενέργειας που χορηγείται με την προσλαμβανόμενη ξηρή ύλη (Garmo, 2010).

#### **4.2.6 Η βιολογική Νομοθεσία στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στην Ελλάδα**

Η βιολογική γεωργοκτηνοτροφία θεωρείται ως ένα ασφαλές περιβαλλοντικά και κοινωνικά αποδεκτό σύστημα χρήσης της γης με παραγωγή «φυσικών τροφίμων». Βασίζεται σε ανεξάρτητα πιστοποιήσιμα και ελεγχόμενα ειδικά πρότυπα παραγωγής, τα οποία περιγράφονται από τη Διεθνή Ομοσπονδία του Βιολογικού Αγροτικού Κινήματος (International Federation of Organic Agricultural Movement, IFOAM, 1999) και λαμβάνονται από διεθνή σώματα, όπως η Επιτροπή του Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission).

Τα προσαρμοσμένα και βιώσιμα συστήματα καλλιέργειας είναι η βάση της βιολογικής παραγωγής. Η ολιστική προσέγγιση θεωρεί ότι το έδαφος, τα φυτά, τα ζώα και οι άνθρωποι έχουν αμοιβαίες σχέσεις στον κύκλο της καλλιέργειας. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1920 τα πρότυπα της βιολογικής αγροτικής καλλιέργειας έχουν παραχθεί σε μια μακρά διαδικασία κατά τη διάρκεια πολλών δεκαετιών σε ιδιωτικό επίπεδο. Οι βασικές αρχές και τα πρότυπα της βιολογικής κτηνοτροφίας της IFOAM καλύπτουν:

- τις μεταβατικές περιόδους
- τις πυκνότητες των αποθεμάτων
- την παραγωγή των ζωοτροφών
- τα υψηλά πρότυπα διαβίωσης των ζώων
- τη γενική απαγόρευση των γενετικά μεταλλαγμένων οργανισμών και των παραγώγων σε ολόκληρη την αλυσίδα παραγωγής

- τις μη συνθετικές στρατηγικές απολύμανσης των στάβλων και του εξοπλισμού
- τη μη αλλοπαθητική πρόληψη των ασθενειών
- τη μη χρήση αντιβιοτικών και ορμονών στις ζωοτροφές, και
- μια ανεξάρτητη πιστοποίηση της παραγωγής, της συσκευασίας και της επεξεργασίας.

Από τη δεκαετία του 1990 πολλές χώρες έχουν καθορίσει επίσημη νομοθεσία για τη βιολογική καλλιέργεια. Οι κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη βιολογική φυτική καλλιέργεια ανακοινώθηκαν το 1991 (2092/91/EK) και υποστηρίχθηκαν οικονομικά από το αγρο-περιβαλλοντικό πρόγραμμα 2078/92/ΕΕΚ αντίστοιχα υπό τον 1257/99/EK της AGENDA 2000. Ο κανονισμός 1804/99/EK τέθηκε σε ισχύ στις 4 Αυγούστου 2000 και αποτέλεσε μέρος του κανονισμού 2092/91/EK. Επίσημοι πολυεθνικοί κανονισμοί, όπως ο 1804/99/EK, αποτελούν συμβιβασμούς, επειδή πρέπει να εξεταστούν υπό το φως των διαφορετικών συνθηκών των χωρών εταίρων: από την αρκτική ως τον τροπικό, από τις ιδιωτικές ως τις κοινοτικές χρήσεις γης, από τις ευνοϊκές ως τις λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες παραγωγής, καθώς επίσης από τα μεγάλης ως τα μικρής κλίμακας συστήματα καλλιέργειας. Οι περισσότεροι από τους κανονισμούς του 1804/99/EK ισχύουν για όλα τα ζώα στις βιολογικές εκμεταλλεύσεις, χωρίς διασαφηνίσεις για κάθε είδος. Τα βοοειδή, τα πρόβατα και οι αίγες δε θεωρούνται ισοδύναμα. Ενώ τα βοοειδή περιγράφονται ικανοποιητικά, τα πρόβατα και οι αίγες τυγχάνουν περιορισμένης προσοχής (Kyriazakis, Zervas, 2002).

Η Ευρωπαϊκή Ένωση εισήγαγε και καθόρισε τη βιολογική εκμετάλλευση με δυο κανονισμούς: τον 2092/91 και, αργότερα, τον 1804/99. Πρότυπα και κατευθυντήριες γραμμές έχουν, επίσης, δημιουργηθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO), τη Διεθνή Ομοσπονδία των Κινημάτων Βιολογικής Γεωργίας (International Federation of Organic Agriculture Movements) και την Επιτροπή του Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission). Ο κανονισμός 1804/99 περιγράφει λεπτομερώς την επιτρεπόμενη βιολογική διαχείριση ζώων στην Ευρώπη. Η έκδοση αυτών των κανονισμών δεν εκπληρώνει πλήρως τις ανάγκες διαχείρισης, αλλά καλύπτει πολλές από τις απαιτούμενες πτυχές (Rosati, Aumaitre, 2004).

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 1804/99 για τη βιολογική κτηνοτροφία οι αρχές μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- Η βιολογική κτηνοτροφία σχετίζεται άμεσα με τη γη. Προκειμένου να αποφευχθεί η περιβαλλοντική μόλυνση, ειδικά των φυσικών πηγών, όπως το έδαφος και το νερό, η βιολογική κτηνοτροφία πρέπει καταρχήν να εξασφαλίζει στενή σχέση μεταξύ της παραγωγής και της γης.
- Τα ζώα πρέπει να έχουν πρόσβαση σε χώρο ελεύθερης άσκησης και/ή βόσκησης, εκτός από κάποιες εξαιρέσεις.
- Η βιολογική ποικιλότητα πρέπει να ενθαρρύνεται και να δείχνεται προτίμηση σε φυλές που μπορούν να προσαρμοστούν στις τοπικές συνθήκες. Οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί και τα προϊόντα που προέρχονται από αυτούς δεν είναι συμβατά με τη βιολογική παραγωγή.
- Τα βιολογικά ζώα πρέπει να τρέφονται με οργανικά παραγόμενο χόρτο, σανό και άλλες ζωοτροφές, εκτός από κάποιες συγκεκριμένες αποκλίσεις (για τα μηρυκαστικά το 10% της ξηρής ουσίας συγκεκριμένων συστατικών μπορεί είναι συμβατικής προέλευσης).
- Η διαχείριση της υγείας των ζώων πρέπει να βασίζεται κυρίως στην πρόληψη (κατάλληλες φυλές, ισορροπημένη διατροφή υψηλής ποιότητας και ευνοϊκό περιβάλλον όσον αφορά την πυκνότητα των ζώων και τις κτηνοτροφικές πρακτικές). Η προληπτική χρήση χημικών φαρμάκων δεν επιτρέπεται, αλλά τα άρρωστα και τα τραυματισμένα ζώα πρέπει να θεραπεύονται αμέσως (παρόλο που αυτό μπορεί να επηρεάσει την κατάστασή τους όσον αφορά τη βιολογική πιστοποίηση).
- Η στέγαση πρέπει να ικανοποιεί τις ανάγκες των ζώων σχετικά με τον αερισμό, το φως, το χώρο και την άνεση και πρέπει να παρέχεται ικανοποιητικός χώρος που να επιτρέπει επαρκή ελευθερία κινήσεων για την ανάπτυξη της φυσιολογικής κοινωνικής συμπεριφοράς των ζώων.

Οι γενικές αρχές της βιολογικής κτηνοτροφίας, όπως αναπτύσσονται από την IFOAM, δίνουν περισσότερη έμφαση από τον Κανονισμό της Ε.Ε. στο ότι η διαχείριση των ζώων πρέπει να διέπεται από τις φυσιολογικές και ηθικές ανάγκες των ζώων, αλλά λεπτομερή πρότυπα σχετικά με τη στέγαση για όλα τα είδη ζώων δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί (Hovi, Bouilhol, 2001).

Στον Κανονισμό 1805/99 ΕΕ (συμπληρωματικά του Κανονισμού 2092/91) μόνο λίγα είδη ζώων περιλαμβάνονται: βοοειδή (συμπεριλαμβάνονται οι βούβαλοι και οι

βίσωνες), χοιροειδή, προβατοειδή, αιγοειδή, ιπποειδή, πουλερικά και μέλισσες. Πολλά άλλα είδη ζώων μπορεί να παρουσιάζουν ενδιαφέρον για βιολογική παραγωγή σε χώρες της Ε.Ε., όπως τα ψάρια, τα κουνέλια, άγρια ζώα, βάτραχοι, σαλιγκάρια, κ.ά. (Honí, Bouilhol, 2001).

Ο τομέας της βιολογικής ζωικής παραγωγής στην Ελλάδα, σε σχέση με την πιστοποίηση των βιολογικών προϊόντων ζωικής προέλευσης, έχει μείνει πίσω, λόγω του χρόνου που έχει παρέλθει από την έκδοση του κανονισμού 1804/99/ΕΚ ο οποίος έχει ξοδευτεί κυρίως από τους διαχειριστές στο να προετοιμάσουν εθνικές οδηγίες για τα βιολογικά ζωικά προϊόντα. Από την πλευρά της πιστοποίησης, υπάρχουν τρεις ιδιωτικοί οργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τον ποιοτικό έλεγχο και την πιστοποίηση των βιολογικών προϊόντων. Οι οργανισμοί αυτοί, που ονομάζονται ΔΗΩ, ΣΟΓΕ και ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΕ, έχουν την άδεια να πιστοποιούν, προς το παρόν, βιολογικά προϊόντα φυτικής προέλευσης, αλλά όχι ακόμη ζωικά προϊόντα. Κάτι τέτοιο αναμένεται να συμβεί σύντομα (Kyriazakis, Zervas, 2002).

#### **4.3 Η μαστίτιδα στις βιολογικές εκτροφές**

Δεν υπάρχουν εγκεκριμένα προϊόντα από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία της μαστίτιδας στις βιολογικές εκτροφές και η χρήση μη εγκεκριμένων προϊόντων είναι ενάντια στις κατευθυντήριες γραμμές του Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων. Γενικά, οι βιολογικές εκτροφές γαλακτοπαραγωγής είναι συνήθως μικρότερες, χαμηλότερης παραγωγής και πιθανότερα στεγάζονται και αρμέγονται σε παραδοσιακούς στάβλους σε σχέση με τις συμβατικές εκτροφές. Είναι δύσκολο να συγκριθούν τα ποσοστά ασθενειών των βιολογικών και των συμβατικών εκτροφών, γιατί η αντίληψη και η ανίχνευση της ασθένειας επηρεάζεται από τον τρόπο διαχείρισης. Οι ευρωπαϊκές μελέτες δεν έχουν αποδείξει σημαντικές διαφορές στην υγεία των ζώων σε σχέση με την υιοθέτηση βιολογικού τρόπου διαχείρισης.

Οι κτηνοτρόφοι που έχουν υιοθετήσει με συνέπεια το βιολογικό τρόπο διαχείρισης αναφέρουν λιγότερες περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας, αλλά αυτοί οι παραγωγοί δε

χρησιμοποιούν τα ίδια κριτήρια για τον εντοπισμό της κλινικής μαστίτιδας. Οι ευρωπαίοι κτηνοτρόφοι που έχουν υιοθετήσει το βιολογικό τρόπο διαχείρισης χρησιμοποιούν μια ποικιλία συμβατικών και εναλλακτικών θεραπειών για τον έλεγχο και τη θεραπεία της μαστίτιδας. Στις Ηνωμένες Πολιτείες οι βιολογικοί εκτροφείς χρησιμοποιούν για τη θεραπεία της μαστίτιδας μια ποικιλία εναλλακτικών θεραπειών, όπως προϊόντα ορού γάλακτος, βότανα, συμπληρώματα βιταμινών και ομοιοπαθητική. Πρακτικά δεν υπάρχουν δεδομένα που να ενισχύουν την κλινική αποτελεσματικότητα των εναλλακτικών κτηνιατρικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη ή τη θεραπεία της μαστίτιδας.

Ο εθνικός κατάλογος των Η.Π.Α. για τις εγκεκριμένες για χρήση από τους βιολογικούς εκτροφείς ουσίες περιλαμβάνει διάφορες ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα πρωτόκολλα για τη θεραπεία της κλινικής μαστίτιδας. Εμβόλια, αντιφλεγμονώδη φάρμακα (π.χ. ασπιρίνη και φλουνιξίνη), ηλεκτρολύτες και φουροσεμίδη ( με διπλάσιο χρόνο αναμονής για το γάλα) είναι επιτρεπόμενες ουσίες κατά τα βιολογικά πρότυπα των Η.Π.Α.. Η ωκυτοκίνη επιτρέπεται μόνο για θεραπευτική χρήση μετά τον τοκετό, αλλά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί κανένα αντιβιοτικό χωρίς να αποκλειστεί το ζώο από τη βιολογική παραγωγή.

Είναι εμφανές ότι υπάρχει μικρή διαφορά στην ποιότητα του γάλακτος (με βάση τον αριθμό των σωματικών κυττάρων και τον αριθμό των βακτηρίων) που παράγεται σε βιολογικές ή σε συμβατικές γαλακτοπαραγωγές εκτροφές. Οι βιολογικοί γαλακτοπαραγωγοί συνεχώς αναφέρουν λιγότερες περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας σε σχέση με τους συμβατικούς γαλακτοπαραγωγούς, αλλά οι επιπτώσεις των φιλοσοφικών διαφορών στην ανίχνευση των ασθενειών, τη χρήση των κτηνιάτρων και τη θεραπεία απαιτούν επιπλέον έρευνα. Οι βιολογικοί εκτροφείς στις Ηνωμένες Πολιτείες χρησιμοποιούν μια ποικιλία μη παραδοσιακών θεραπειών. Ενώ οι βιολογικοί γαλακτοπαραγωγοί πληρώνουν λιγότερο για θεραπείες και φαίνονται ικανοποιημένοι με τις μη παραδοσιακές θεραπείες, υπάρχουν πολύ λίγα ικανοποιητικά δεδομένα που υποστηρίζουν τη χρήση των περισσότερων εναλλακτικών θεραπειών. Υπάρχει μια βαθιά έλλειψη ικανοποιητικών δεδομένων για τις κτηνιατρικές ομοιοπαθητικές θεραπείες και η χρήση αυτών των θεραπειών δεν πρέπει να συστήνεται.



Η διαχείριση των λοιμωδών νοσημάτων, όπως η μαστίτιδα, στις βιολογικές γαλακτοπαραγωγές εκτροφές στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει τροποποιηθεί σημαντικά για να συμμορφώνεται με τους βιολογικούς κανονισμούς και οι επιπτώσεις αυτών των κανονισμών στην υγεία των ζώων δεν έχουν τεκμηριωθεί. Πρακτικά όλες οι μελέτες αναφέρουν λιγότερες περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας στις βιολογικές εκτροφές συγκριτικά με τις συμβατικές εκτροφές (Ruegg, 2009).

Στο βιολογικό σύστημα παραγωγής υπάρχουν πολλές προκλήσεις σχετικά με τη διαχείριση των ασθενειών. Στο κοπάδι γαλακτοπαραγωγής η μαστίτιδα είναι σίγουρα το κυρίαρχο πρόβλημα υγείας. Οι παράγοντες κινδύνου συνδέονται με το περιβάλλον, τους βιολογικούς κανόνες και τη δομή των βιολογικών κοπαδιών γαλακτοπαραγωγής – και σε κάθε περίπτωση, εμπλέκονται περισσότεροι από αυτούς, αφού το αιτιολογικό υπόβαθρο της μαστίτιδας και των προβλημάτων υγείας των μαστών είναι πολύ περίπλοκο.

Η ομοιοπαθητική στηρίζεται σε ολιστικές ιδέες για την υγεία και την ασθένεια και η θεραπεία έχει σκοπό να διεγείρει ολόκληρο τον οργανισμό (σωματικά, συναισθηματικά και νοητικά) για να θεραπεύσει, παρά για να επιτεθεί σε συγκεκριμένους μικροοργανισμούς.

Ένας αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι τα βιολογικά κοπάδια δε διαφέρουν σημαντικά από το επίπεδο των συμβατικών κοπαδιών και όταν συμβαίνει κάτι τέτοιο, δεν είναι υπέρ της βιολογικής γαλακτοπαραγωγής (Vaarst, 2001).

Η υποκλινική μαστίτιδα ευθύνεται για υψηλές οικονομικές απώλειες στις γαλακτοπαραγωγές εκτροφές. Υπάρχουν στοιχεία, αν και δεν είναι συνεπή, ότι η υποκλινική μαστίτιδα είναι πιο συχνό πρόβλημα στα βιολογικά από ότι στα συμβατικά συστήματα παραγωγής (Doherr *et al.*, 2007).

Η υγεία του μαστού στα σουηδικά βιολογικά κοπάδια φαίνεται να είναι καλύτερη σε σχέση με τα συμβατικά κοπάδια αντίστοιχου μεγέθους και παραγωγής. Η βασική διαφορά στη διαχείριση ανάμεσα στους δυο τύπους εκτροφής είναι το ποσοστό των συμπυκνωμένων ζωοτροφών που χορηγούνται στα ζώα. Ο μηχανισμός που εξηγεί τη

συσχέτιση ανάμεσα στην ένταση της σίτισης και την υγεία των μαστών στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής απαιτεί επιπλέον έρευνα (Hamilton *et al.*, 2006).

