ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ,
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Απομόνωση στελεχών *Salmonella* spp. από σκύλους και διερεύνηση της ανθεκτικότητας τους σε διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών

Καντερέ Μαρία

Λάρισα, 2016

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Απομόνωση στελεχών *Salmonella* spp. από σκύλους και διερεύνηση της ανθεκτικότητας τους σε διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών

Isolation of *Salmonella* spp. strains in dogs and investigation of their resistance to several classes of antibiotics

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΛΑΜΠΡΙΝΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Παθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ **7**
1.1 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού 7
1.2 Ονοματολογία 9
1.3 Ειδικότητα Ξενιστή 11
1.4 Παρουσία των *Salmonella* spp. στα είδη ζώων και Δημόσια Υγεία 18
1.5 Παθογένεια των *Salmonella* spp. 22
1.6 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά 24
1.7 Στόχος της μελέτης 30
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 31
2.1 Δειγματοληψίες 31
2.2 Απομόνωση των *Salmonella* spp. 31
2.3 Συντήρηση των στελεχών *Salmonella* spp. (glycerol stocks) 32
2.4 Βιοχημική και Ορολογική ταυτοποίηση των Salmonella spp. 32
2.5 Έλεγχος ευαισθησίας/ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά 32
2.6 Απομόνωση DNA των *Salmonella* spp. 33
2.7 Έλεγχος για την ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας με PCR 34
2.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR 36
2.9 Καθαρισμός και αλληλούχηση των προϊόντων της PCR 36
2.10 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων 37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 38
3.1 Απομόνωση των στελεχών *Salmonella* spp. 38
3.2 Οροταυτοποίηση των *Salmonella* spp. 40
3.3 Αποτελέσματα δοκιμών ελέγχου ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά 40
3.4 Αποτελέσματα της PCR για τα γονίδια ανθεκτικότητας 42
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 45
5.ΥΠΟΜΝΗΜΑ 50
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 53