#### **4.4 Βιολογικές εκτροφές και αντιβιοτικά**

Οι βιολογικές εκτροφές γαλακτοπαραγωγής στις Η.Π.Α. έχουν περιορισμούς ως προς τη χρήση των αντιβιοτικών. Από την ανάλυση δεδομένων από εκτροφές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι στις βιολογικές εκτροφές χρησιμοποιούνται σημαντικά λιγότερα αντιβιοτικά από ότι στις συμβατικές εκτροφές (Ray *et al.*, 2006).

Τα παραγωγικά ζώα που βρίσκονται σε βιολογικές εκτροφές μπορεί να υποκρύπτουν πολυανθεκτικούς σταφυλόκοκκους παρά την περιορισμένη χρήση αντιβιοτικών. Αυστηρά μέτρα υγιεινής πρέπει να εφαρμοστούν για να μειωθεί το επίπεδο της βακτηριακής μόλυνσης των αγελάδων στην εκτροφή και η εξάπλωση των βακτηρίων με δυνητική παθογένεια στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας. Το βιολογικό γάλα που προορίζεται για την παραγωγή τυριού από νωπό γάλα πρέπει να αποτελεί αντικείμενο προσεκτικής βακτηριολογικής ανάλυσης και δεν πρέπει να περιέχει βακτήρια που υποθάλπουν μεταβιβάσιμα γονίδια αντιβιοαντοχής (Walther, Perreten, 2007).

Είναι άγνωστο αν οι διαφορές των εκτροφών ανάμεσα σε βιολογικές και συμβατικές μεταφράζονται σε μείωση της έκθεσης των ανθρώπων στους ανθεκτικούς οργανισμούς. Μια μελέτη ανακάλυψε ότι στα βακτήρια από μοσχαρίσιο κιμά του λιανικού εμπορίου που προερχόταν από συμβατικές επιχειρήσεις υπήρχε μεγαλύτερη επικράτηση βακτηρίων ανθεκτικών στη χλωραμφαινικόλη και την κεφτιοφούρη, αλλά δεν υπήρχε καμία άλλη διαφορά για άλλα εννέα αντιβιοτικά. Πρέπει να σημειωθεί ότι η χρήση της χλωραμφαινικόλης σε εκτρεφόμενα ζώα στις Η.Π.Α. έχει απαγορευθεί από το 1986 εξαιτίας του κινδύνου εμφάνισης απλαστικής αναιμίας και του αυξημένου κινδύνου λευκώματος στους ανθρώπους και επομένως ο μηχανισμός που επιτρέπει τη διατήρηση της αντοχής στη χλωραμφαινικόλη των κοπρανωδών βακτηρίων είναι αδιευκρίνιστος

για τους πληθυσμούς βοοειδών στις Η.Π.Α.. Συνολικά, παραμένει ανοιχτή η συζήτηση σχετικά με τις έσχατες συνέπειες και τον κίνδυνο για τη δημόσια υγεία που μπορεί να προκύψει από τη διάδοση των οργανισμών με αντιβιοαντοχή από τα κτηνοτροφικά ζώα στους ανθρώπους και αυτό έχει θετική επίπτωση στα πιθανά οφέλη του βιολογικού συστήματος παραγωγής. Μακροπρόθεσμα η πλήρης απομάκρυνση των αντιβιοτικών από τη ζωική παραγωγή θα μπορούσε να μειώσει τη μετάδοση των οργανισμών με αντιβιοαντοχή στους ανθρώπους. Αυτό, ωστόσο, εξισορροπείται με την παραδοχή ότι η φθίνουσα υγεία των ζώων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη πιθανότητα μεγαλύτερου φορτίου παθογόνων στα ζώα αυτά με αναλόγως αυξημένο κίνδυνο έκθεσης των ανθρώπων σε γνήσια παθογόνα. Οι Barber *et al.* (2003) διαφωνούν στο ότι η προέλευση και η μετάδοση των οργανισμών με αντιβιοαντοχή από τα παραγωγικά ζώα έχει υπερεκτιμηθεί εις βάρος των εναλλακτικών πηγών, όπως τα ζώα συντροφιάς. Αν κάτι τέτοιο ισχύει, τότε τα αναμενόμενα οφέλη για τη δημόσια υγεία από την πλήρη απομάκρυνση των αντιβιοτικών, αν και δεν είναι ασήμαντα, θα μπορούσαν να υπερεκτιμηθούν.

Είναι γνωστό ότι οι θεραπείες της μαστίτιδας αντιστοιχούν στην πλειοψηφία των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις συμβατικές γαλακτοπαραγωγές εκτροφές.

Στην Ε.Ε. οι βιολογικοί γαλακτοπαραγωγοί εξακολουθούν να χρησιμοποιούν αντιβιοτικά για τη θεραπεία της κλινικής μαστίτιδας, αλλά υιοθετούν και εναλλακτικές θεραπευτικές στρατηγικές. Σε μια έρευνα που συνέκρινε τις θεραπείες της μαστίτιδας που χρησιμοποιούνται στις βιολογικές (n=16) και στις συμβατικές (n=7) εκτροφές στο Ηνωμένο Βασίλειο, ο Honi (2001) ανέφερε ότι τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία της κλινικής μαστίτιδας κατά 100% και 41% από τις συμβατικές και τις βιολογικές εκτροφές αντίστοιχα. Η διάρκεια της θεραπείας ήταν παρόμοια και στα δυο συστήματα διαχείρισης, αλλά οι βιολογικοί εκτροφείς ανέφεραν σημαντικά μεγαλύτερες περιόδους αναμονής (11,2 και 5,5 ημέρες για τις βιολογικές και τις συμβατικές εκτροφές αντίστοιχα). Η ομοιοπαθητική ήταν η πιο συνηθισμένη εναλλακτική θεραπεία (αναφέρθηκε από το 51% των βιολογικών εκτροφών), αλλά αναφέρθηκαν και άλλες θεραπείες, όπως η χρήση αλοιφών του μαστού, η συχνή άμελξη και η ενδομαστική έγχυση αλόης. Πάνω από το 50% των προϊόντων που παρέχονται από τις ολλανδικές βιολογικές εκτροφές θεωρείτε ότι είναι συνηθισμένα κτηνοτροφικά προϊόντα, σε αντίθεση με το 43% των προϊόντων που ταξινομούνται στα εναλλακτικά. Το πιο κοινό

εναλλακτικό προϊόν που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της μαστίτιδας ήταν μια αλοιφή δυόσμου ( χρησιμοποιήθηκε στις 16 από τις 30 εκτροφές) και ακολουθείται από τη χρήση μιας ποικιλίας ομοιοπαθητικών θεραπευτικών μέτρων. Στο Ηνωμένο Βασίλειο το 56% των περιπτώσεων κλινικής μαστίτιδας θεραπεύτηκαν με τη χρήση εναλλακτικών θεραπειών συμπεριλαμβανομένου και της ομοιοπαθητικής. Στη Δανία κάποιοι βιολογικοί εκτροφείς που προσπαθούσαν να μειώσουν τη χρήση των αντιβιοτικών υιοθέτησαν τη χρήση των αγελάδων-τροφών και την ξηρή περίοδο για τα τεταρτημόρια του μαστού με χρόνια μαστίτιδα για τη διαχείριση της μαστίτιδας.

Στις Η.Π.Α. οι αγελάδες που λαμβάνουν οποιαδήποτε αντιμικροβιακή θεραπεία αποκλείονται από τη βιολογική παραγωγή και οι βιολογικοί εκτροφείς στις Ηνωμένες Πολιτείες αναφέρουν επανειλημμένα ότι δε χρησιμοποιούν αντιβιοτικά για τη θεραπεία της μαστίτιδας. Σε μια έρευνα που έγινε στο Ουισκόνσιν σχεδόν όλοι οι βιολογικοί εκτροφείς (95%) χρησιμοποίησαν κάποια μη αντιμικροβιακά σκευάσματα για τη θεραπεία της κλινικής μαστίτιδας. Η χρήση ενδομαστικών σκευασμάτων, συμπεριλαμβανομένου της ισοφλουπρεδόνης, της βιταμίνης C, του μηλίτη, της αλόης και των μικροβιακών σκευασμάτων αναφέρθηκαν από τους 7 από τους 20 εκτροφείς. Κανένα από αυτά τα προϊόντα δεν είναι εγκεκριμένα ως κτηνιατρικά ή ανθρώπινα προϊόντα για την υγεία και για αυτό η χρήση τους δεν επιτρέπεται από τις οδηγίες του FDA. Οι βιολογικές εκτροφές στις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν, επίσης, αναφέρει τη χρήση εγκεκριμένων αντιφλεγμονωδών φαρμάκων και τη συχνή άμελξη, όπως και τη χρήση μοσχαριών για να θηλάσουν τα τεταρτημόρια με μαστίτιδα.

Παρόλο που φαίνεται να υπάρχει μια επίμονη συσχέτιση μεταξύ της βιολογικής διαχείρισης και της χαμηλότερης παρουσίας βακτηρίων με αντιβιοαντοχή, τα ανθεκτικά βακτήρια εξακολουθούν να υφίστανται στις βιολογικές εκτροφές ακόμη και μετά από χρόνια διαχείρισης χωρίς αντιβιοτικά, υποδεικνύοντας ότι παράγοντες διαφορετικοί από τη χρήση αντιβιοτικών παίζουν σημαντικό ρόλο στη μακροχρόνια εμμονή (Ruegg, 2009).

Στην πράξη, αποθαρρύνεται η χρήση των αντιβιοτικών σε μη θεραπευτικές δόσεις και των αυξητικών παραγόντων σε ζώα που εκτρέφονται σε πιστοποιημένες βιολογικές εκτροφές. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται σε σπάνιες περιπτώσεις για την ευζωία των ζώων ως θεραπεία μιας συγκεκριμένης νόσου. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι χρόνοι

αναμονής είναι μεγάλοι. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις συμβατικές εκτροφές όπου τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες (υποκατάστατα γάλακτος), θεραπευτικά μέσα ρουτίνας (μαστίτιδα και άλλες ασθένειες) και για πρόληψη (θεραπεία ξηρής περιόδου).

Σε μικρής κλίμακας έρευνα που έγινε από το εργαστήριο του πανεπιστημίου Cornell από την υπηρεσία Προώθησης Ποιότητας Γάλακτος οι διαφορές στο επίπεδο αντιβιοαντοχής στελεχών *Staphylococcus aureus* που απομονώθηκαν από ένα βιολογικό κοπάδι γαλακτοπαραγωγής συγκρίθηκαν με το επίπεδο αντιβιοαντοχής στελεχών που απομονώθηκαν από ένα συμβατικό κοπάδι γαλακτοπαραγωγής. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τα στελέχη που απομονώθηκαν από τη βιολογική εκτροφή να παρουσιάζουν υψηλότερο επίπεδο ευαισθησίας από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τη συμβατική εκτροφή (Tikofsky *et al.*, 2002).

Δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι μια πιθανή χαμηλότερη χρήση αντιβιοτικών στις βιολογικές γαλακτοπαραγωγικές εκτροφές έχει οδηγήσει σε πρότυπα αντοχής σημαντικά διαφορετικά από εκείνα των συμβατικών εκτροφών. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι κατανομές των ανθεκτικών παθογόνων ακολουθούν την ίδια τάση αύξησης της αντιβιοαντοχής, όπως σε άλλες χώρες (Busatoa *et al.*, 2000).

Η χρήση αντιβιοτικών στη βιολογική γεωργία βασίζεται σε ειδικούς κανονισμούς των χωρών. Στη Νορβηγία επιτρέπονται τρεις περίοδοι θεραπείας για κάθε ζώο μέσα σε ένα χρόνο. Στη Νορβηγία, τη Δανία και τη Σουηδία η περίοδος αναμονής επεκτείνεται μετά τη χρήση αντιβιοτικών. Στην Ελβετία και τη Δανία απαγορεύεται η προληπτική χρήση αντιβιοτικών. Στις Η.Π.Α. τα βιολογικά ζώα δεν πρέπει να λάβουν αντιβιοτικά, εάν το γάλα και το κρέας πρόκειται να πουληθεί ως βιολογικό. Το χαμηλότερο ποσοστό θεραπείας και επομένως η μειωμένη χρήση αντιβιοτικών μπορεί να μειώσει την πίεση επιλογής από τα αντιβιοτικά.

Λίγες μελέτες έχουν γίνει που να συγκρίνουν την ύπαρξη αντιβιοαντοχής των παθογόνων του μαστού στις βιολογικές και τις συμβατικές εκτροφές. Οι Roesch και συν. δεν ανέφεραν καμία διαφορά στην αντιβιοαντοχή, οι Tikofsky και συν. βρήκαν καλή ευαισθησία στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και οι Sato και συν. ανέφεραν μικρές διαφορές ανάμεσα στη συμβατική και τη βιολογική γεωργία. Οι Pol

και Ruegg ανέφεραν ότι η χρήση πενικιλίνης είχε σχέση με μειωμένη ευαισθησία των στελεχών *S. aureus* και των αρνητικών στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκων (CNS).

Οι Tikofsky και συν. βρήκαν ότι ο *S. aureus* στις αμερικάνικες βιολογικές εκτροφές ήταν περισσότερο ευαίσθητος στα αντιβιοτικά από ότι στις συμβατικές εκτροφές, αλλά επίσης ότι τα στελέχη του *S. aureus* έδειχναν γενικά καλή ευαισθησία. Οι Pol και Ruegg ανέφεραν ότι στελέχη του *S. aureus* είναι περισσότερο πιθανό να είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη στις συμβατικές εκτροφές (Garmo *et al.*, 2010).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (MIC)

### 5.1 Γενικά για την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)

Ο έλεγχος της ευαισθησίας εξυπηρετεί δυο σκοπούς: να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα στον ιατρό για τη συνταγογράφηση των αντιμικροβιακών φαρμάκων και να παρακολουθεί τις αλλαγές στην ευαισθησία των μικροβιακών πληθυσμών (Nel, 2005).

Η *in vitro* αντιβιοαντοχή ενός μικροοργανισμού συνήθως καθορίζεται από μεθόδους διάλυσης σε ζωμό ή διάχυσης δίσκων. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) ή η διάμετρος της ζώνης αναστολής μπορεί να χαρακτηριστεί ως ευαίσθητη, μέσης ευαισθησίας ή ανθεκτική με βάση τα πρότυπα σημεία διαχωρισμού (breakpoint standards) που καθορίζονται από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Ray *et al.*, 2006).

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έχει καταγραφεί ως η μικρότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που αναστέλλει τη βακτηριακή ανάπτυξη (Pitkälä *et al.*, 2008).

Οι MICs, όπως υπολογίζονται σήμερα, είναι προς το παρόν οι απλούστερες εκτιμήσεις της επίδρασης του αντιβακτηριακού *in vitro*. Αν και είναι ημιποσοτικές, έχουν μεγάλη χρησιμότητα. Σήμερα δεν υπάρχει καλύτερο μέτρο της αποτελεσματικότητας του αντιβακτηριακού. Η κεντρική ιδέα της MIC είναι ότι πρόκειται για μια μέτρηση της δραστηριότητας ενός αντιβακτηριακού παράγοντα έναντι ενός μεμονωμένου στελέχους ενός οργανισμού. Έχει γίνει το εργαλείο αναφοράς για τη μέτρηση των δοκιμών ευαισθησίας. Συχνά η αξία της μέτρησης της MIC επικρίνεται, εξαιτίας των μη φυσικών συνθηκών υπό τις οποίες εκτελείται, αλλά αυτή η κριτική χάνει το νόημα. Δεν είναι απαραίτητο να αντικατοπτρίζει ακριβώς τις συνθήκες στην περιοχή της λοίμωξης και φυσικά στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αδύνατο να συμβεί. Ως εκ τούτου, η κοινή πρακτική της σύγκρισης των τιμών της MIC με τα επίπεδα που μετρούνται σε διάφορα μέρη του σώματος είναι στην καλύτερη περίπτωση ποιοτική. Η πραγματική αξία μιας

τιμής MIC είναι ως ένα εργαλείο μέτρησης που δημιουργεί τιμές με τις οποίες άλλες παράμετροι, όπως τα τελικά σημεία φαρμακοδυναμικής και τα κλινικά αποτελέσματα, μπορούν να συγκριθούν αξιόπιστα. Αυτό απαιτεί οι MICs να έχουν ένα λογικό επίπεδο αναπαραγωγιμότητας.

Οι απαρχές της MIC εντοπίζονται στην πρωτότυπη μελέτη του Fleming για την πενικιλίνη. Για δεκαετίες η συμβατική μέθοδος προσδιορισμού των τιμών MIC ήταν σε κανονικούς δοκιμαστικούς σωλήνες με 1-2ml ζωμού, η ονομαζόμενη «μακρομέθοδος». Τη δεκαετία του 1960 η μέθοδος προσαρμόστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης και αυτή έχει γίνει η προτιμώμενη μέθοδος για την εκτέλεση δοκιμών MIC με ζωμό. Οι MICs μπορούν, επίσης, να προσδιοριστούν με αραιώσεις σε άγαρ, όπου το αντιβακτηριακό ενσωματώνεται στο άγαρ και το ενοφθάλμισμα τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια του άγαρ πριν την επώαση.

Οι τιμές που προέρχονται από τις δοκιμές MIC επηρεάζονται αναπόφευκτα από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την επιλεγμένη τεχνική (μακρομέθοδος αραιώσεων σε ζωμό, μικρομέθοδος αραιώσεων σε ζωμό, αραιώση σε άγαρ ή διάχυση σε κλίση), το υπόστρωμα (Mueller-Hinton, Iso-Sensitest ή υπόστρωμα Sensitest, διακύμανση από παρτίδα σε παρτίδα, συγκεντρώσεις δισθενών κατιόντων και επιδράσεις των πρόσθετων, όπως το αίμα), το μέγεθος και τη συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος, τις συνθήκες επώασης (θερμοκρασία και διάρκεια επώασης) και την ακρίβεια στην προετοιμασία των διαφορετικών συγκεντρώσεων των αντιβακτηριακών που χρησιμοποιούνται. Επομένως, μια τιμή MIC έχει νόημα μόνο όταν είναι γνωστές οι μέθοδοι και οι συνθήκες της δοκιμής.

Για του παραπάνω λόγους προτάθηκε πρόσφατα η ανάπτυξη μιας διεθνούς μεθόδου αναφοράς για τον προσδιορισμό των MICs. Η αναγνώριση της αποτελεσματικότητας των διεθνών προτύπων σε άλλους τομείς επιστημονικών μετρήσεων παρακίνησε την ανάπτυξη μιας μεθόδου αναφοράς από το Διεθνή Οργανισμό Προτύπων (ISO) για τις δοκιμές ελέγχου της ευαισθησίας που χρησιμοποιεί μικροαραίωση σε ζωμό και προσαρμοσμένο υπόστρωμα Mueller-Hinton. Εκδόθηκε ως εγκεκριμένο πρότυπο στα τέλη του 2006 (Turnidge, Paterson, 2007).



Η μικρομέθοδος αραιώσεων σε άγαρ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο μιας μεγάλης ποικιλίας αναερόβιων οργανισμών. Αντίθετα, η μικρομέθοδος αραιώσεων σε ζωμό προτείνεται μόνο για τον έλεγχο οργανισμών αναερόβιων μικροοργανισμών που ανήκουν στην ομάδα *Bacteroides fragilis* (CLSI, M11-A7, 2007).

Η ανάλυση των δεδομένων της αντιβιοαντοχής περιορίζεται από τα σημεία διαχωρισμού (breakpoints) της αντιβιοαντοχής και τις σειρές των αραιώσεων. Τα κριτήρια του CLSI για την κατάταξη των απομονωμένων μικροοργανισμών σε ευαίσθητους, μέσης ευαισθησίας και ανθεκτικούς με βάση τα αποτελέσματα της MIC καθορίζονται με βάση τις φαρμακολογικές ιδιότητες του αντιμικροβιακού παράγοντα, τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των παθογόνων και τα κλινικά δεδομένα της αποτελεσματικότητας τους. Στην πράξη η ταξινόμηση των μικροοργανισμών σε ανθεκτικούς ή ευαίσθητους είναι συχνά ο κύριος στόχος και είναι δύσκολη η απόκτηση ακριβών τιμών MIC για διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, όταν εξετάζονται πολλοί μικροοργανισμοί (Ray *et al.*, 2006).

## 5.2 Όρια ευαισθησίας (breakpoints)

Τα breakpoints (όρια ευαισθησίας) είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης μικροβιολογικής εργαστηριακής πρακτικής και χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν την ευαισθησία και την ανθεκτικότητα στα αντιβακτηριακά. Ανάλογα με τη μέθοδο δοκιμής, εκφράζονται είτε ως συγκέντρωση (σε mg/l ή  $\mu\text{g/ml}$ ) είτε ως διάμετρος ζώνης (σε mm). Γενικά, όλες οι μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας απαιτούν breakpoints, γνωστά και ως ερμηνευτικά κριτήρια, ώστε τα αποτελέσματα της δοκιμής να μπορούν να ερμηνευτούν ως ευαίσθητα, μέσης ευαισθησίας ή ανθεκτικά και να αναφερθούν ως τέτοια σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών δοκιμών.

Ο όρος «breakpoint» έχει χρησιμοποιηθεί με ποικίλους τρόπους. Ο πρώτος και ο πιο προφανής αναφέρεται στην MIC για κάθε αντιβακτηριακό που διακρίνει τους άγριους πληθυσμούς βακτηρίων από εκείνους με επίκτητους ή επιλεγμένους μηχανισμούς αντοχής ( τα «άγριου τύπου breakpoints» ονομάζονται κάποιες φορές μικροβιολογικά breakpoints). Τα δεδομένα από τα οποία απορρέουν αυτού του τύπου τα breakpoints

παράγονται από μέτριους έως μεγάλους αριθμούς *in vitro* δοκιμών MIC, ικανών να περιγράψουν τον άγριου τύπου πληθυσμό. Το στέλεχος άγριου τύπου ορίζεται ως το στέλεχος ενός βακτηρίου που δεν υποκρύπτει καμία επίκτητη ή επιλεγμένη ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβακτηριακό που εξετάζεται ή σε αντιβακτηριακά με τον ίδιο μηχανισμό/τόπο δράσης. Τα δεύτερα ονομάζονται, επίσης, μικροβιολογικά breakpoints, τα οποία αναφέρονται στις συγκεντρώσεις (MICs) που ξεχωρίζουν τα στελέχη στα οποία υπάρχει μεγάλη πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας από τα στελέχη στα οποία η θεραπεία είναι πιθανότερο να αποτύχει. Η τρίτη χρήση του όρου «breakpoint» αναφέρεται σε συγκεντρώσεις αντιβακτηριακών που υπολογίστηκαν από τη γνώση μιας παραμέτρου PD και τη διάσταση αυτής της παραμέτρου που προβλέπει αποτελεσματικότητα *in vivo*. Αυτά είναι τα φαρμακοκινητικά/PD (PK/PD) breakpoints, όπου τα δεδομένα που προέρχονται από ένα μοντέλο ζώου προεκτείνονται στους ανθρώπους με τη βοήθεια μαθηματικών ή στατιστικών τεχνικών. Πρόσφατα, σε μια προσπάθεια να μειωθεί η σύγχυση σχετικά με τη σημασία του όρου «breakpoint», η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ελέγχου της Αντιμικροβιακής Ευαισθησίας πρότεινε τη χρήση του όρου «επιδημιολογική (ή άγριου τύπου) τιμή αποκοπής (cutoff)» για να αντικαταστήσει τον όρο «μικροβιολογικό breakpoint».

Τα breakpoints χρησιμοποιούνται για να ορίσουν την ευαισθησία και την ανθεκτικότητα. Οι *in vitro* ορισμοί είναι ως εξής: ευαίσθητος, η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους αναστέλλεται από μια συγκέντρωση αντιβακτηριακού παράγοντα στο εύρος των στελεχών άγριου τύπου. Ανθεκτικός, η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους αναστέλλεται από μια συγκέντρωση αντιβακτηριακού παράγοντα μεγαλύτερη από το εύρος που έχει διαπιστωθεί για τα στελέχη άγριου τύπου. Άγριου τύπου είναι τα στελέχη που δεν υποκρύπτουν επίκτητο μηχανισμό αντοχής για το υπό εξέταση αντιβιοτικό, ειδικότερα καμία αντοχή που αναλογεί σε: (i) μετάλλαξη, (ii) απόκτηση ξένου DNA, (iii) αυξορύθμιση αντλίας εκροής, (iv) αυξορύθμιση παραγωγής στόχου ή (v) οποιοδήποτε συνδυασμό από αυτούς. Οι φαρμακοκινητικοί και κλινικοί ορισμοί έχουν ως εξής: Ευαίσθητο, το βακτηριακό στέλεχος που σχετίζεται με μεγάλη πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας. Μέσης ευαισθησίας, το βακτηριακό στέλεχος που αναστέλλεται από μια συγκέντρωση αντιβακτηριακού παράγοντα που σχετίζεται με αβέβαιο θεραπευτικό αποτέλεσμα και ανθεκτικό, το βακτηριακό στέλεχος που αναστέλλεται από μια συγκέντρωση αντιβακτηριακού παράγοντα που σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας. Ωστόσο, οι παραπάνω ορισμοί δεν

περικλείουν όλες τις έννοιες των κατηγοριών ευαισθησίας. Μια πιο περιληπτική σειρά ορισμών παρέχεται από το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) και είναι οι εξής: Η κατηγορία «ευαίσθητο» συνεπάγεται ότι τα στελέχη αναστέλλονται από τις συνήθεις συγκεντρώσεις αντιμικροβιακού παράγοντα που επιτυγχάνονται, όταν χρησιμοποιείται η συνιστώμενη δόση (δοσολογικό σχήμα) στην τοποθεσία της λοίμωξης. Η κατηγορία «μέσης ευαισθησίας» περιλαμβάνει στελέχη με τιμές MICs του αντιμικροβιακού παράγοντα που πλησιάζουν τα συνήθη εφικτά επίπεδα στο αίμα και τους ιστούς και για τις οποίες τα ποσοστά αντίδρασης μπορεί να είναι χαμηλότερα από εκείνα των ευαίσθητων στελεχών. Η κατηγορία αυτή συνεπάγεται κλινική αποτελεσματικότητα στα μέρη του σώματος όπου τα φάρμακα συγκεντρώνονται φυσιολογικά (π.χ. οι κινολόνες και οι β-λακτάμες στα ούρα) ή όταν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες από τις κανονικές δόσεις φαρμάκου (π.χ. β-λακτάμες). Η κατηγορία περιλαμβάνει, επίσης, μια ζώνη εξουδετέρωσης που πρέπει να προλαμβάνει μικρούς, μη ελεγχόμενους τεχνικούς παράγοντες από το να προκαλέσουν σοβαρές αποκλίσεις στις ερμηνείες για φάρμακα με στενά φαρμακοτοξικά όρια. Η κατηγορία «ανθεκτικό» συνεπάγεται ότι τα στελέχη δεν αναστέλλονται από τις συνήθεις συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού παράγοντα σε φυσιολογικά δοσολογικά σχήματα και/ή επιδεικνύουν τιμές MICs/διαμέτρου ζώνης που εμπίπτουν στην περιοχή όπου είναι πιθανοί συγκεκριμένοι μικροβιακοί μηχανισμοί αντοχής (π.χ. β-λακτάμες) και όπου η κλινική αποτελεσματικότητα κατά των στελεχών δεν έχει αποδειχθεί αξιόπιστα σε μελέτες θεραπείας.

Οι διαδικασίες με τις οποίες καθορίζονται τα breakpoints ποικίλουν ευρέως μεταξύ των δοκιμών ελέγχου ευαισθησίας. Μόνο δύο διεθνείς οργανισμοί καθορισμού προτύπων, το Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) και η Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τον Έλεγχο της Αντιμικροβιακής Ευαισθησίας (European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) έχουν εκδόσει κατευθυντήριες γραμμές για τις οποίες απαιτούνται δεδομένα για τη ρύθμιση των breakpoints και πώς εφαρμόζονται αυτά τα δεδομένα στη ρύθμιση των breakpoints. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων της Αμερικής θέτει, επίσης, breakpoints για αντιβακτηριακά τη στιγμή της έγκρισής τους προς χρήση.

Τα breakpoints μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πολλούς τρόπους. Επιτρέπουν την επικοινωνία ανάμεσα στο κλινικό εργαστήριο και τον συνταγογράφο σχετικά με την πιθανότητα μια συγκεκριμένη αντιβακτηριακή αγωγή να είναι κλινικά χρήσιμη στη θεραπεία ασθενών με λοιμώξεις. Επιτρέπουν, επίσης, την επιδημιολογική μελέτη της αλλαγής των μοντέλων αντοχής σε ένα ορισμένο ίδρυμα ή σε μια γεωγραφική περιοχή. Τα breakpoints πρέπει να καθορίζονται πριν από την κλινική χρήση ενός αντιβακτηριακού και να αναθεωρούνται, όταν οι μηχανισμοί αντοχής στο αντιβακτηριακό είναι πλέον εμφανείς (Turnidge, Paterson, 2007).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1.1 Δειγματοληψία

Συγκεντρώθηκαν τυχαία 25 δείγματα γάλακτος από ισάριθμες συμβατικές εκτροφές αιγοπροβάτων και 25 δείγματα γάλακτος από ισάριθμες βιολογικές εκτροφές αιγοπροβάτων της ευρύτερης περιοχής της Θεσσαλίας σε χρονικό διάστημα τριών μηνών. Η δειγματοληψία έγινε υπό άσηπτες συνθήκες απευθείας από την παγολεκάνη των εκτροφών, τα δείγματα μεταφέρθηκαν υπό ψύξη (4°C) στο χώρο του εργαστηρίου και η εργαστηριακή ανάλυση ξεκίνησε εντός 12 ωρών το αργότερο. Η συντήρηση των δειγμάτων έγινε σε συνθήκες ψύξης ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Τα δείγματα πριν από την ανάλυση έμειναν εκτός ψυγείου, μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία εργαστηρίου.

### 1.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση του *Staphylococcus aureus*

Η απομόνωση και ταυτοποίηση του *S. aureus* στηρίχθηκε στις παρακάτω μεθόδους:

α) National Standard Method: Preparation of samples and decimal dilutions (NSA, 2005),

β) EN ISO 6888-1:1999 : Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (ISO, EN ISO 6888-1:1999),

γ) EN ISO 6888-1:1999 /Amd.1:2003(E): Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium, Amedment 1: Inclusion of precision data (ISO, EN ISO 6888-1:1999 /Amd.1:2003(E)),

δ) EN ISO 6889-1:1999 / A1:2004 (ISO, 2004) ,

ε) Bacteriological Analytical Manual, Chapter 12 : *Staphylococcus aureus* (FDA, 2001) , και

στ) National Standard Method : Enumeration of *Staphylococcus aureus* (F12) (NSA, 2005).

Σκοπός της μεθόδου ήταν η ανίχνευση και η καταμέτρηση του *S. aureus* στο δείγμα μέσω της ταυτοποίησης των αποικιών που αναπτύσσονται σε στερεό υπόστρωμα (Baird-Parker) μετά από αερόβια επώαση στους 37 °C για  $48 \pm 4$  ώρες.

### **1.2.1 Προετοιμασία του δείγματος**

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν εκτός ψυγείου και παρέμειναν σε θερμοκρασία εργαστηρίου για μια ώρα πριν την ανάλυση.

### **1.2.2 Αραιώσεις**

Έγιναν πέντε δεκαδικές αραιώσεις του δείγματος (έως  $10^{-5}$ ) με αραιωτικό μέγιστης ανάκτησης, MRD ( Maximum Recovery Diluent). 1ml δείγματος μεταφέρθηκε σε 9ml MRD (αραίωση  $10^{-1}$ ). Από την αραιώση αυτή μεταφέρθηκαν, μετά από ανάδευση, 0,1ml σε 0,9ml MRD (αραίωση  $10^{-2}$ ). Από τη δεύτερη αραιώση μεταφέρθηκαν 0,1ml σε 0,9ml MRD (αραίωση  $10^{-3}$ ), κ.ο.κ. ως την αραιώση  $10^{-5}$ .

### **1.2.3 Ενοφθαλμισμός**

Από κάθε αραιώση ενοφθαλμίστηκε διπλή σειρά τρυβλίων με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Baird-Parker άγαρ. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια μικροπιπέτας μεταφέρθηκαν 0,1ml από κάθε αραιώση σε κάθε ένα από τα δυο τρυβλία και το

ενοφθάλμισμα εξαπλώθηκε προσεκτικά με τη βοήθεια αποστειρωμένου κεκαμμένου ραβδίου (spreader) στην επιφάνεια του άγαρ το συντομότερο δυνατό, προσπαθώντας να μην έρθει σε επαφή με τις άκρες του τρυβλίου. Τα τρυβλία αφέθηκαν να στεγνώσουν με κλειστά καπάκια για περίπου 15 λεπτά σε θερμοκρασία εργαστηρίου.

#### **1.2.4 Επώαση**

Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για  $24 \pm 2$  ώρες και, αφού ελέγχθηκαν, επώαστηκαν ξανά για άλλες  $24 \pm 2$  ώρες.

#### **1.2.5 Επιλογή τρυβλίων και επιβεβαίωση**

Μετά την επώαση των πρώτων 24 ωρών σημειώθηκαν στον πυθμένα των τρυβλίων οι θέσεις των τυπικών αποικιών, αν υπήρχαν. Μετά το δεύτερο εικοσιτετράωρο επώασης σημειώθηκαν όλες οι νέες τυπικές αποικίες. Επίσης, σημειώθηκαν και οι μη τυπικές αποικίες, όπου υπήρχαν. Για επιβεβαίωση επιλέχθηκαν 5 τυπικές αποικίες, αν υπήρχαν μόνο τυπικές αποικίες, ή 5 άτυπες αποικίες, αν υπήρχαν μόνο άτυπες αποικίες, ή 5 τυπικές και 5 άτυπες αποικίες, αν υπήρχαν και οι δυο τύποι αποικιών, από κάθε τρυβλίο. Αν υπήρχαν λιγότερες από 5 τυπικές και/ή άτυπες αποικίες στο τρυβλίο επιλέγονταν όλες οι αποικίες για επιβεβαίωση.