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Περίληψη

Οι *Salmonella* spp. είναι σημαντικοί μικροοργανισμοί για τη Δημόσια Υγεία και αποτελούν τη δεύτερη συχνότερη αιτία λοίμωξης του γαστρεντερικού συστήματος στην Ευρώπη. Η σαλμονέλλωση, όπως ονομάζεται κάθε λοίμωξη του ανθρώπου που οφείλεται στους ορότυπους των *Salmonella* spp. εκτός από αυτούς των *S.* Typhi και *S.* Paratyphi, είναι ζωοανθρωπονόσος, δηλαδή νόσημα το οποίο μεταδίδεται άμεσα ή έμμεσα ανάμεσα στα ζώα και τον άνθρωπο. Δεξαμενές του παθογόνου αυτού θεωρούνται κυρίως τα εκτρεφόμενα ορνίθια και οι χοίροι καθώς και τα ψυχρόαιμα ζώα, όπως τα ερπετά. Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκαν στελέχη *Salmonella* spp. και των δύο ειδών του γένους *Salmonella, S. enterica* και *S. bongori*. Οι ορότυποι που απομονώθηκαν ήταν οι εξής: *S.* Typhimurium, *S.* Infantis, η μονοφασική *S. enterica* subsp. *enterica* 6,7: k:-, *S.*Thompson, *S.* Anatum και από το δεύτερο είδος, ο ορότυπος *S. bongori* 61:z35. Η απομόνωση του τελευταίου στελέχους αναφέρεται για πρώτη φορά από ασυμπτωματικό σκύλο. Στα στελέχη αυτά, έγινε διερεύνηση της ανθεκτικότητάς τους σε 11 αντιβιοτικά με αντιβιογράμματα και επιχειρήθηκε ανίχνευση και ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα με τη χρήση της PCR. Δύο στελέχη *S.* Infantis παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, το ναλιδιξικό οξύ και την ενροφλοξασίνη, στα οποία ανιχνεύθηκε και το γονίδιο αντλίας εκροής της τετρακυκλίνης *tetA*. Ένα στέλεχος *S.* Typhimurium παρουσίασε πολυανθεκτικότητα σε τέσσερις κατηγορίες αντιβιοτικών (σουλφαμεθαξαζόλη/ τριμεθοπρίμη, τετρακυκλίνη, αμπικιλλίνη, ενροφλοξασίνη) στο οποίο ανιχνεύθηκαν τα γονίδια *tetB*, άλλο γονίδιο αντλίας εκροής της τετρακυκλίνης, $bla_{\text{TEM-1}}$, γονίδιο που κωδικοποιεί β-λακταμάση και το *sul1*, γονίδιο που κωδικοποιεί ένα τροποποιημένο ένζυμο (dihydropteroate synthase- δϊυδροπτερική συνθάση) - στόχο που δεν αναστέλλεται από τις σουλφοναμίδες. Τα δύο στελέχη S. Infantis και ένα στέλεχος S. Anatum βρέθηκαν ανθεκτικά στο ναλιδιξικό οξύ, ενώ αυτά τα στελέχη καθώς και άλλα τέσσερα (δύο στελέχη *S.* Typhimurium και δύο *S.* bongori-134,135), εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην ενροφλοξασίνη. Για τα στελέχη αυτά, ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου *gyrA*. Η παρουσία αυτών των οροτύπων σε ασυμπτωματικούς σκύλους, όπως και η ύπαρξη ανθεκτικότητας σε αυτούς, υποδεικνύει το ζωικό αυτό είδος ως δεξαμενή στελεχών *Salmonella* spp., επικίνδυνων για τη Δημόσια Υγεία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί Δείκτες» στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας - Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου για την αλληλεγγύη τους, ιδιαιτέρως το Φάνη, τον Τηλέμαχο και τον Αντώνη, για τη βοήθεια τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην καθηγήτρια κα Αγγελική Ρόδη-Μπουριέλ και στη συνάδελφο και φίλη, Dr. Γραμμάτω Ευαγγελοπούλου, για την ουσιαστική συνδρομή τους και τη στήριξή τους, ώστε το ερευνητικό αυτό εγχείρημα να υλοποιηθεί, ειδικά κατά την πρώτη φάση απομόνωσης των στελεχών.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στην τριμελή εξεταστική επιτροπή, στον επίκουρο καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτρη, στην επίκουρη καθηγήτρια κα Αθανασίου Λαμπρινή και στον καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καταρχάς για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν και το χρόνο που αφιερώσανε για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου για τη στήριξη και την υπομονή τους όλο αυτόν τον καιρό, καθώς και τους φίλους μου για την αμέριστη ηθική τους συμπαράσταση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού

Τα στελέχη της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών στα οποία ανήκει το γένος *Salmonella* είναι αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα, ραβδόμορφα βακτήρια διαστάσεων 0,7 – 1,5 x 2-5 μm, με περίτριχη μαστιγοφορία, επομένως αυτοκινούμενα. Οι προσαρμοσμένοι στα πτηνά ορότυποι Gallinarum και Pullorum αποτελούν εξαίρεση, αφού δε φέρουν μαστίγια και δεν κινούνται. Πρόκειται για προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C και εύρος διακύμανσης από 5-45 ^{o} C. Καταβολίζουν τη D-γλυκόζη καθώς και τη L-αραβινόζη, μαλτόζη, D-μανιτόλη, D-μαννόζη, D- σορβιτόλη, D-ξυλόζη, τρεχαλόζη, παράγοντας οξύ ή συχνά και αέριο. Είναι θετικοί στη δοκιμή της καταλάσης, στο κόκκινο του μεθυλενίου, και στα κιτρικά ενώ είναι αρνητικοί σε αυτές της οξειδάσης, της ινδόλης και του Voges-Proskauer. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η παραγωγή υδρόθειου (H_2S), η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και η μη υδρόλυση της ουρίας (Holt *et al*. 1994).

Ορισμένοι ορότυποι παρουσιάζουν κάποιες ιδιαιτερότητες, όπως για παράδειγμα ο Paratyphi A, ο οποίος δεν παράγει υδρόθειο, δεν αποκαρβοξυλιώνει τη λυσίνη και δεν αναπτύσσεται στα κιτρικά ή οι Cholerasuis και Abortusequii που επίσης δεν παράγουν υδρόθειο. Ακόμη, ο ορότυπος Typhi έχει ορισμένοι μοναδικά βιοχημικά χαρακτηριστικά, που τον καθιστούν διαφορετικό από τους υπόλοιπους, δηλαδή παράγει ίχνη υδρόθειου στο TSI άγαρ, δεν αποκαρβοξυλιώνει την ορνιθίνη, δεν αναπτύσσεται στα κιτρικά άλατα και δεν παράγει αέριο από γλυκόζη.

Όσον αφορά την αντιγονική σύνθεση των *Salmonella* spp. τα αντιγόνα διακρίνονται σε 3 κατηγορίες: σωματικά (O), μαστιγίου (H) και επιφάνειας (Vi) ή κάψας (K). Η διάκριση έγινε με βάση την ικανότητάς τους να αλληλοεπιδρούν με τους αντίστοιχους αντι-ορούς. Τα σωματικά αντιγόνα (O) είναι λιποπολυσακχαρίτες και αποτελούν τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος είναι ανθεκτικά στη θερμότητα, στην αλκοόλη, τα οξέα και την αιθανόλη. Όπως και όλα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, η *Salmonella* spp. διαθέτει τρία στρώματα πολυμερών μορίων στην

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

εξωτερική επιφάνεια της στιβάδας της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος: ένα στρώμα λιποπρωτεϊνης, μια εξωτερική μεμβράνη και ένα στρώμα λιποπολυσακχαριτών (LPS). Το τελευταίο αποτελεί την ενδοτοξίνη των Gram – βακτηρίων, βοηθώντας στην επιβίωση του μικροβίου, ενώ απελευθερώνεται μόνο κατά τη λύση του βακτηριακού κυττάρου. Αποτελείται από τρία μέρη: το λιπίδιο Α (ενδοτοξίνη), έναν κεντρικό πολυσακχαρίτη και ένα πολυμερές επαναλαμβανόμενων ολιγοσακχαριτών που συνθέτουν την Ο-πλευρική αλυσίδα ή το Ο-αντιγόνο (Raetz and Whitfieid 2002). Η ανοσοαπόκριση που προκαλεί η δομή του Ο αντιγόνου επηρεάζει τη χυμική ανοσία του οργανισμού και τη φαγοκυττάρωση (Rycroft 2000). Η Ο- πλευρική αλυσίδα καθορίζει την ειδικότητα του Ο-αντιγόνου και την παθογένεια των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Τα στελέχη στα οποία η Ο αλυσίδα είναι ατελής (δηλαδή χωρίς τρισακχαρίδια και ένα μέρος ολιγοσακχαριδίων) ονομάζονται “Rough” στελέχη και είναι λιγότερο παθογόνα σε σχέση με τα “Smooth” στελέχη που έχουν ολόκληρη την Ο-αλυσίδα. Τα τελευταία περιλαμβάνουν πολυσακχαριδικούς σχηματισμούς (whiskers), προβάλλουν από την κυτταρική επιφάνεια και φέρουν τα Ο-αντιγόνα, τα οποία αποτελούν στόχο του συμπληρώματος και των αντισωμάτων.