Η επιβεβαίωση των τυπικών ή ύποπτων αποικιών στηρίχθηκε στη μορφολογία τους, στη χρώση Gram, στην παραγωγή καταλάσης, στη δοκιμή της κοαγκουλάσης (πηκτάσης) και σε βιοχημικές αναλύσεις με το σύστημα API Staph (Biomérieux, Lyon, France). Οι επιλεγμένες αποικίες ανακαλλιεργήθηκαν σε TSA και μετά από επώαση στους 37°C για 18-24 ώρες, έγιναν οι επιβεβαιωτικές δοκιμές. Ο *S. aureus* είναι gram θετικός, έχει το ένζυμο καταλάση και είναι πηκτάση θετικός.



### 1.2.5 α) Μορφολογία των αποικιών

Οι τυπικές αποικίες που αναμένεται να αναπτυχθούν στο θρεπτικό υπόστρωμα Baird-Parker άγαρ σε περίπτωση παρουσίας *St. aureus* είναι μαύρες ή γκριζες, γυαλιστερές και κυρτές, με διάμετρο 1mm έως 1,5mm μετά από επώαση 24 ωρών και 1,5mm έως 2,5mm μετά από επώαση 48 ωρών και περιβάλλονται από διαφανή άλω. Μετά από επώαση τουλάχιστον 24 ωρών μπορεί να εμφανιστεί σε αυτή τη διαφανή άλω ένας ιριδίζον δακτύλιος σε άμεση επαφή με την άλω. Οι μη τυπικές αποικίες μπορεί να έχουν μία από τις παρακάτω μορφολογίες: α) γυαλιστερές μαύρες αποικίες, συνήθως περιγεγραμμένες. Η διαυγής άλως δεν υπάρχει ή είναι μόλις εμφανής και ο ιριδίζον δακτύλιος δεν υπάρχει ή είναι μετά βίας εμφανής, και β) γκριζες αποικίες χωρίς διαφανή άλω.

### 1.2.5 β) Χρώση Gram

Ο *S. aureus* είναι Gram θετικός.

### 1.2.5 γ) Δοκιμή της καταλάσης

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε  $H_2O$  και  $O_2\uparrow$ . Το ένζυμο καταλάση βρίσκεται σε όλα σχεδόν τα αερόβια και δυνητικά αναερόβια βακτήρια που έχουν κυτοχρώματα. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται ως τελικό προϊόν της αεροβίου διασπάσεως των σακχάρων (FDA, 2001). Για τη δοκιμή της καταλάσης μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπου είχε τοποθετηθεί μια σταγόνα  $H_2O_2$ , ένα μέρος από κάθε επιλεγμένη αποικία με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου μιας χρήσης και σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος σχηματίζονταν έντονες φυσαλίδες.

#### 1.2.5 δ) Δοκιμή της κοαγκουλάσης (πηκτάσης)

Για τη δοκιμή της πηκτάσης μεταφέρθηκε από τη επιφάνεια κάθε επιλεγμένης αποικίας ένα μέρος με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου μιας χρήσης σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε ζωμό Brain-heart infusion. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για  $24 \pm 2$  ώρες. Μετά την επώαση προστέθηκαν ασηπτικά 0,1 ml από κάθε καλλιέργεια σε 0,3 ml πλάσματος κουνελιού σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες επώασης και επώαστηκαν στους 37°C. Μετά από 4-6 ώρες εξετάστηκε το πήξιμο του πλάσματος και, αν η δοκιμή ήταν αρνητική, επανεξετάζονταν στις 24 ώρες επώασης. Η δοκιμή της κοαγκουλάσης θεωρείται θετική, αν ο όγκος του πήγματος καταλαμβάνει πάνω από το μισό όγκο του αρχικού υγρού. Ως αρνητικός έλεγχος για κάθε παρτίδα πλάσματος, προστέθηκε 0,1 ml στείρου ζωμού Brain-heart infusion στο πλάσμα κουνελιού και επώαστηκε χωρίς ενοφθαλμισμό. Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, το πλάσμα ελέγχου δεν έπρεπε να δείχνει σημάδια πήξης.

#### 1.2.5 ε) Βιοχημική ταυτοποίηση

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με το σύστημα API Staph (Biomérieux, Lyon, France). Το API Staph είναι ένα σύστημα ταυτοποίησης των ειδών του γένους *Staphylococcus* και *Micrococcus* το οποίο χρησιμοποιεί ειδικές βιοχημικές δοκιμασίες. Οι βιοχημικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε μια ταινία με αφυδατωμένα υποστρώματα σε μεμονωμένες θέσεις. Εναιώρημα του προς μελέτη Gram θετικού κόκκου (0.5 της κλίμακας McFarland) εμβολιάστηκε με σύριγγα στις ειδικές θέσεις και η ταινία επώαστηκε για 18-24 ώρες στους 37 °C και σε υγρή ατμόσφαιρα. Το αποτέλεσμα έχει σχέση με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη pH σε κάθε υπόστρωμα. Ο χαρακτηρισμός του είδους έγινε με βάση το ειδικό λογισμικό APIweb (bioMérieux, France) (EN ISO 6888-1:1999, ISO 6888-1:1999 /Amd.1:2003(E), EN ISO 6889-1:1999 / A1:2004, FDA, 2001).

### **1.2.6 Καταμέτρηση των αποικιών**

Για την καταμέτρηση χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα τρυβλία που περιείχαν το πολύ 300 αποικίες από τις οποίες οι 150 ήταν τυπικές και/ή άτυπες αποικίες σε δυο διαδοχικές αραιώσεις. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης εκφράζονται σε cfu/ml γάλακτος.

### **1.2.7 Συντήρηση των στελεχών *S. aureus***

Τα στελέχη του *S. aureus* που απομονώθηκαν ανακαλλιεργήθηκαν σε TSA και μετά από επώαση στους 37°C για 18-24 ώρες, μεταφέρθηκαν σε σωλήνες Eppendorf με διάλυμα γλυκερόλης και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους -70°C έως -80°C.

### **1.3. Απομόνωση και ταυτοποίηση των *Streptococcus agalactiae* και *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae***

Σκοπός της μεθόδου ήταν η ανίχνευση και η καταμέτρηση του *Streptococcus agalactiae* και του *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* στο δείγμα μέσω της ταυτοποίησης των αποικιών που αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (αιματούχο άγαρ) μετά από αερόβια επώαση στους 37°C για 24 ± 2 ώρες.

#### **1.3.1 Προετοιμασία του δείγματος**

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν εκτός ψυγείου και παρέμειναν σε θερμοκρασία εργαστηρίου για μια ώρα πριν την ανάλυση.

### 1.3.2 Αραιώσεις

Έγιναν πέντε δεκαδικές αραιώσεις του δείγματος (έως  $10^{-5}$ ) με αραιωτικό μέγιστης ανάκτησης, MRD (Maximum Recovery Diluent). 1ml δείγματος μεταφέρθηκε σε 9ml MRD (αραίωση  $10^{-1}$ ). Από την αραιώση αυτή μεταφέρθηκαν, μετά από ανάδευση, 0,1ml σε 0,9ml MRD (αραίωση  $10^{-2}$ ). Από τη δεύτερη αραιώση μεταφέρθηκαν 0,1ml σε 0,9ml MRD (αραίωση  $10^{-3}$ ), κ.ο.κ. ως την αραιώση  $10^{-5}$ .

### 1.3.3 Ενοφθαλμισμός

Από κάθε αραιώση ενοφθαλμίστηκε διπλή σειρά τρυβλίων με θρεπτικό υπόστρωμα αιματούχο άγαρ (Blood agar). Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια μικροπιπέτας μεταφέρθηκαν 0,1ml από κάθε αραιώση σε κάθε ένα από τα δυο τρυβλία και το ενοφθάλμισμα εξαπλώθηκε προσεκτικά με τη βοήθεια αποστειρωμένου κεκαμμένου ραβδίου (spreader) στην επιφάνεια του άγαρ το συντομότερο δυνατό, προσπαθώντας να μην έρθει σε επαφή με τις άκρες του τρυβλίου. Τα τρυβλία αφέθηκαν να στεγνώσουν με κλειστά καπάκια για περίπου 15 λεπτά σε θερμοκρασία εργαστηρίου.

### 1.3.4 Επώαση

Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επώαστηκαν στους  $37^{\circ}\text{C}$  για  $24 \pm 2$  ώρες.

### 1.3.5 Επιλογή τρυβλίων και επιβεβαίωση

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης επιλέχθηκαν, επιβεβαιώθηκαν και καταμετρήθηκαν οι αποικίες του *Streptococcus agalactiae* και του *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* με βάση τη μορφολογία τους, τη χρώση Gram (θετικοί), τη δοκιμή της

καταλάσης (αρνητικοί), την ορολογική τους ταυτοποίηση με τη βοήθεια του Slidex Streptoplus, και η επιβεβαίωσή τους έγινε με το API 20 Strep.

Για επιβεβαίωση επιλέχθηκαν 5 τυπικές αποικίες από κάθε τρυβλίο. Αν υπήρχαν λιγότερες από 5 τυπικές και/ή άτυπες αποικίες στο τρυβλίο επιλέγονταν όλες οι αποικίες για επιβεβαίωση. Οι επιλεγμένες αποικίες ανακαλλιεργήθηκαν σε TSA και μετά από επώαση στους 37°C για 18-24 ώρες, έγιναν οι επιβεβαιωτικές δοκιμές.

#### **1.3.5 α) Μορφολογία αποικιών**

Οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι (*Streptococcus agalactiae*) προκαλούν β-αιμόλυση και αναπτύσσουν αποικίες διαμέτρου 0,5mm, λείες, περιγεγραμμένες, ξηρές και κάποιες φορές αποσπώνται δύσκολα από το τρυβλίο. Ο *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* προκαλεί α-αιμόλυση ή καθόλου αιμόλυση (NSA, Identification Of *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. And morphologically similar organisms, 2007).

#### **1.3.5 β) Χρώση Gram**

Οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι (*Streptococcus agalactiae*) και ο *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* είναι Gram θετικοί.

#### **1.3.5 γ) Δοκιμή καταλάσης**

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε  $H_2O$  και  $O_2\uparrow$ . Το ένζυμο καταλάση βρίσκεται σε όλα σχεδόν τα αερόβια και δυνητικά αναερόβια βακτήρια που έχουν κυτοχρώματα. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται ως τελικό προϊόν της αεροβίου διασπάσεως των σακχάρων. Για τη δοκιμή

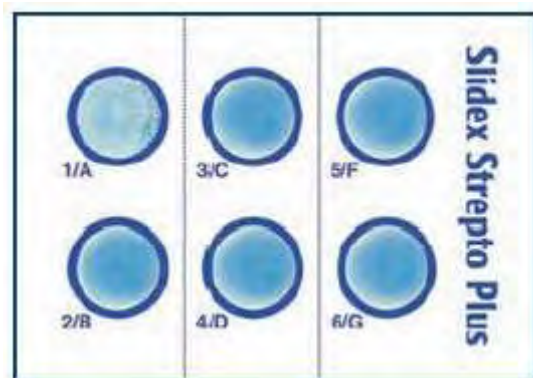
της καταλάσης μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπου είχε τοποθετηθεί μια σταγόνα  $H_2O_2$ , ένα μέρος από κάθε επιλεγμένη αποικία με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου μιας χρήσης και σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος σχηματίστηκαν έντονες φυσαλίδες. Στην περίπτωση του αναμενόμενου αρνητικού αποτελέσματος δεν παρατηρούνταν καμία αλλαγή.

#### 1.3.5 δ) Ορολογική ταυτοποίηση

Εφαρμόζεται για τις ομάδες A,B,C,D,F, και G κατά Lancefield. Μπορεί να συμβούν διασταυρούμενες αντιδράσεις.

Το Slidex Strepto Plus είναι μια δοκιμή συγκόλλησης latex για την αναγνώριση των αντιγόνων των ομάδων A, B, C, D, F και G των αποικιών μετά από μια απλή ενζυμική διαδικασία. Χρησιμοποιεί μπλε σωματίδια λάτεξ ευαισθητοποιημένα με ειδικά της ομάδας αντι-στρεπτοκοκκικά αντισώματα για να ανιχνεύσουν την παρουσία στρεπτοκοκκικών αντιγόνων. Η ομαδοποίηση των στρεπτοκοκκικών στελεχών επιτρέπει τον προσανατολισμό της αντιβιοτικής θεραπείας και ως εκ τούτου βοηθάει να βελτιωθεί η ποιότητα της φροντίδας του ασθενή.

(BioMerieux, 2011)



#### 1.3.5 ε) Βιοχημική ταυτοποίηση

Το API 20 Strep είναι ένα σύστημα ταυτοποίησης των στρεπτόκοκκων και των σχετικών βακτηρίων μέσα σε 4 ή 24 ώρες, το οποίο χρησιμοποιεί ειδικές βιοχημικές

δοκιμές και δοκιμές ζύμωσης. Η ταυτοποίηση είναι ακριβής σε επίπεδο είδους και είναι σημαντική για την επιδημιολογία και τον καθορισμό της θεραπείας, εφόσον η παθογένεια ή οι αντιβιοτύποι των ειδών ποικίλλουν εντός της ίδιας ορολογικής ομάδας. Οι βιοχημικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε μια ταινία με αφυδατωμένα υποστρώματα σε μεμονωμένες θέσεις. Εναιώρημα του προς μελέτη Gram θετικού κόκκου (0.5 της κλίμακας McFarland) εμβολιάστηκε με σύριγγα στις ειδικές θέσεις και η ταινία επώαστηκε για 18-24 ώρες στους 37 °C και σε υγρή ατμόσφαιρα. Το αποτέλεσμα έχει σχέση με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη pH σε κάθε υπόστρωμα. Ο χαρακτηρισμός του είδους έγινε με βάση το ειδικό λογισμικό APIweb (bioMerieux, France).

### **1.3.6 Καταμέτρηση των αποικιών**

Για την καταμέτρηση χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα τρυβλία που περιείχαν το πολύ 300 αποικίες από τις οποίες οι 150 ήταν τυπικές και/ή άτυπες αποικίες σε δυο διαδοχικές αραιώσεις. Καταμετρήθηκαν οι επιβεβαιωμένες αποικίες και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε cfu/ml γάλακτος.

### **1.3.7 Συντήρηση των στελεχών *Streptococcus agalactiae* και *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae***

Τα στελέχη του *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* που απομονώθηκαν ανακαλλιεργήθηκαν σε TSA και μετά από επώαση στους 37°C για 18-24 ώρες, μεταφέρθηκαν σε σωλήνες Eppendorf με διάλυμα γλυκερόλης και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους -70°C έως -80°C.

## 1.4 Προσδιορισμός της αντιβιοαντοχής

Για τον προσδιορισμό της αντιβιοαντοχής των απομονωθέντων στελεχών χρησιμοποιήθηκε η μικρομέθοδος των αραιώσεων σε ζωμό για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC). Η MIC ενός αντιβιοτικού είναι η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού in vitro.

### 1.4.1 Μικρομέθοδος αραιώσεων σε ζωμό

Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες, πλαστικές μικροπλάκες αραιώσης με σφαιρικά βοθρία. Οι πλάκες που περιείχαν τα αντιμικροβιακά φάρμακα προς έλεγχο προετοιμάστηκαν στο εργαστήριο και περιγράφονται παρακάτω. Τα αντιμικροβιακά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 1 :

**Πίνακας 1 :** Αντιμικροβιακά φάρμακα

Αριθμός	Αντιμικροβιακό	Προμηθευτής
1	Πενικιλίνη	Fluka
2	Αμπικιλίνη	Sigma
3	Τετρακυκλίνη	Fluka
4	Τριμεθοπρίμη/ Σουλφαμεθοξαζόλη	Sigma
5	Χλωραμφαινικόλη	Fluka
6	Ερυθρομυκίνη	Sigma-Aldrich
7	Γενταμυκίνη	Sigma
8	Νεομυκίνη	Sigma
9	Ναλιδιξικό οξύ	Fluka
10	Μεθικιλίνη	Sigma
11	Βανκομυκίνη	Sigma



#### **1.4.1 α) Προετοιμασία των μητρικών διαλυμάτων των αντιμικροβιακών**

##### **i) Ζύγισμα των σκονών των αντιμικροβιακών φαρμάκων**

Οι σκόνες ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκαν ώστε να αποδώσουν την απαιτούμενη συγκέντρωση, με βάση την ισορροπημένη δραστικότητα ή τη δραστικότητα των αντίστοιχων αντιμικροβιακών φαρμάκων. Ο ακόλουθος τύπος χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστεί η ποσότητα του αραιωτικού που χρειαζόταν για ένα πρότυπο διάλυμα:

$$\text{Όγκος (ml)} = \frac{\text{Βάρος (mg)} \times \text{Δραστικότητα (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)}}$$

Οι σκόνες των αντιμικροβιακών αποθηκεύτηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

##### **ii) Προετοιμασία των μητρικών διαλυμάτων**

Τα μητρικά διαλύματα των αντιμικροβιακών προετοιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε εξαρτιόταν από τη μέγιστη αραιώση που εξεταζόταν για κάθε αντιμικροβιακό στο φάσμα των αραιώσεών του. Ως αραιωτικό χρησιμοποιήθηκε ο ζωμός Mueller Hinton.