Καθώς τα περισσότερα στελέχη των *Salmonell*ae είναι κινητά, φέρουν 5-10 λεπτές, επιμήκεις δομές (Macnab1996) που αποτελούνται από μια πρωτεΐνη, τη μαστιγίνη (flagellin). Τα αντιγόνα των μαστιγίων (Η) είναι ευαίσθητα στη θερμότητα, την αλκοόλη και τα οξέα (Macnab 1996). Οι περισσότεροι ορότυποι παράγουν μαστίγια με δύο διαφορετικές αντιγονικές ειδικότητες, ώστε να επιβιώνει ο μικροοργανισμός των μηχανισμών άμυνας του ξενιστή (διφασικό αντιγόνο). Κάποιοι ορότυποι (π.χ. Enteritidis, Typhi) παράγουν πάντα μαστίγια με την ίδια αντιγονική ειδκότητα (μονοφασικά). Στα διφασικά Η-αντιγόνα, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα δύο είδη αντιγόνων παρουσιάζουν ομοιότητες, πιθανώς γιατί έχουν προέλθει από την αντιγραφή ενός ομόλογου πρόδρομου γονιδίου. Τα αντιγόνα αυτά προκύπτουν από τη μετάφραση των γονιδίων Η1 και Η2 που κωδικοποιούν τη μαστιγίνη. Η σύνθεση της Η2 μαστιγίνης ελέγχεται από ένα ανασυνδυασμό που αναστρέφει το τμήμα του χρωμοσώματος που περιέχει το Η2 γονίδιο. Όταν αυτό ενεργοποιείται, ενεργοποιείται και ένα ακόμη γονίδιο που συνθέτει έναν αναστολέα της έκφρασης του Η1 γονιδίου (Silverman *et al*. 1979). Γενικά, τα υπογένη I,II,IIIα, VI είναι διφασικά και μπορούν να παράγουν δύο ή και τρεις λειτουργικές αλλά διαφορετικές υπομονάδες της φλατζελίνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Τέλος, το αντιγόνο Vi είναι ένα επιφανειακό αντιγόνο που επικαλύπτει το O και είναι γραμμικό ομοπολυμερές του α-1,4- 2 deoxy-2- N- acetylgalactosamine uronic acid, που μπορεί να υποστεί O – ακετυλίωση στη θέση C3 (Daniels *et al*. 1989). Καταστρέφεται από τη φαινόλη, ή μετά τη θέρμανση για 60 λεπτά στους 60 ◦C, αλλά είναι ανθεκτικός στην αλκοόλη. Παράγεται από στελέχη των οροτύπων Typhi, Paratyphi και Dublin καθώς και του *Citrobacter freundii*. Ο ρόλος του δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Θεωρείται ότι προστατεύει το μικροοργανισμό από τη δράση του συμπληρώματος καλύπτοντας την εξωτερική του επιφάνεια, όταν αυτός βρίσκεται σε εξωκυτταρικό περιβάλλον (Parija 2012).

1.2 Ονοματολογία

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Salmonella* είναι κινητοί, μη σπορογόνοι, αρνητικοί κατά Gram βάκιλλοι που ανήκουν στην οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών. Πρόκειται για παθογόνους παράγοντες που βρίσκονται παντού στο περιβάλλον και προσβάλλουν θηλαστικά, πτηνά, ερπετά καθώς και τον άνθρωπο. Οι μικροοργανισμοί αυτοί προσβάλλουν τον εντερικό σωλήνα, μπορούν όμως να διασπαρθούν και σε άλλα όργανα προκαλώντας συστηματικό νόσημα. Συνεπώς είναι δυνατή η απομόνωσή τους από τα όργανα αυτά και το αίμα (Greene 2006)

Η ταξινόμηση των *Salmonellae* έχει αλλάξει πολλές φορές κατά το παρελθόν το σύστημα ταξινόμησης όμως έχει βασιστεί κατά κύριο λόγο σε βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά. Αντίστοιχα, η ονοματολογία των *Salmonellae* αποτελεί πολύπλοκο θέμα καθώς συχνά χρησιμοποιούνται από τους επιστήμονες διαφορετικά συστήματα ταξινόμησης του γένους αυτού. Η έλλειψη χρήσης κοινής ονοματολογίας λόγω των συνεχών αλλαγών συχνά δυσχεραίνει τη συνεννόηση μεταξύ των ερευνητών, κλινικών γιατρών, λειτουργών Δημόσιας Υγείας και του κοινού.

Το βακτήριο πήρε το όνομά του από έναν αμερικάνο βακτηριολόγο, D.E. Salmon που για πρώτη φορά απομόνωσε το μικροοργανισμό από έντερο χοίρου το 1884 (Smith 1894). Η ταξινόμηση των μελών του γένους *Salmonella* βασίστηκε στην οροταυτοποίηση με τη χρήση ειδικών αντι-ορών, για την ταυτοποίηση των σωματικών αντιγόνων (O) και των αντιγόνων των μαστιγίων (H) (White 1926).