Ποσότητες των 1000 $\mu\text{l}$  του μητρικού διαλύματος διανεμήθηκαν σε σωλήνες Eppendorf των 2ml (δύο σωλήνες για κάθε αντιμικροβιακό), σφραγίστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους  $-70^{\circ}\text{C}$ . Τα περισσότερα μητρικά διαλύματα των αντιμικροβιακών παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον έξι μήνες στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και περισσότερο στους  $-70^{\circ}\text{C}$  σε συγκεντρώσεις των 1000 $\mu\text{g/ml}$  ή μεγαλύτερες. Τα φιαλίδια απομακρύνθηκαν από την κατάψυξη, όταν χρειάστηκε και χρησιμοποιήθηκαν την ίδια μέρα. Το αποψυγμένο διάλυμα που δε χρησιμοποιήθηκε απορρίφθηκε στο τέλος της μέρας.

### 1.4.1 β) Αραίωση των αντιμικροβιακών φαρμάκων

Το σχήμα αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκε καθορίστηκε με βάση τα δημοσιευμένα breakpoints του CLSI για τα διάφορα αντιμικροβιακά και αναφέρονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2 :** Σχήμα αραιώσεων των αντιμικροβιακών φαρμάκων

Στήλη	Αντιμικροβιακό	Εύρος συγκεντρώσεων (μg/ml)
1	Πενικιλίνη	0,03125 – 4
2	Αμπικιλίνη	0,0625 – 8
3	Τετρακυκλίνη	0,25 – 32
4	Τριμεθοπρίμη/ Σουλφαμεθοξαζόλη	0,5 – 64
5	Χλωραμφαινικόλη	2 – 256
6	Ερυθρομυκίνη	0,25 – 32
7	Γενταμυκίνη	0,25 – 32
8	Νεομυκίνη	0,0625 – 8
9	Ναλιδιξικό οξύ	5,5 – 704
10	Μεθικιλίνη	1 – 128
11	Βανκομυκίνη	0,5 – 64

Τα μητρικά διαλύματα των αντιμικροβιακών αραιώθηκαν όπως φαίνεται στον Πίνακα 3:

**Πίνακας 3:** Σχήμα για την προετοιμασία των αραιώσεων των αντιμικροβιακών φαρμάκων στις δοκιμές μικροαραιώσεων σε ζωμό

<u>Αντιμικροβιακό διάλυμα:</u>			Όγκος <sup>α</sup> MHB <sup>β</sup> Τελική + Όγκος <sup>α</sup> = Συγκέν. LOG <sub>2</sub>			
Βήμα	Συγκέν- τρωση	Πηγή				
1	80 µg/ml	Μητρικό διάλυμα	1 ml	9 ml	8 µg/ml	9
2	8	Βήμα 1	1	1	4	8
3	8	Βήμα 1	1	3	2	7
4	8	Βήμα 1	1	7	1	6
5	1	Βήμα 4	1	1	0,5	5
6	1	Βήμα 4	1	3	0,25	4
7	1	Βήμα 4	1	7	0,125	3
8	0,125	Βήμα 7	1	1	0,0625	2

α: Οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολλαπλάσιοι αυτών, ανάλογα με τη δοκιμασία. Το συγκεκριμένο παράδειγμα αφορά την πενικιλίνη.

β: Mueller Hinton Broth

γ: Το σχήμα αποκτήθηκε από το NCCLS Document M31-A, Vol. 19 No. 11, June 1999.

Το εύρος των συγκεντρώσεων για κάθε αντιμικροβιακό που χρησιμοποιήθηκε στο σχήμα των αραιώσεων φαίνεται στον Πίνακα 2.

α) Αν το ενοφθάλμισμα προστίθεται με το χέρι με τη βοήθεια μικροπιπέτας, επιτρέπεται αραιώση 1:2 του τελικού φαρμάκου. Αυτό κατέστη δυνατό προετοιμάζοντας διάλυμα διπλάσιας ισχύος για κάθε συγκέντρωση αντιμικροβιακού φαρμάκου.

β) Από κάθε συγκέντρωση αντιμικροβιακού φαρμάκου στο εύρος των αραιώσεων ποσότητες των 50µL διανεμήθηκαν στα αντίστοιχα βοθρία σε κάθε μικροπλάκα.

γ) Κάθε μικροπλάκα περιλάμβανε, επίσης, ένα βοθρίο ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση αντιμικροβιακού στο εύρος των αραιώσεων που δεν περιείχε καθόλου αντιμικροβιακό διάλυμα, αλλά μόνο το βακτηριακό ελαιώρημα για να ελεγχθεί η βιωσιμότητα του υπό έλεγχο οργανισμού.

#### **1.4.1 γ) Προετοιμασία του ζωμού**

21gr Mueller Hinton broth διαλύθηκαν σε 1 λίτρο αποσταγμένο νερό, αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 121°C και ψύχθηκαν, αφού κρύωσαν σε θερμοκρασία δωματίου, στους 4°C. Το pH του Mueller Hinton broth ελέγχθηκε με pHμετρο, όταν ήταν έτοιμο το υπόστρωμα. Το κατάλληλο pH σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) είναι 7,2-7,4.

#### **1.4.1 δ) Προετοιμασία και αποθήκευση των μικροπλακών αραιώσης**

Ακολουθήθηκαν οι παρακάτω διαδικασίες κατά την προετοιμασία των μικροπλακών:

1. Όταν οι πλάκες είχαν γεμίσει με τις αραιώσεις των αντιμικροβιακών, τοποθετήθηκαν σε ομάδες των πέντε πλακών και καλύφθηκαν με κατάλληλη κολλητική διάφανη ταινία. Με τον τρόπο αυτό κάθε πλάκα εφάρμοζε στενά στην επάνω επιφάνεια της άλλης, ώστε να ελαχιστοποιείται η εξάτμιση και η μόλυνση.

2. Κάθε στοίβα καλύφθηκε με φύλλο αλουμινίου.

3. Οι συσκευασμένες πλάκες αποθηκεύτηκαν στους -70°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Αυτοί οι χειρισμοί εξασφάλισαν τη μέγιστη σταθερότητα των διαλυμάτων των αντιμικροβιακών.

4. Πριν τον ενοφθαλμισμό οι πλάκες αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα πριν τη χρήση.

5. Η αποθήκευση στους  $-70^{\circ}\text{C}$  μπορεί να αυξήσει σημαντικά τη διάρκεια ζωής σε τουλάχιστον 2 μήνες. Οι πλάκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν μετά από 2 εβδομάδες.

#### **1.4.1 ε) Διαδικασίες ενοφθαλμισμού**

##### **i) Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος**

Χρησιμοποιήθηκε μετρητής αποικιών για την τυποποίηση του ενοφθαλμίσματος.

1. Τέσσερις ή πέντε αποικίες με την ίδια μορφολογική εμφάνιση επιλέχθηκαν και λήφθηκαν με τη βοήθεια πλαστικού κρίκου μιας χρήσεως από τρυβλία μιας ημέρας.

2. Οι αποικίες διαλύθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα με 5ml Mueller Hinton broth.

3. Το μικροβιακό εναιώρημα τοποθετήθηκε στο μετρητή αποικιών και η επιθυμητή θολρότητα ήταν 0.5 κλίμακας McFarland, που αντιστοιχεί σε  $1-2 \times 10^8$  cfu/ml για *E. coli* ATCC 25922.

##### **ii) Ενοφθαλμισμός του ζωμού**

Σε κάθε βοθρίο προστέθηκαν 50μL μικροβιακού εναιωρήματος μέσα σε 15 λεπτά από την τυποποίησή του. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να διαιρεθεί στο μισό η συγκέντρωση του διαλύματος αντιμικροβιακού που ήδη υπήρχε στο βοθρίο και έτσι να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση. Για να αποφευχθεί η ξήρανση, κάθε πλάκα σφραγίστηκε με κατάλληλη πλαστική κολλητική ταινία πριν την επώαση.

#### **1.4.1 στ) Επώαση**

Οι πλάκες επώαστηκαν στους 37°C για 16 έως 20 ώρες σε αερόβιο περιβάλλον. Ο κλίβανος επώασης διατηρήθηκε με ικανοποιητική υγρασία για την αποφυγή της εξάτμισης, αλλά όχι με υπερβολική υγρασία που θα οδηγούσε σε συμπύκνωση.

#### **1.4.2 Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια μετρητή αποικιών. Κάποια βοθρία δεν είχαν ξεκάθαρη εικόνα, φαινόταν σα ξεθωριασμένα σημεία, αλλά κάτι τέτοιο ήταν φυσιολογικό για τις σουλφοναμίδες. Βρέθηκαν βοθρία, όπου δεν παρατηρούνταν ανάπτυξη, ενώ παρατηρούνταν στα προηγούμενα και στο (στα) επόμενο (επόμενα), αλλά όταν ήταν στη σειρά μόνο ένα τέτοιο βοθρίο, τα αποτελέσματα ήταν αποδεκτά. Αν υπήρχαν αποκλίσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα, οι πλάκες θα απορρίπτονταν και θα επανεξετάζονταν νέες πλάκες. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε. Μετά την ανάγνωση των πλακών, οι MICs καταγράφηκαν ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντίστοιχου αντιμικροβιακού που ανέστειλε την ορατή ανάπτυξη (CLSI, M07-A8, 2009).

Οι κατανομές της MIC υπολογίστηκαν και τα αποτελέσματα ταξινομήθηκαν με βάση τα σημεία διακοπής (breakpoints) που προτείνονται από το CLSI (2004) για τα βακτήρια που απομονώνονται από ζώα.

### **1.5 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων – Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 19.0. Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται είτε ως μέση τιμή (mean) με την τυπική απόκλιση (standard deviation) είτε ως διάμεσος (median) με το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (interquartile range-IQR) ή και με το εύρος (range). Οι

κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως απόλυτες συχνότητες με τα αντίστοιχα ποσοστά. Για τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ συμβατικών και βιολογικών γαλάτων ως προς την παρουσία *S.aureus* χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney. Για τη διερεύνηση της σχέσης της αντιβιοαντοχής μεταξύ συμβατικών και βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Fisher's exact test. Όταν η τιμή p-value ήταν μικρότερη του 0,05, το αποτέλεσμα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εξετάστηκαν πενήντα δείγματα αιγοπρόβειου γάλακτος, από τα οποία 25 προέρχονταν από συμβατικές εκτροφές και τα υπόλοιπα 25 δείγματα προέρχονταν από συμβατικές εκτροφές.

### 2.1 Παρουσία του *Staphylococcus aureus* σε συμβατικό και βιολογικό γάλα

Στελέχη *S. aureus* απομονώθηκαν στα 7 από τα 25 δείγματα συμβατικού γάλακτος (ποσοστό 28%) και στα 10 από τα 25 δείγματα βιολογικού γάλακτος (ποσοστό 40%) (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4:** Παρουσία του *S. aureus* σε συμβατικό και βιολογικό γάλα

Είδος γάλακτος	Αριθμός δειγμάτων	%	Παρουσία	%
Συμβατικό	25	50	7	28
Βιολογικό	25	50	10	40
Σύνολο	50	100	17	34

Η ταυτοποίηση των στελεχών του *S. aureus* έγινε με βάση τη μορφολογία των αποικιών, τη χρώση Gram, τη δοκιμή της καταλάσης, τη δοκιμή της κοαγκουλάσης (πηκτάσης) και το βιοχημικό σύστημα API Staph. Στον Πίνακα 5 αποτυπώνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των δοκιμών για όλα τα δείγματα. Ο *S. aureus* είναι θετικός κατά Gram, έχει το ένζυμο καταλάση, είναι θετικός στην πηκτάση και με το σύστημα API Staph ταυτοποιείται με τη βοήθεια ειδικών βιοχημικών διαδικασιών. Στην προτελευταία στήλη του Πίνακα 5 αναγράφεται το αποτέλεσμα που προκύπτει από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων των δοκιμών και ως θετικό ορίζεται το αποτέλεσμα που ταυτοποιεί τον *S. aureus* και ως αρνητικό το αντίθετο αποτέλεσμα.



**Πίνακας 5:** Αποτελέσματα για την ταυτοποίηση των στελεχών *S. aureus*

Κωδικός δείγματος	Είδος δείγματος	Χρώση Gram	Δοκιμή καταλάσης	Δοκιμή πηκτάσης	API Staph	Αποτε- λέσματα	Πληθυσμός <i>S. aureus</i> (cfu/ml)
88	Βιολογικό	+	+	+	-	Αρνητικό	<10
89	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
90	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
91	Βιολογικό	+	+	+	-	Αρνητικό	<10
92	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	5,2x10 <sup>3</sup>
93	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
94	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
95	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
96	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
97	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
98	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
99	Βιολογικό	+	+	+	-	Αρνητικό	<10
100	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
101	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
102	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
112	Συμβατικό	+	+	+	+	Θετικό	1,9x10 <sup>4</sup>
113	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
114	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
115	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	4,1x10 <sup>2</sup>
116	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	1,3x10 <sup>5</sup>
117	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
118	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	4,4x10 <sup>3</sup>
119	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
120	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10

Κωδικός δείγματος	Είδος δείγματος	Χρώση Gram	Δοκιμή καταλάσης	Δοκιμή πηκτάσης	API Staph	Αποτε- λέσματα	Πληθυσμός <i>S. aureus</i> (cfu/ml)
121	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
122	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	5,1x10 <sup>3</sup>
123	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	1,4x10 <sup>3</sup>
124	Βιολογικό	+	+	+	-	Αρνητικό	<10
125	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
126	Συμβατικό	+	+	+	+	Θετικό	7,9x10 <sup>3</sup>
127	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
128	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	6,4x10 <sup>2</sup>
129	Συμβατικό	+	+	+	+	Θετικό	8,2x10 <sup>2</sup>
130	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
140	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	7,9x10 <sup>2</sup>
141	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	2,1x10 <sup>4</sup>
144	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
145	Συμβατικό	+	+	+	+	Θετικό	1,2x10 <sup>3</sup>
146	Βιολογικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
147	Βιολογικό	+	+	+	+	Θετικό	7,6x10 <sup>3</sup>
151	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
152	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
153	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
154	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
155	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
156	Συμβατικό	+	+	+	+	Θετικό	3,5x10 <sup>3</sup>
157	Συμβατικό	+	+	+	+	Θετικό	2,2x10 <sup>3</sup>
158	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
159	Συμβατικό	+	+	-	-	Αρνητικό	<10
160	Συμβατικό	+	+	+	+	Θετικό	2,7x10 <sup>3</sup>

Οι πληθυσμοί του *S. aureus* στα συμβατικά δείγματα κυμάνθηκαν μεταξύ <10 και  $1,9 \times 10^4$  cfu/ml, ενώ στα βιολογικά δείγματα κυμάνθηκαν μεταξύ <10 και  $1,3 \times 10^5$  cfu/ml (Πίνακας 5).

Η σύγκριση των μέσων πληθυσμών του *S. aureus* συμβατικού και βιολογικού γάλακτος έγινε με το Mann-Whitney test και παρουσιάζεται στον Πίνακα 6. Στα συμβατικά δείγματα το 25-75% των πληθυσμών κυμαίνονται μεταξύ <10 cfu/ml και  $8,2 \times 10^2$  cfu/ml. Στα βιολογικά δείγματα το 25-75% των πληθυσμών κυμαίνονται μεταξύ <10 cfu/ml και  $1,4 \times 10^3$  cfu/ml. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στους πληθυσμούς του *S. aureus* μεταξύ συμβατικού και βιολογικού γάλακτος ( $p=0,376$ ).

**Πίνακας 6:** Σύγκριση συμβατικών και βιολογικών δειγμάτων ως προς τον πληθυσμό του *S. aureus*

	Συμβατικό			Βιολογικό			p-value*
	Media n	IQR	Range	Media n	IQR	Range	
<b>S. aureus (cfu/ml)</b>	<10	<10-820	<10-19000	<10	<10-1400	<10-130000	0,376

\*Στατιστική ανάλυση με Mann-Whitney test

## 2.2 Απομόνωση των *Streptococcus agalactiae* και *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

Για την απομόνωση των *Streptococcus agalactiae* και *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* χρησιμοποιήθηκε αιματούχο θρεπτικό υπόστρωμα και η ταυτοποίησή τους στηρίχθηκε στη μορφολογία των αποικιών, στη χρώση Gram (θετικοί), στη δοκιμή της καταλάσης (αρνητικοί), στην οροτυποποίηση με το Slidex StreptoPlus (ομάδα B και C κατά Lancefield αντίστοιχα) και στις βιοχημικές δοκιμές του API 20Strep. Δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος *Streptococcus agalactiae* στα 50 δείγματα, ενώ απομονώθηκαν δυο στελέχη *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, ένα σε δείγμα συμβατικού γάλακτος (κωδικός δείγματος 155) και ένα σε δείγμα βιολογικού γάλακτος (κωδικός δείγματος 124). Ωστόσο, απομονώθηκαν διάφορα στελέχη άλλων στρεπτοκόκκων, όπως *Streptococcus pneumoniae*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. suis*

*H. S. bovis* I, *S. mitis*, αλλά και άλλων μικροοργανισμών, όπως *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* και *Aerococcus viridans* 1,2 και 3.

### **2.3 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας του *Staphylococcus aureus* από συμβατικά και βιολογικά δείγματα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες**

Τα 17 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν υποβλήθηκαν σε δοκιμή ευαισθησίας με τη μέθοδο της MIC σε 11 αντιμικροβιακούς παράγοντες και προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

1) Πενικιλίνη: Από τα 7 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, τα 6 ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη (ποσοστό 85,7%) και το ένα ήταν ευαίσθητο στην πενικιλίνη (ποσοστό 14,3%). Από τα 10 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, τα 8 ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη (ποσοστό 80%) και τα 2 ήταν ευαίσθητα (ποσοστό 20%).