Η ταξινόμηση έγινε με βάση τα αντιγόνα των ποικίλων οροτύπων και η προσπάθεια κατέληξε στο Σχέδιο των Kauffmann-White-Le Minor. Σύμφωνα με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

αυτό, τα υποείδη του γένους *Salmonella* υποδιαιρούνται σε ορότυπους, μέσω της οροταυτοποίησης με βάση τα σωματικά αντιγόνα (O antigen), τα αντιγόνα μαστιγίου (H antigen) και τα αντιγόνα κάψας (Vi antigen). Τα αντιγόνα O αναφέρονται με αραβικούς αριθμούς (1, 2, 3 κλπ) (WHOCC 2007). Οι *Salmonellae* spp. διαθέτουν μαστίγια με 2 διαφορετικές αντιγονικές ειδικότητες, και έτσι το αντιγόνο H καλείται διφασικό. Υπάρχουν όμως και άλλοι ορότυποι όπως οι *S.* Enteritidis και Typhi που διαθέτουν μαστίγια με την ίδια πάντα αντιγονική ιδιότητα και για αυτό ονομάζονται μονοφασικοί. Τα αντιγόνα της πρώτης ομάδας χαρακτηρίζονται με πεζά γράμματα του λατινικού αλφαβήτου (a ως z), ενώ αυτής της δεύτερης ομάδας χαρακτηρίζονται με αραβικούς αριθμούς (1, 2, 3, κλπ). Ένας ορότυπος είναι δυνατό να έχει αντιγόνα μόνο της μίας φάσης ή και των 2 φάσεων. Τα ακίνητα στελέχη (*S.* Gallinarum και *S.* Pullorum) στερούνται μαστιγίων, άρα και H αντιγόνων.

Συνεπώς, κάθε ορότυπος του γένους *Salmonella* αναγνωρίζεται από το συνδυασμό αντιγόνων του, ως εξής: **Υποείδος (subspecies) [κενό] O-αντιγόνο [:] Vi αντιγόνο (αν υπάρχει) [:] H αντιγόνο α φάσης 1 : H αντιγόνο α φάσης 2** (Annon 2005). Τα κύρια αντιγόνα χωρίζονται με άνω κάτω τελεία και τα επιμέρους αντιγόνα με κόμμα. Σήμερα, υπεύθυνο για την ανανέωση του Σχεδίου είναι το Κέντρο Συνεργασίας Αναφοράς και Έρευνας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας στο Ινστιτούτο Pasteur στο Παρίσι.

Το 1973, υπήρξε μια καθοριστική εξέλιξη για την πορεία της ταξινόμησης των *Salmonellae,* καθώς οι Crosa *et al.* μετά από πειράματα DNA-DNA υβριδισμού αποδείξανε ότι όλα τα στελέχη πρέπει να ανήκουν σε ένα είδος (Crosa *et al.* 1973). Έτσι, προτάθηκε το όνομα *Salmonella cholerasuis* ως μοναδικό είδος της Salmonella, και καθορίστηκαν 6 υποείδη. Όμως, κατά το έτος 1989, παρουσιάστηκε μια εξαίρεση, αφού ένα από τα υποείδη, το *Salmonella choleraesuis* subsp. bongori (πρώην υποείδος V) διαχωρίστηκε από τα υπόλοιπα ως ένα ξεχωριστό είδος, λόγω των διαφορών στο γονιδίωμά του. (Reeves *et al.* 1989)

Μετά από συνεχιζόμενες διαφωνίες σχετικά με την ονοματολογία των *Salmonella* spp. συστάθηκε η «Επιτροπή Κρίσεων» (Judicial Commission) που ανακοίνωσε την Απόφαση 80 (Judicial Opinion 80). Έτσι, έγινε αποδεκτή η πρόταση από το 2005 και έπειτα η *Salmonella enterica* να αντικαταστήσει τη *Salmonella cholerasuis* ως τυπικό είδος (type species). Έκτοτε, η Επιτροπή αποδέχτηκε ότι το γένος *Salmonella* αποτελείται από 2 είδη: *Salmonella bongori* και *Salmonella enterica* που περιλαμβάνει 6 υποείδη. Ακόμη, το 2005, μέχρι να δημοσιευθεί η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Απόφαση, ένα ακόμα είδος αναγνωρίστηκε επίσημα, το *Salmonella subterranean* (Shelobolina *et al*. 2004), το οποίο πάντως σήμερα θεωρείται μοριακά πλησιέστερα στην *Escherichia hermanii* και όχι στο γένος *Salmonella* (Euzeby 2010).

Σήμερα, η ονοματολογία που χρησιμοποιείται από το World Health Organization (WHO), το Centers for Disease Control and Prevention (CDC) και την American Society for Microbiology (ASM) εξακολουθεί να βασίζεται στο έγγραφο του Σχεδίου Kauffmann-White, όπου είναι καταγεγραμμένοι όλοι οι αντιγονικοί τύποι των αναγνωρισμένων ορότυπων των *Salmonella* spp. Κάθε χρόνο, οι καινούριοι ορότυποι που αναγνωρίζονται δημοσιεύονται στο περιοδικό "Research in Microbiology" (Poppof *et al*. 2004). Σύμφωνα με το CDC, λοιπόν, το γένος *Salmonella* περιέχει 2 είδη: *Salmonella* enterica (ως είδος αναφοράς – type species) και τη *Salmonella* bongori. Η *S.* enterica αποτελείται από 6 υποείδη: I, *S. enterica* subsp. Enterica, II *S. enterica* subsp. Salamae, IIIa S. *enterica* subsp. Arizonae, IIIb S. *enterica* subsp. Diarizonae, IV *S. enterica* subsp. Houtenae, και VI *S. enterica* subsp. Indica. Στους ορότυπους του υποείδους I έχουν συνήθως δοθεί ονόματα ενδεικτικά των αντίστοιχων ασθενειών, ή ξενιστών ή της γεωγραφικής τους προέλευσης. Για τα υπόλοιπα υποείδη, καθώς και για αυτά της *S.* bongori χρησιμοποιείται το όνομα του υποείδους με λατινικούς χαρακτήρες (II-VI – όχι με πλάγια γραφή) και ακολουθεί ο αντιγονικός τύπος. Επίσης, για να αποφευχθεί η σύγχυση μεταξύ οροτύπων και ειδών, το όνομα του οροτύπου αρχίζει με κεφαλαίο γράμμα, χωρίς πλάγια γραφή. Όταν δημοσιεύεται για πρώτη φορά σε ένα κείμενο, γράφεται το όνομα του γένους ακολουθούμενο από τη λέξη serovar ή τη συντόμευση ser. και μετά το όνομα του ορότυπου (π.χ. *Salmonella* serotype or ser. Choleraesuis). Στις επόμενες αναφορές, μπορεί να συντομευθεί, δηλαδή το όνομα του ορότυπου να ακολουθεί αμέσως μετά από αυτό του γένους, για παράδειγμα *Salmonella* Choleraesuis or *S.* Choleraesuis.

1.3 Ειδικότητα Ξενιστή

Η φυσική δεξαμενή των *Salmonellae* είναι ο εντερικός σωλήνας των θερμόαιμων και ψυχρόαιμων ζώων, καθιστώντας τα συχνά υποκλινικούς φορείς που απεκκρίνουν το μικροοργανισμό (Quinn *et al*. 2006). Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί αυτοί συναντώνται παντού στο φυσικό περιβάλλον και επιβιώνουν ως και για 9 μήνες ή περισσότερο σε τοποθεσίες με υγρό χώμα, νερό, περιττώματα ζώων, ζωοτροφές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