2) Αμπικιλίνη: Από τα 7 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, τα 2 ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη (ποσοστό 28,6%) και τα 5 ήταν ευαίσθητα στην αμπικιλίνη (ποσοστό 71,4%). Από τα 10 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, τα 2 ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη (ποσοστό 20%) και τα 8 ήταν ευαίσθητα (ποσοστό 80%).

3) Τετρακυκλίνη: Από τα 7 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, και τα 7 ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη (ποσοστό 100%) και από τα 10 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, και τα 10 ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη (ποσοστό 100%).

4) Τριμεθοπρίμη/Σουλφαμεθοξαζόλη: Από τα 7 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, και τα 7 ήταν ανθεκτικά στην τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη (ποσοστό 100%) και από τα 10 στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, και τα 10 ήταν ανθεκτικά στην τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη (ποσοστό 100%).

5) Χλωραμφαινικόλη: Από τα 7 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, και τα 7 ήταν ανθεκτικά στη χλωραμφαινικόλη (ποσοστό 100%) και από τα 10 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, και τα 10 ήταν ανθεκτικά στη χλωραμφαινικόλη (ποσοστό 100%).

6) Ερυθρομυκίνη: Από τα 7 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, και τα 7 ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη (ποσοστό 100%) και από τα 10 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, και τα 10 ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη (ποσοστό 100%).

7) Γενταμυκίνη: Από τα 7 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, και τα 7 ήταν ανθεκτικά στη γενταμυκίνη (ποσοστό 100%) και από τα 10 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, και τα 10 ήταν ανθεκτικά στη γενταμυκίνη (ποσοστό 100%).

8) Νεομυκίνη: Από τα 7 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, και τα 7 ήταν ανθεκτικά στη νεομυκίνη (ποσοστό 100%) και από τα 10 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, και τα 10 ήταν ανθεκτικά στη νεομυκίνη (ποσοστό 100%).

9) Ναλιδιξικό οξύ: Από τα 7 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, και τα 7 ήταν ανθεκτικά στο ναλιδιξικό οξύ (ποσοστό 100%) και από τα 10 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, και τα 10 ήταν ανθεκτικά στο ναλιδιξικό οξύ (ποσοστό 100%).

10) Μεθικιλίνη: Από τα 7 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, τα 4 ήταν ανθεκτικά στη μεθικιλίνη (ποσοστό 57,1%) και τα 3 ήταν ευαίσθητα στη μεθικιλίνη (ποσοστό 42,9%). Από τα 10 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, τα 2 ήταν ανθεκτικά στη μεθικιλίνη (ποσοστό 20%) και τα 8 ήταν ευαίσθητα (ποσοστό 80%).

11) Βανκομυκίνη: Από τα 7 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα συμβατικού γάλακτος, τα 6 ήταν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη (ποσοστό 85,7%) και το

ένα ήταν ευαίσθητο στη βανκομυκίνη (ποσοστό 14,3%). Από τα 10 στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα βιολογικού γάλακτος, τα 9 ήταν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη (ποσοστό 90%) και το ένα ήταν ευαίσθητο (ποσοστό 10%).

Αναλυτικά τα αποτελέσματα της δοκιμής ευαισθησίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

**Πίνακας 7:** Τιμές της MIC (μg/ml) για τους έντεκα αντιμικροβιακούς παράγοντες που ελέγχθηκαν

Κωδικός δείγματος	Είδος δείγματος*	ΤΙΜΕΣ MIC (μg/ml)										
		ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ										
		Pen	Amp	Tet	Trim/ Sulf	Chl	Eryt	Gen	Neo	Nalidixic acid	Meth	Van
112	Σ	0,5	0,25	>32	>64	>256	>32	>32	>8	>704	16	>64
126	Σ	0,25	0,25	>32	>64	>256	>32	>32	>8	>704	4	2
129	Σ	0,125	<0,0625	>32	64	>256	>32	>32	>8	>704	32	>64
145	Σ	>4	8	>32	>64	>256	>32	>32	>8	>704	>128	>64
156	Σ	0,25	<0,0625	>32	64	>256	>32	>32	>8	>704	2	4
157	Σ	0,25	0,25	>32	64	>256	>32	>32	>8	>704	4	4
160	Σ	0,5	0,5	>32	>64	>256	>32	>32	>8	>704	16	4
92	B	0,25	0,25	>32	>64	>256	>32	>32	>8	>704	4	4
115	B	0,0625	<0,0625	>32	16	>256	>32	>32	>8	>704	2	2
116	B	0,5	0,5	>32	>64	>256	>32	>32	>8	>704	8	>64
118	B	0,25	0,25	>32	>64	>256	>32	>32	>8	>704	4	>64
122	B	0,25	0,125	>32	64	>256	>32	>32	>8	>704	8	>64
123	B	0,125	0,125	>32	64	>256	>32	>32	>8	>704	4	4
128	B	0,25	0,125	>32	64	>256	>32	>32	>8	>704	4	>64
140	B	1	0,125	>32	32	>256	>32	>32	>8	>704	4	>64
141	B	0,5	1	>32	32	>256	>32	>32	>8	>704	2	>64
147	B	1	0,125	>32	64	>256	>32	>32	>8	>704	4	8

\*Σ: Συμβατικό B: Βιολογικό

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του Fisher's Exact test για να συγκριθεί η αντιβιοαντοχή των στελεχών *S.aureus* μεταξύ συμβατικού και βιολογικού γάλακτος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Λόγω του μικρού αριθμού των απομονωθέντων στελεχών και των τιμών  $p$  ( $p>0,05$ ), δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην αντιβιοαντοχή των στελεχών που απομονώθηκαν από συμβατικό γάλα και των στελεχών που απομονώθηκαν από βιολογικό γάλα. Στην περίπτωση της μεθικιλίνης θα μπορούσε να παρατηρηθεί αυξημένη ανθεκτικότητα των στελεχών που απομονώθηκαν από συμβατικό γάλα σε σύγκριση με τα στελέχη που απομονώθηκαν από βιολογικό γάλα, αλλά εξαιτίας του μικρού αριθμού των στελεχών που εξετάστηκαν η τιμή  $p$  θα έπρεπε να ήταν μικρότερη από 0,10 για να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ στην προκειμένη περίπτωση  $p=0,162$ .

**Πίνακας 8:** Σύγκριση αντιβιοαντοχής στελεχών *S.aureus* από συμβατικό και από βιολογικό γάλα

		Συμβατικό (n=7)		Βιολογικό (n=10)		RR	95% CI	p-value*
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%			
<b>ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΗ</b>	Ανθεκτικό	6	85,7	8	80	1,07	(0,69-1,65)	1,000
<b>ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ</b>	Ανθεκτικό	2	28,6	2	20	1,43	(0,26-7,86)	1,000
<b>ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ</b>	Ανθεκτικό	7	100	10	100	NA	NA	NA
<b>ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ/ ΣΟΥΛΦΑΜΕΘΟΞΑΖΟΛΗ</b>	Ανθεκτικό	7	100	10	100	NA	NA	NA
<b>ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ</b>	Ανθεκτικό	7	100	10	100	NA	NA	NA
<b>ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ</b>	Ανθεκτικό	7	100	10	100	NA	NA	NA
<b>ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ</b>	Ανθεκτικό	7	100	10	100	NA	NA	NA
<b>ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ</b>	Ανθεκτικό	7	100	10	100	NA	NA	NA
<b>ΝΑΛΙΔΙΞΙΚΟ ΟΞΥ</b>	Ανθεκτικό	7	100	10	100	NA	NA	NA
<b>ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ</b>	Ανθεκτικό	4	57,1	2	20	2,86	(0,71-11,54)	0,162
<b>BANKOMYΚΙΝΗ</b>	Ανθεκτικό	6	85,7	9	90	0,95	(0,66-1,37)	1,000
* Fisher's Exact test								

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο *Staphylococcus aureus* έχει αναγνωριστεί ως σημαντική αιτία ασθενειών του ανθρώπου εδώ και πάνω από 100 χρόνια (Howden *et al.*, 2010). Ο *S. aureus* είναι ένα κοινό παθογόνο των ζώων και του ανθρώπου (Jørgensen *et al.*, 2005). Αποτελεί σημαντική αιτία ενδοноσοκομειακών και εξωνοσοκομειακών λοιμώξεων, που ποικίλλουν από ήπιες δερματικές λοιμώξεις σε πιθανά θανατηφόρες συστηματικές ασθένειες, όπως η ενδοκαρδίτιδα και το σύνδρομο τοξικού σοκ (CDC, 2006). Επιπλέον, οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες εμπλέκονται σε τροφικές δηλητηριάσεις. Ο *S. aureus* προκαλεί λοιμώξεις και σε πολλά ζώα και πτηνά. Η σταφυλοκοκκική μαστίτιδα είτε στην υποκλινική είτε στην κλινική της μορφή μπορεί να έχει σημαντικές οικονομικές συνέπειες στη γαλακτοβιομηχανία (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Οι σταφυλόκοκκοι είναι τα πιο κοινά παθογόνα που σχετίζονται με την υποκλινική μαστίτιδα στις αίγες γαλακτοπαραγωγής (Virdis *et al.*, 2010). Σταθμό στην αντιμετώπιση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων αποτέλεσε η εφαρμογή της πενικιλίνης στην κλινική πράξη το 1942. Πολύ γρήγορα, όμως, απομονώθηκαν στελέχη ανθεκτικά σ' αυτό το αντιβιοτικό. Τα πρώτα ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη αναφέρθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1940 και έγιναν ευρέως διαδεδομένες αιτίες λοιμώξεων σε νοσηλευόμενους ασθενείς (Kennedy *et al.*, 2008). Το 1960 εφαρμόστηκε θεραπευτικά η μεθικιλίνη για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη και το 1961 έγινε η πρώτη αναφορά για στέλεχος ανθεκτικό στη μεθικιλίνη (MRSA) στην Αγγλία (Arivudainambi *et al.*, 2011).

Ο *Streptococcus agalactiae* αποικίζει και μολύνει ανθρώπους και ζώα. Είναι ένα από τα παθογόνα που συχνά εμπλέκονται στη μαστίτιδα των βοοειδών μαζί με το *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* και το *Streptococcus uberis* (Haenni *et al.*, 2010). Ο *Streptococcus agalactiae* (στρεπτόκοκκος της ομάδας B) είναι ο κύριος μικροοργανισμός που προκαλεί μηνιγγίτιδα και σηψαιμία σε βρέφη και, επίσης, σηψαιμία σε μη έγκυους ενήλικες (Murayama *et al.*, 2009). Στα ζώα οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας B αντιπροσωπεύουν ένα παθογόνο του μαστικού αδένος με υψηλή μεταδοτικότητα και οικονομική σημασία. Είναι μια από τις κύριες αιτίες μαστίτιδας των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Οι στρεπτόκοκκοι είναι η δεύτερη σημαντική ομάδα μικροοργανισμών, μετά από τους



σταφυλόκοκκους, που είναι υπεύθυνη για τη μαστίτιδα στα πρόβατα. Τα πιο συχνά είδη που ταυτοποιούνται είναι ο *S. agalactiae*, ο *S. uberis* και ο *S. dysgalactiae*. Ο *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* είναι ο κύριος παράγοντας μαστίτιδας των ιπποειδών, αλλά εμπλέκεται και σε σποραδικές περιπτώσεις μαστίτιδας των βοοειδών και των αιγών (Las Heras *et al.*, 2002). Στο σύνολό τους οι στρεπτόκοκκοι παραμένουν ευαίσθητοι στα περισσότερα αντιβιοτικά, αν και υπάρχουν σημαντικές εξαιρέσεις (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009). Οι στρεπτόκοκκοι που προκαλούν μαστίτιδα είναι ευαίσθητοι στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, ενώ είναι αξιοσημείωτη η ανθεκτικότητά τους στα μακρολίδια και τις λινκοσαμίδες (Kalmus *et al.*, 2011).

Στην παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκαν 50 δείγματα γάλακτος, 25 από συμβατικές εκτροφές και 25 από βιολογικές εκτροφές. Εξετάστηκαν ως προς την παρουσία *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* και *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. Τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν εξετάστηκαν ως προς την αντιβιοαντοχή τους σε 11 αντιμικροβιακούς παράγοντες με στόχο να διερευνηθεί η σχέση της ανθεκτικότητας των στελεχών μεταξύ συμβατικού και βιολογικού γάλακτος. Στελέχη *Streptococcus agalactiae* δεν απομονώθηκαν, κάτι που ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι ο *S. agalactiae* είναι παθογόνο της μαστίτιδας των αιγοπροβάτων και τα δείγματα της έρευνας προέρχονταν από κλινικά υγιή ζώα. Ο *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* απομονώθηκε από δυο δείγματα γάλακτος, ένα από συμβατική και ένα από βιολογική εκτροφή. Η παρουσία του σε δείγματα γάλακτος από κλινικά υγιή ζώα οφείλεται πιθανώς στην παρουσία υποκλινικής μαστίτιδας. Ο μικρός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν (2) δεν επέτρεψε περαιτέρω έρευνα.

Ο *Staphylococcus aureus* απομονώθηκε από 17 συνολικά δείγματα. Επτά (7) στελέχη *S. aureus* απομονώθηκαν από συμβατικό γάλα και δέκα (10) στελέχη απομονώθηκαν από βιολογικό γάλα. Η κύρια δεξαμενή του *S. aureus* στα πρόβατα είναι οι μολυσμένοι μαστικοί αδένες και τα τραύματα των θηλών. Ωστόσο, ο *S. aureus* μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε ανέπαφο δέρμα των θηλών και από άλλα μέρη του σώματος. Στα κοπάδια γαλακτοπαραγωγής η μεταφορά κατά τη διάρκεια της άμελης θεωρείται σημαντικός μηχανισμός εξάπλωσης αυτού του οργανισμού. Οι υποκλινικά μολυσμένοι μαστοί αποτελούν σημαντική δεξαμενή του *S. aureus* που μπορεί να ανιχνευθεί μόνο μέσω βακτηριολογικής εξέτασης (Tormod *et al.*, 2007).

Οι πληθυσμοί του *S. aureus* στα συμβατικά δείγματα κυμάνθηκαν μεταξύ  $<10$  και  $1,9 \times 10^4$  cfu/ml, ενώ στα βιολογικά δείγματα κυμάνθηκαν μεταξύ  $<10$  και  $1,3 \times 10^5$  cfu/ml. Παρά το μικρό αριθμό των στελεχών που απομονώθηκαν, έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων και διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ συμβατικού και βιολογικού γάλακτος ως προς την παρουσία και τον πληθυσμό του *S. aureus*.

Τα στελέχη του *S. aureus* που απομονώθηκαν τόσο από το συμβατικό όσο και από το βιολογικό γάλα εμφάνισαν γενικά υψηλό βαθμό ανθεκτικότητας στους υπό εξέταση αντιμικροβιακούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, στα δείγματα συμβατικού γάλακτος το 85,7% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη, το 28,6% στην αμπικιλίνη, το 100% στην τετρακυκλίνη, την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, τη χλωραμφαινικόλη, την ερυθρομυκίνη, τη γενταμυκίνη, τη νεομυκίνη και το ναλιδιξικό οξύ, το 57,1% στη μεθικιλίνη και το 85,7% στη βανκομυκίνη. Στα δείγματα βιολογικού γάλακτος το 80% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη, το 20% στην αμπικιλίνη, το 100% στην τετρακυκλίνη, την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, τη χλωραμφαινικόλη, την ερυθρομυκίνη, τη γενταμυκίνη, τη νεομυκίνη και το ναλιδιξικό οξύ, το 20% στη μεθικιλίνη και το 90% στη βανκομυκίνη. Τα στελέχη τόσο από το συμβατικό όσο και από το βιολογικό γάλα ήταν σε μεγάλο βαθμό ανθεκτικά σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, εκτός από την αμπικιλίνη και τη μεθικιλίνη. Ειδικότερα για τη μεθικιλίνη, τα στελέχη που απομονώθηκαν από βιολογικά δείγματα ήταν περισσότερο ευαίσθητα στη μεθικιλίνη (ποσοστό 80%) από τα στελέχη που απομονώθηκαν από συμβατικά δείγματα (ποσοστό 42,9%). Η ανάλυση, ωστόσο, των αποτελεσμάτων σε συνδυασμό με το μικρό αριθμό των απομονωθέντων στελεχών οδήγησε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο επίπεδο της αντιβιοαντοχής των στελεχών που απομονώθηκαν από συμβατικό γάλα και των στελεχών που απομονώθηκαν από βιολογικό γάλα και για τους 11 αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν.

Λίγες μελέτες έχουν γίνει που να συγκρίνουν την ύπαρξη αντιβιοαντοχής των παθογόνων του γάλακτος στις βιολογικές και τις συμβατικές εκτροφές. Οι Roesch και συν. (2006) δεν ανέφεραν καμία διαφορά στην αντιβιοαντοχή, οι Tikofsky και συν. (2003) βρήκαν καλή ευαισθησία στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και οι

Sato και συν. (2004) ανέφεραν μικρές διαφορές ανάμεσα στη συμβατική και τη βιολογική γεωργία. Οι Pol και Ruegg (2007) ανέφεραν ότι η χρήση πενικιλίνης είχε σχέση με μειωμένη ευαισθησία των στελεχών *S. aureus*.

Οι Tikofsky και συν. (2003) βρήκαν ότι ο *S. aureus* στις αμερικάνικες βιολογικές εκτροφές ήταν περισσότερο ευαίσθητος στα αντιβιοτικά από ότι στις συμβατικές εκτροφές, αλλά επίσης ότι τα στελέχη του *S. aureus* έδειχναν γενικά καλή ευαισθησία. Οι Pol και Ruegg (2007) ανέφεραν ότι στελέχη του *S. aureus* είναι περισσότερο πιθανό να είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη στις συμβατικές εκτροφές (Garino *et al.*, 2010).

Σε μικρής κλίμακας έρευνα που έγινε από το εργαστήριο του πανεπιστημίου Cornell από την υπηρεσία Προώθησης Ποιότητας Γάλακτος οι διαφορές στο επίπεδο αντιβιοαντοχής στελεχών *Staphylococcus aureus* που απομονώθηκαν από ένα βιολογικό κοπάδι γαλακτοπαραγωγής συγκρίθηκαν με το επίπεδο αντιβιοαντοχής στελεχών που απομονώθηκαν από ένα συμβατικό κοπάδι γαλακτοπαραγωγής. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τα στελέχη που απομονώθηκαν από τη βιολογική εκτροφή να παρουσιάζουν υψηλότερο επίπεδο ευαισθησίας από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τη συμβατική εκτροφή (Tikofsky *et al.*, 2002).

Ένας αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι τα βιολογικά κοπάδια δε διαφέρουν σημαντικά από τα συμβατικά κοπάδια όσον αφορά τις μαστίτιδες και όταν συμβαίνει κάτι τέτοιο, δεν είναι υπέρ της βιολογικής γαλακτοπαραγωγής (Vaarst, 2001).

Οι ευρωπαϊκές μελέτες δεν έχουν αποδείξει σημαντικές διαφορές στην υγεία των ζώων σε σχέση με την υιοθέτηση βιολογικού τρόπου διαχείρισης. Οι κτηνοτρόφοι που έχουν υιοθετήσει με συνέπεια το βιολογικό τρόπο διαχείρισης αναφέρουν λιγότερες περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας, αλλά αυτοί οι παραγωγοί δε χρησιμοποιούν τα ίδια κριτήρια για τον εντοπισμό της κλινικής μαστίτιδας. Είναι εμφανές ότι υπάρχει μικρή διαφορά στην ποιότητα του γάλακτος (με βάση τον αριθμό των σωματικών κυττάρων και τον αριθμό των βακτηρίων) που παράγεται σε βιολογικές ή σε συμβατικές γαλακτοπαραγωγές εκτροφές. Οι βιολογικοί γαλακτοπαραγωγοί συνεχώς αναφέρουν λιγότερες περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας σε σχέση με τους συμβατικούς γαλακτοπαραγωγούς, αλλά η ανίχνευση των ασθενειών, η χρήση των κτηνιάτρων και η θεραπεία απαιτούν επιπλέον έρευνα. Η διαχείριση των λοιμωδών νοσημάτων, όπως η

μαστίτιδα, στις βιολογικές γαλακτοπαραγωγές εκτροφές στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει τροποποιηθεί σημαντικά για να συμμορφώνεται με τους βιολογικούς κανονισμούς και οι επιπτώσεις αυτών των κανονισμών στην υγεία των ζώων δεν έχουν τεκμηριωθεί. Πρακτικά όλες οι μελέτες αναφέρουν λιγότερες περιπτώσεις κλινικής μαστίτιδας στις βιολογικές εκτροφές συγκριτικά με τις συμβατικές εκτροφές (Ruegg, 2009).

Έχει παρατηρηθεί κάποια σχέση ανάμεσα στη βιολογική διαχείριση και την ευαισθησία στα αντιβιοτικά κάποιων Gram θετικών παθογόνων που ευθύνονται για μαστίτιδες, αλλά συνολικά λίγα από αυτά τα παθογόνα από συμβατικές και βιολογικές γαλακτοπαραγωγές εκτροφές παρουσιάζουν αντίσταση στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον έλεγχο της μαστίτιδας.

Γενικά, οι ερευνητές αναφέρουν ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των Gram θετικών παθογόνων που εμπλέκονται στις μαστίτιδες παρουσιάζουν αντοχή στα κοινά κτηνιατρικά αντιμικροβιακά. Στην Ευρώπη, όπου η χρήση αντιβιοτικών επιτρέπεται στις βιολογικές εκτροφές, λίγες διαφορές έχουν παρατηρηθεί στην αναλογία της ανθεκτικότητας σε σχέση με το σύστημα διαχείρισης. Αν και η αντοχή δε φαίνεται να είναι ένα αναδυόμενο πρόβλημα, η επιτήρηση για πιθανή αντιβιοαντοχή των παθογόνων της μαστίτιδας παραμένει σημαντική.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες οι μειωμένες ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής της πενικιλίνης και της πιρλιμυσίνης έχουν καταγραφεί για στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από βιολογικές εκτροφές γαλακτοπαραγωγής σε σύγκριση με στελέχη που απομονώθηκαν από συμβατικές εκτροφές. Ο Pol και ο Ruegg (2007b) ανέφεραν, επίσης, μειωμένες τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για την πενικιλίνη, την πιρλιμυσίνη, την αμπικιλίνη, την ερυθρομυκίνη και την τετρακυκλίνη για κοαγκουλάση αρνητικούς σταφυλόκοκκους που απομονώθηκαν από βιολογικές εκτροφές σε σχέση με στελέχη που απομονώθηκαν από συμβατικές εκτροφές. Παρόλο που τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδιαφέροντα, χρειάζονται νέες πρόσφατες μελέτες που να καθορίζουν τη σχέση ανάμεσα στην έκθεση στα αντιβιοτικά σε επίπεδο ζώου και στην ύπαρξη αντίστασης στα παθογόνα της μαστίτιδας (Ruegg P.L., 2009).

Η εξέλιξη της αντιβιοαντοχής των βακτηρίων θεωρείται ότι γίνεται εξαιτίας της χρήσης των αντιβιοτικών και της παρουσίας των γονιδίων ανθεκτικότητας. Υπάρχει μια στενή

σχέση ανάμεσα στο ρυθμό ανάπτυξης της αντοχής και των ποσοτήτων των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται. Σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης το 1944, προέκυψαν ανθεκτικά στελέχη βακτηρίων. Ως το 1948 πάνω από το 50% των στελεχών του *Staphylococcus aureus* που απομονώνονταν από νοσοκομεία ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη (Tikofsky *et al.*, 2002). Όταν πρωτοεμφανίστηκε η πενικιλίνη στις αρχές της δεκαετίας του 1940 ο *S. aureus* ήταν ομοιόμορφα ευαίσθητος σε αυτό το φάρμακο. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 αναπτύχθηκε ευρεία αντοχή στην πενικιλίνη, που ακολουθήθηκε τη δεκαετία του 1970 από αυξημένη αντοχή στους νέους ημισυνθετικούς ανθεκτικούς στις πενικιλινάσες αντιμικροβιακούς παράγοντες (π.χ. μεθικιλίνη, οξακιλλίνη, ναφκιλλίνη). Μελέτες από τη Γαλλία και το Ηνωμένο Βασίλειο ανέφεραν υψηλό επιπολασμό του ανθεκτικού στην πενικιλίνη *S. aureus* (36,2%, 56%), ενώ στη Νορβηγία και τις Κάτω Χώρες βρέθηκε χαμηλό ποσοστό ανθεκτικών στελεχών (4-0%) (Kalmus *et al.*, 2011).

Πρόσφατες δημοσιεύσεις υποδεικνύουν μια μείωση στην ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη του *S. aureus* σε αρκετές χώρες τα τελευταία δέκα χρόνια. Στο Βέλγιο ο επιπολασμός της αντοχής στην πενικιλίνη του *S. aureus* για τις κλινικές και τις υποκλινικές μαστίτιδες ήταν 38% το 1971, 81% το 1977 και μειώθηκε σε 51% το 1996. Στη Γαλλία το 64% και το 49% των απομονωθέντων στελεχών έδειξαν αντοχή στην πενικιλίνη το 1990-1993 και το 1994-2000 αντίστοιχα. Στη Γερμανία το 62% των απομονωθέντων στελεχών από το δυτικό τμήμα και το 30% από το ανατολικό τμήμα της χώρας ήταν ανθεκτικό στην πενικιλίνη το 1991-1992 και το 52% από όλη τη χώρα το 1997. Στο Μίτσιγκαν των Η.Π.Α. ο επιπολασμός των ανθεκτικών στελεχών ήταν 62% το 1994 και 42% το 1999 και μια φθίνουσα γραμμική τάση στα δεδομένα από το 1994 ως το 1999 που ήταν στατιστικά σημαντική. Το 2001 το 18% των στελεχών που απομονώθηκαν από 99 σουηδικές αγελάδες με υποκλινική ή χρόνια μαστίτιδα ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη. Το 2001 στη Νορβηγία το 11% από 3.557 απομονωθέντα στελέχη *S. aureus* από δείγματα γάλακτος ανά τεταρτημόριο μαστού από δοκιμές σε επίπεδο κοπαδιού και το 5% των απομονωθέντων στελεχών από μέτρια ή σοβαρή κλινική μαστίτιδα ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη. Έχει προταθεί ότι η πενικιλίνη πρέπει να είναι η πρώτη επιλογή αντιμικροβιακού παράγοντα για θεραπεία για τις λοιμώξεις των μαστών που υποτίθεται ότι προκαλούνται από Gram-θετικά βακτήρια, όταν ο επιπολασμός των ανθεκτικών στην πενικιλίνη *S. aureus* είναι κάτω από 10% σε ένα κοπάδι (Bennedsgaard *et al.*, 2006).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα για τα πρότυπα αντιβιοαντοχής για τα συνήθη χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά υποδηλώνουν ότι η επίπτωση για τα στελέχη του *S. aureus* που παράγουν β-λακταμάση και είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη φαίνεται να έχει παραμείνει σε αρκετά σταθερό επίπεδο (40-60%) τα τελευταία είκοσι χρόνια. Η Νορβηγία, η Σουηδία και η Δανία αποτελούν εξαίρεση, γιατί είχαν μια συνεχή χαμηλότερη αναλογία ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών (10-20%) από τις άλλες χώρες (Bennedsgaard *et al.*, 2006).

Διάφορες μελέτες αναφέρουν συγκρίσεις της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των μικροοργανισμών της μαστίτιδας από αγελάδες διαφορετικών χωρών. Οι Hendriksen *et al.* (2008) ανέφεραν επίπτωση της αντοχής στην πενικιλίνη ανάμεσα στο 3% (Γαλλία) και το 46% (Αγγλία) για τα έτη 2002 έως 2004 για τον *S. aureus*. Η αντοχή σε όλα τα άλλα αντιβιοτικά ήταν <10% συμπεριλαμβανομένου της αντοχής στην οξακιλλίνη που αναφέρθηκε μόνο από τη Γαλλία και την Ισπανία. Έχει ενδιαφέρον ότι η αντοχή στην πενικιλίνη ήταν πολύ μικρή για τον *Streptococcus spp.* (<4%), αν και αυτά τα στελέχη έτειναν να είναι περισσότερο ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη (0-21,4%) και την τετρακυκλίνη (2-76,6%). Οι Erskine *et al.* (2002) πραγματοποίησαν μια αναδρομική ανάλυση 2778 στελεχών που απομονώθηκαν από μαστίτιδες από το Διαγνωστικό Εργαστήριο για την Υγεία των Ζώων του Πανεπιστημίου του Μίτσιγκαν. Συνολικά, η επίπτωση της αντιβιοαντοχής δεν άλλαξε σε μια περίοδο 7 χρόνων (1994-2000). Η επίπτωση των στελεχών του *S. aureus* που ήταν ανθεκτικά στην αμικιλίνη, την πενικιλίνη και την ερυθρομυκίνη μειώθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Τα απομονωθέντα στελέχη του *Streptococcus uberis* έγιναν περισσότερο ευαίσθητα στην οξακιλλίνη, τη σουλφατριμεθοπρίμη, τη γενταμυκίνη και την πηλμιμυσίνη, ενώ έγιναν περισσότερο ανθεκτικά στην πενικιλίνη. Γραμμική μείωση της αντιβιοαντοχής αναφέρθηκε, επίσης, για το *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* και *Klebsiella pneumoniae*. Συνολικά, οι συγγραφείς συμπέραναν ότι δεν υπήρχε καμία ένδειξη αυξημένης αντοχής ανάμεσα στα στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικές μαστίτιδες στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία της μαστίτιδας. Μια παρόμοια αναδρομική ανάλυση από τους Makovec και Ruegg (2003) δε βρήκε καμία τάση προς αύξηση της αντιβιοαντοχής των παθογόνων της μαστίτιδας που απομονώθηκαν από δείγματα γάλακτος (1994-2001). Οι Pol και Ruegg (2007a) ανέφεραν επίσης περιορισμένη συσχέτιση ανάμεσα στην έκθεση στα αντιβιοτικά και την αντιβιοαντοχή στους μικροοργανισμούς που προκαλούν μαστίτιδα. Δεδομένου ότι η

θεραπεία της μαστίτιδας αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό μέρος της συνολικής χρήσης αντιβιοτικών στις εκτροφές, η αντιβιοαντοχή είναι σχετικά περιορισμένη στα παθογόνα της μαστίτιδας σε σύγκριση με τους εντερικούς μικροοργανισμούς (Call *et al.*, 2008).

Τα προφίλ ανθεκτικότητας του *S. aureus* δείχνουν περίπου 50% αντοχή στην πενικιλίνη και την αμπικιλίνη σε όλα τα ελεγμένα στελέχη που απομονώθηκαν από αγελάδες γαλακτοπαραγωγής με κλινική μαστίτιδα. Τα επίπεδα αντοχής στην ερυθρομυκίνη, την καναμυκίνη, τη νεομυκίνη, την οξακυλλίνη, την κεφαλεξίνη, τη σουλφοναμίδη/τριμεθοπρίμη, την ενροφλοξασίνη και την τετρακυκλίνη έχει αναφερθεί ότι βρίσκονται στην περιοχή του 2-20%. Η παρουσία των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά *S. aureus* έχει, επίσης, αποδειχθεί στο πρόβειο γάλα (Teuber, 1999).

Η αντιβιοαντοχή σε άλλα βακτηριακά είδη έχει προσεγγίσει το 100%, π.χ. για τις τετρακυκλίνες, τη χλωραμφαινικόλη, τη στρεπτομυκίνη και τις σουλφοναμίδες σε στελέχη που απομονώθηκαν από τροφολοιμώξεις *S. typhimurium* DT104, το 80% για τα ίδια αντιβιοτικά για κάποια στελέχη *E. coli* και το 50% για την πενικιλίνη και την αμπικιλίνη για στελέχη *S. aureus* από μαστίτιδες σε αγελάδες. (Teuber, 1999).

Η υποκλινική μαστίτιδα ευθύνεται για υψηλές οικονομικές απώλειες στις γαλακτοπαραγωγικές εκτροφές. Υπάρχουν στοιχεία, αν και δεν είναι απόλυτα ακριβή, ότι η υποκλινική μαστίτιδα είναι πιο συχνό πρόβλημα στα βιολογικά από ότι στα συμβατικά συστήματα παραγωγής (Doherr *et al.*, 2007).

Οι βιολογικές εκτροφές γαλακτοπαραγωγής στις Η.Π.Α. έχουν περιορισμούς ως προς τη χρήση των αντιβιοτικών. Στη χώρα αυτή, από την ανάλυση δεδομένων από εκτροφές που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψε ότι στις οργανικές εκτροφές χρησιμοποιούνται σημαντικά λιγότερα αντιβιοτικά από ότι στις συμβατικές εκτροφές (Ray *et al.*, 2006).

Στην Ε.Ε. οι βιολογικοί γαλακτοπαραγωγοί εξακολουθούν να χρησιμοποιούν αντιβιοτικά για τη θεραπεία της κλινικής μαστίτιδας, αλλά υιοθετούν και εναλλακτικές θεραπευτικές στρατηγικές. Σε μια έρευνα που συνέκρινε τις θεραπείες της μαστίτιδας που χρησιμοποιούνται στις βιολογικές (n=16) και στις συμβατικές (n=7) εκτροφές στο Ηνωμένο Βασίλειο, ο Honi (2001) ανέφερε ότι τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία της κλινικής μαστίτιδας κατά 100% και 41% από τις συμβατικές και τις

βιολογικές εκτροφές αντίστοιχα. Η διάρκεια της θεραπείας ήταν παρόμοια και στα δυο συστήματα διαχείρισης, αλλά οι βιολογικοί εκτροφείς ανέφεραν σημαντικά μεγαλύτερες περιόδους αναμονής (11,2 και 5,5 ημέρες για τις βιολογικές και τις συμβατικές εκτροφές, αντίστοιχα). Παρόλο που φαίνεται να υπάρχει μια στενή συσχέτιση μεταξύ της βιολογικής διαχείρισης και της χαμηλότερης παρουσίας βακτηρίων με αντιβιοαντοχή, τα ανθεκτικά βακτήρια εξακολουθούν να υφίστανται στις βιολογικές εκτροφές, ακόμη και μετά από χρόνια διαχείρισης χωρίς αντιβιοτικά, υποδεικνύοντας ότι παράγοντες διαφορετικοί από τη χρήση αντιβιοτικών παίζουν σημαντικό ρόλο στη μακροχρόνια εμμονή (Ruegg, 2009).