(Quinn *et al*. 2006). Η εύρεση *Salmonella* spp. στο περιβάλλον είναι συνήθως ένδειξη της μόλυνσής του από κόπρανα. Ο πιο κοινός τρόπος μόλυνσης των διάφορων ζώων είναι μέσω της γαστρεντερικής οδού (faecal-oral route), δηλαδή μέσω της επαφής με μολυσμένο νερό, τροφή ή εκκρίσεις, όμως είναι πιθανή και η αερογενής μόλυνση (μέσω του επιπεφυκότα ή των βλεννογόνων του ανώτερου αναπνευστικού) που προκαλεί αναπνευστική νόσο, αφού οι *Salmonella* spp. είναι δυνατό να επιβιώσουν και σε αποξηραμένα αιωρούμενα σωματίδια (Greene 2006). Επίσης, η υδρόσφαιρα βρίθει παρουσίας *Salmonellae* spp., λόγω της μόλυνσης των νερών με λύματα. Τα ψάρια και τα οστρακόδερμα που διαβιούσαν σε προηγουμένως μολυσμένα ύδατα μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες, αφού φιλοξενούν το μικροοργανισμό για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα, ακόμα και μετά την παύση της απομόνωσης του μικροοργανισμού από το νερό (Greene 2006).

Γι' αυτούς τους λόγους, οι *Salmonella* spp. αναφέρονται ως «οικουμενικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί-universal pathogens» (Falkow and Mekalanos 1990). Επίσης, παρουσιάζουν διαφορετική παθογένεια στα διάφορα είδη ζώων, που οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένα από αυτούς έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται λιγότερο ή περισσότερο σε ξενιστές. Η προσαρμογή των οροτύπων οδηγεί σε αύξηση της λοιμογόνου δύναμης και της παθογένειας τους απέναντι στο είδος του ζώου, όπου έχουν προσαρμοστεί. Συγχρόνως, παρατηρείται μείωση της ή απώλεια της λοιμογόνου δύναμης απέναντι σε άλλα είδη ζώων. Αυτές οι διαφορές περικλείονται στο όρο «ειδικότητα ξενιστή» (Uzzau *et al.* 2001).

Η μόλυνση από *Salmonella* spp. δεν καταλήγει πάντα σε πανομοιότυπη εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων, αφού σε αυτό εμπλέκονται πολλοί παράγοντες, όπως: ο ορότυπος, η λοιμογόνος δύναμη του στελέχους, η μολύνουσα δόση, το είδος, η ηλικία, και η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (Wallis and Barrow 2005). Πάντως, καταλήγουν συνήθως ως εξής:

Α) οξεία εντεροκολίτιδα (σύντομη φλεγμονή του εντέρου και διάρροια)

Β) εντεροκολίτιδα (μακροχρόνια φλεγμονή του εντέρου και επαναλαμβανόμενες διάρροιες)

Γ) σηψαιμία

Δ) απουσία κλινικών συμπτωμάτων. Στην περίπτωση αυτή διακρίνονται διαφορετικοί τύπο ασυμπτωματικών φορέων (ενεργοί φορείς με συνεχή ή διαλείπουσα απέκκριση/ λανθάνοντες φορείς με επίμονη μόλυνση των λεμφαδένων ή