Η εμφάνιση της αντιβιοαντοχής στα παθογόνα βακτήρια, τόσο στις ενδονοσοκομειακές όσο και στις εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις, αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας (Svara and Rankin, 2011). Η παρουσία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης αποτελεί ένα αναδυόμενο πρόβλημα δημόσιας υγείας. Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας, ειδικά στις περιπτώσεις που δεν τηρούνται οι κανόνες σωστής υγειονομικής πρακτικής. Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί βιολογικό κίνδυνο, τόσο για τον άνθρωπο, όσο και για τα ζώα. Λόγω της παγκοσμιοποίησης και της ελεύθερης μετακίνησης ανθρώπων, ζώων και τροφίμων δεν περιορίζεται στα στενά όρια μιας χώρας. Δεδομένου ότι η ασφάλεια των τροφίμων σχετίζεται με οτιδήποτε επηρεάζει την τροφική αλυσίδα, η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στις εκτροφές των ζώων αποτελεί σοβαρό παράγοντα κινδύνου για τον άνθρωπο, είτε με τη μορφή καταλοίπων στα τρόφιμα, είτε ως αίτιο δημιουργίας ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Τα παθογόνα βακτήρια μπορούν να μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας. Η παρουσία βακτηρίων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης αναφέρεται συχνά. Ορισμένα από τα βακτήρια αυτά παρουσιάζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Αρχικά αυτό αποδείχθηκε για τις σαλμονέλλες και στη συνέχεια για άλλα τροφιμογενή παθογόνα. Η μεταφορά αντοχής από βακτήρια ζωικής προέλευσης σε άλλα βακτήρια της ανθρώπινης χλωρίδας, αν και λιγότερο συχνή, είναι αποδεδειγμένη. Παρατηρείται ανάπτυξη αντοχής στα βακτήρια ζωικής προέλευσης, ανεξάρτητα από το αν γίνεται χρήση για θεραπευτικούς και προληπτικούς λόγους ή χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες. Η κατανάλωση ωμών ζωικών τροφίμων από τον άνθρωπο, όπως για παράδειγμα το γάλα, αποτελεί μια από τις κυριότερες πηγές μετάδοσης των βακτηρίων ζωικής προέλευσης (Γούσια, Παπαδοπούλου, 2009).



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams R., Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1995

Arivudainambi U.S. Ezhil, Anand Thangarajan Durai, Shanmugaiah Vellasamy, Karunakaran Chandran & Rajendran Ayyappan, Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2010, 10.1111/j.1574-695X.2011.00780.x

Arivudainambi US, Anand TD, Shanmugaiah V, Karunakaran C, Rajendran A., Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*., FEMS Immunol Med Microbiol. 2011 Jan 10. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00780.x.

Bennedsgaard Torben W, Thamsborg Stig M, Aarestrup Frank M, Enevoldsen Carsten, Vaarst Mette and Christoffersen Anna B, Resistance to penicillin of *Staphylococcus aureus* isolates from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in Denmark, Acta Veterinaria Scandinavica, 2006; **48**:24, 1-6

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009, 19-1317, Schleifer Karl-Heinz, Phylum XIII. *Firmicutes* Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmacutes* [sic] Gibbons and Murray 1978, 5) , 392 - 432,655 – 735,

Bergman Miika, Nyberg Solja T., Huovinen Pentti, Paakkari Pirkko, Hakanen Antti J. and the Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance, Association between Antimicrobial Consumption and Resistance in *Escherichia coli*, Antimicrobial agents and Chemotherapy, 2009; **53**:3, 912-917

BioMerieux, SlidexStreptoplus, 2011, [www.biomerieuxdiagnostics.com/servlet/srt/bio/clinicaldiagnostics/dynPage?open=CNL\\_CNL\\_PRD&doc=CNL\\_PRD\\_CPL\\_G\\_PRD\\_CN\\_L\\_66&pubparams.sform=3&lang=en](http://www.biomerieuxdiagnostics.com/servlet/srt/bio/clinicaldiagnostics/dynPage?open=CNL_CNL_PRD&doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CN_L_66&pubparams.sform=3&lang=en)

Brigante Gioconda R., Luzzaro Francesco A., Pini Beatrice, Lombardi Gianluigi, Sokeng Gertrude and Toniolo Antonio Q., Drug susceptibility testing of clinical isolates of streptococci and enterococci by the Phoenix automated microbiology system, BMC Microbiology, 2007; **7**:46, 1-7

Busatoa A., Trachsela P., SchaËllibaumb M., Bluma J.W., Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland, Elsevier, Livestock Production Science, 2000; **44**, 205-220

Call Douglas R., Davis Margaret A. and Sawant Ashish A., Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production, Animal Health Research Reviews, 2008; **9**:2, 159-167

Cao Shanping, Sun Lun-Quan, Wang Ming, Antimicrobial activity and mechanism of action of Nu-3, a protonated modified nucleotide, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2011; **10**:1, 1476-0711

Catry B., Laevens H., Devriese L.A., Opsomer G., De Kruif A., Antimicrobial resistance in livestock, *Journal of Veterinary Pharmacological Therapeutics*, 2003; **26**:81-93

CDC, Department of Health and Human Services, Investigation and control of Vancomycin-Intermediate and –Resistant *Staphylococcus aureus* (VISA/VRSA), 2006, [www.cdc.gov/ncidod/ar\\_visavrsa\\_prevention.html](http://www.cdc.gov/ncidod/ar_visavrsa_prevention.html)

Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Anaerobic Bacteria; Approved Standard-Seventh Edition, M11-A7, **27**:2, CLSI, 2007

Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition, M07-A8, 29:2, CLSI, 2009

Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement, M100-S21, 30:1 and 30:15, CLSI, 2011

Doherr M.G., Roesch M., Schaeren W., Schallibaum M., Blum J.W., Risk factors associated with subclinical mastitis in dairy cows on swiss organic and conventional production system farms, *Veterinari Medicina*, 2007; **52**:487-495

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, 1.3, EUCAST, 05.01.2011, [www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_2.0\\_120221.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf)

Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, Chapter 12: *Staphylococcus aureus*, FDA U.S., 2001, [www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071429](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071429)

Garmo Randi T., Waage Steinar, Sviland Ståle, Henriksen Britt IF, Østerås Olav, Reksen Olav, Reproductive Performance, Udder Health, and Antibiotic Resistance in Mastitis Bacteria isolated from Norwegian Red cows in Conventional and Organic Farming, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2010; **52**:11, 1-13

Haenni Marisa, Saras Estelle, Bertin Stephane, Leblond Pierre, Madec Jean-Yves and Payot Sophie, Diversity and Mobility of Integrative and Conjugative Elements in Bovine Isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2010; **76**:24, 7957-7965

Hamilton Cecilia, Emanuelson Ulf, Forslund Kristina, Hansson Ingrid and Ekman Torkel, Mastitis and related management factors in certified organic dairy herds in Sweden, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2006; **48**:11, 1-7

Harada Kazuki and Asai Tetsuo, Role of Antimicrobial Selective Pressure and Secondary Factors on Antimicrobial Resistance Prevalence in *Escherichia coli* from Food-Producing Animals in Japan, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010; 180682, 1-12

Hariharan Harry, Donachie Willie, Macaldowie Colin, Keefe Greg, Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a Scottish farm, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 2004; **68**:188-192

Hovi M. and Bouilhol M., Human-animal relationship: stockmanship and housing in organic livestock systems, *The 4th NAHWOA Workshop*, 2001

Howden Benjamin, Davies John K., Johnson Paul D. R., Stinear Timothy P., Grayson M. Lindsay, Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including Vancomycin-Intermediate and heterogeneous Vancomycin- Intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications, *Clinical Microbiology Reviews*, 2010; **23**:1, 99-139

Hwang Sun Young, Park Young Kyung, Koo Hye Cheong, Park Yong Ho, *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea, *Journal of Veterinary Science*, 2010; **11**:2, 125-131

International Organization for Standardization, EN ISO 6888-1:1999: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci ( *Staphylococcus aureus* and other species)- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium

International Organization for Standardization, EN ISO 6888-1:1999 /Amd.1:2003(E): Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium, Amendment 1: Inclusion of precision data

International Organization for Standardization, EN ISO 6889-1:1999 / A1:2004

Jørgensen H. J., Mørk T., Caugant D. A., Kearns A. and Rørvik L. M., Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk, *Applied and Environmental Microbiology*, 2005; **71**:12, 8352-8361

Kalmus Piret, Aasmäe Birgit, Kärssin Age, Orro Toomas, Kask Kalle, Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2011; **53**:4, 1-7

Kennedy Adam D., Otto Michael, Braughton Kevin R., Whitney Adeline R., Chen Liang, Mathema Barun, Mediavilla Jose R., Byrne Kelly A., Parkins Larye D., Tenover Fred C., Kreiswirth Barry N., Musser James M. and DeLeo Frank R., Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Recent clonal expansion and diversification, *National Academy of Sciences of the USA*, 2008; **105**:4, 1327-1332

Kyriazakis I. and Zervas G., Organic meat and milk from ruminants, *EAAP publication*, 2002; 15-26, 215-216 ,217-220

Las Heras Alfonso, Vela Ana I., Fernández Elena, Legaz Emilio, Dominguez Lucas and Fernández-Garayzábal Jose F., Unusual Outbreak of Clinical Mastitis in Dairy Sheep Caused by *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*, Journal of Clinical Microbiology, 2002; **40**:3, 1106-1108

Martinez Jose L., The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria, Proceedings of the Royal Society, 2009; **276**, 2521-2530

Maruvada Ravi, Prasadarao Nemani V. and Rubens C. E., Acquisition of factor H by a novel surface protein on group B *Streptococcus* promotes complement degradation, FASEB Journal, 2009; **23**:11, 3967-3977

Miller Keith, O'Neill Alexander J., Wilcox Mark H., Ingham Eileen and Chopra Ian, Delayed Development of Linezolid Resistance in *Staphylococcus aureus* following Exposure to Low Levels of Antimicrobial Agents, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008; **52**:6, 1940-1944

Murayama Somay Yamagata, Seki Chizuko, Sakata Hiroshi, Sunaoshi Katsuhiko, Nakayama Eiichi, Iwata Satoshi, Sunakawa Keisuke, Ubukata Kimiko and the Invasive Streptococcal Disease Working Group, Capsular Type and Antibiotic Resistance in *Streptococcus agalactiae* Isolates from Patients, Ranging from Newborns to the Elderly, with Invasive Infections, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009; **53**:6, 2650-2653

National Standard Method, Preparation of samples and decimal dilutions, 03.05.05, Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory , D 1i4

National Standard Method, Enumeration of *Staphylococcus aureus*, 03.05.05, Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory , F 12i1.4

National Standard Method, Identification of *Staphylococcus* species, *Micrococcus* species and *Rothia* species, 17/09/2007, Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory , BSOP ID 7i2.1, 1-17

National Standard Method, Identification Of *Streptococcus* Species, *Enterococcus* Species And Morphologically Similar Organisms, 14/09/07, Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory , BSOPID 4i2.1, 1-21

Nel Hanri, The Establishment and Standardization of a Veterinary Antimicrobial Resistance Surveillance Programme in South Africa, University of Pretoria, 2005

Nikaido Hiroshi, Multidrug Resistance in Bacteria, NIH Public Access, Annu Rev Biochem, 2009; **78**:119-146

Olson Patrick D., Kuechenmeister Lisa J., Anderson Kelsi L., Daily Sonja, Beenken Karen E., Roux Christelle M., Reniere Michelle L., Lewis Tami L., Weiss William J., Pulse Mark, Nguyen Phung, Simecka Jerry W., Morrison John M., Sayood Khalid, Asojo Oluwatoyin A., Smeltzer Mark S., Skaar Eric P., Dunman Paul M., Small, Molecule inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA alter cellular mRNA turnover, Exhibit antimicrobial activity, and attenuate pathogenesis, PLoS Pathogens, 2011; **7**:2, 1-13, [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org)

Patel N., Lubanski P., Ferro S., Bonafede M., Harrington S., Evans A., Stellrecht K. and Lodise T. P., Correlation between Vancomycin MIC Values and Those of Other Agents against Gram-Positive Bacteria among Patients with Bloodstream Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009; **53**:12, 5141-5144

Pietiäinen Milla, François Patrice, Hyyryläinen Hanne-Leena, Tangomo Manuela, Sass Vera, Sahl Hans-Georg, Schrenzel Jacques and Kontinen Vesa P, Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of *vraDE* and *vraSR* in antimicrobial resistance, BMC Genomics, 2009; **10**:429, 1-15

Pitkälä A., Koort J. and Björkroth J., Identification And Antimicrobial Resistance Of *Streptococcus Uberis* And *Streptococcus Parauberis* Isolated From Bovine Milk Samples, Journal of Dairy Science, 2008; **91**:10, 4075-4081

Ray K. A., Warnick L. D., Mitchell R. M. , Kaneene J. B., Ruegg P. L., Wells S. J., Fossler C. P., Halbert L. W. and May K., Antimicrobial Susceptibility Of *Salmonella* From Organic And Conventional Dairy Farms, Journal of Dairy Science, 2006; **89**:2038-2050

Rosati A., Aumaitre A., Organic dairy farming in Europe, Elsevier, Livestock Production Science, 2004; **90**:41-51

Ruegg P. L., Management Of Mastitis On Organic And Conventional Dairy Farms, Journal of Animal Science, 2009; **87**:43-55, [http://jas.fass.org/cgi/content/full/87/13\\_suppl/43](http://jas.fass.org/cgi/content/full/87/13_suppl/43)

Salyers AA, Gupta A., Wang Y., Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes, Trends in Microbiology, 2004; **12**:412-6

Shuaihua Pu, Feifei Han, and Beilei Ge, Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Louisiana Retail Meats, Applied and Environmental Microbiology, 2009; **75**:1, 265-267

Svara Fabian and Rankin Daniel J., The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance, Svara and Rankin BMC Evolutionary Biology, 2011; **11**:130, 1-10, <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/130>

Tam Vincent H., Nikolaou Michael, A Novel Approach to Pharmacodynamic Assessment of Antimicrobial Agents: New Insights to Dosing Regimen Design, PLoS Computational Biology, 2011; **7**:1, 1001043

Teuber M., Spread of antibiotic resistance with food-born pathogens, cellular and molecular life sciences, 1999; **56**, 755-763

Tikofsky Linda L., DVM and Schukken Ynte H., A comparison Of Antibiotic Susceptibility Patterns For *Staphylococcus Aureus* In Organic And Conventional Dairy Herds, Organic Farming Research Foundation, 2002; 00-65

Tikofsky Linda L., The Organic Farming Philosophy And Its Effect On Udder Health, (Quality Milk Production Services, Cornell University, Ithaca, New York),NMC Regional Meeting Proceedings, 2005

Tormod Mørk, Steinar Waage, Tollersrud Tore, Kvitle Bjørg and Sviland Ståle, Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features, Acta Veterinaria Scandinavica, 2007; **49**:23, 1-8

Turnidge John and Paterson David L., Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints, 2007; **20**:3, 391-408

Uh Young, Hwang Gyu Yel, Jang In Ho, Cho Hyun Mi, Noh Song Mi, Kim Hyo Youl, Kwon Ohgun and Yoon Kap Jun, Macrolide Resistance Trends in  $\beta$ -Hemolytic Streptococci in a Tertiary Korean Hospital, Yonsei Med Journal, 2007; **48**:5, 773-778

Vaarst Mette, Mastitis In Danish Organic Dairying, British Mastitis Conference, 2001, 1-12

Van de Bogaard Anthony E. EES, Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans, International Journal of Antimicrobial Agents, 2000; **14**: 327-335

Van de Sande-Bruinsma Nienke, Grundmann Hajo, Verloo Didier, Tiemersma Edine, Monen Jos, Goossens Herman, Ferech Matus and the European Antimicrobial Resistance Surveillance System and European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project Groups, Antimicrobial Drug Use and Resistance in Europe, Emerging Infectious Diseases, 2008; **14**:11, 1722-1730, [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid)

Vautor Eric, Cockfield Joshua, Caroline Le Marechal, Yves Le Loir, Chevalier Marlene, Robinson D. Ashley, Thierry Richard, Lindsay Jodi, Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock, Vet. Res., 2009; **40**:56, 1-11, [www.vetres.org](http://www.vetres.org)

Virdis Salvatore, Scarano Christian, Cossu Francesca, Spanu Vincenzo, Spanu Carlo and Enrico Pietro Luigi De Santis, Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative *Staphylococci* Isolated from Goats with Subclinical Mastitis, Veterinary Medicine International, 2010; 517060

Walther C. and Perreten V., *Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis* in organic milk production, Journal of Dairy Science, 2007; **90**:5351

Yongwei Cai, Fanrong Kong, Gwendolyn L. Gilbert, Three New Macrolide Efflux (*mef*) Gene Variants in *Streptococcus agalactiae*, Letter to the Editor, Journal of Clinical Microbiology, 2007; **45**:8, 2754-2755

Γούσια Π., Παπαδοπούλου Χ., Αντιβιοαντοχή και τρόφιμα: ένα αναδυόμενο πρόβλημα δημόσιας υγείας, Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, 2009; **54**:6, 339-348