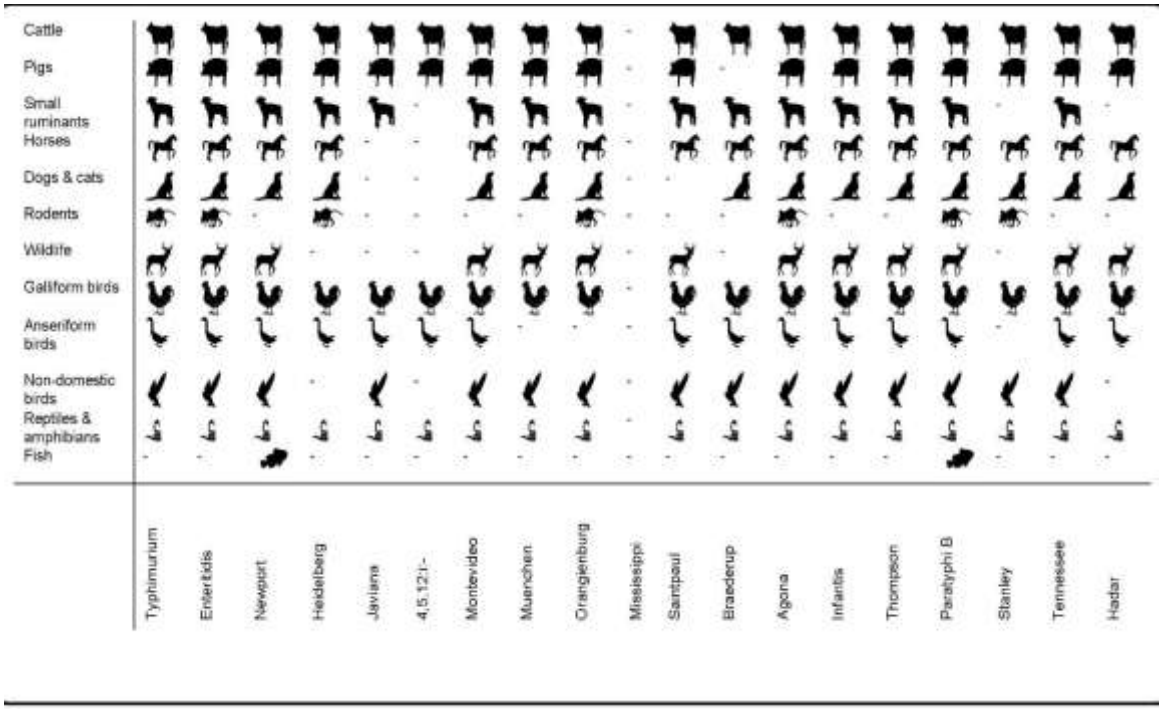
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

των αμυγδαλών χωρίς απέκκριση/ παθητικοί φορείς με συνεχή πρόσληψη και απέκκριση των μικροοργανισμών από και προς το περιβάλλον χωρίς λοίμωξη).

Με βάση την «προσαρμογή στον ξενιστή», οι ορότυποι των *Salmonellae* διακρίνονται σε τρεις ομάδες: Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους ορότυπους που παρουσιάζουν προσαρμογή στον ξενιστή (host specific ή host adapted serovars). Η ομάδα αυτή απαντάται σε ένα συγκεκριμένο είδος ξενιστή αλλά μπορούν να προκαλέσουν νόσο σε κάποια φυλογενετικώς συγγενικά είδη. Για παράδειγμα, ο ορότυπος Cholerasuis σχετίζεται με σοβαρή συστημική νόσο στο χοίρο αλλά μπορεί να προκαλέσουν νόσο και σε άλλα θηλαστικά και στον άνθρωπο (Uzzau *et al*. 2001). Πολλές φορές τα ζώα που μολύνονται γίνονται ασυμπτωματικοί φορείς.

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τους ορότυπους που είναι περιορισμένοι αποκλειστικά σε κάποιο ξενιστή (host restricted). Τέτοια παραδείγματα είναι οι ορότυποι Typhi, Gallinarum, Typhisuis, Abortusovis και σχετίζονται με συστηματική νόσο στον άνθρωπο, τα πτηνά, το χοίρο και τα πρόβατα αντίστοιχα (Wallis 2005). Τέλος, η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τους διαδεδομένους ορότυπους του υποείδους *enterica* που συνήθως προκαλούν αυτοπεριοριζόμενη γαστρεντερίτιδα σε μεγάλο φάσμα ξενιστών (un-restricted serovars) (Clarke and Gyles 1993). Συνήθως, προκαλούν νόσο σε νεαρά ζώα, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν διαθέτουν μηχανισμούς ικανούς να αντιμετωπίσουν ένα ώριμο ανοσοποιητικό σύστημα (Bäumler *et al*. 1998).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79



Πίνακας 1: Κατανομή των συχνότερων οροτύπων *Salmonella* spp. στα διάφορα είδη ζώων, με βάση δεδομένα από τις Η.Π.Α. (CDC 2009).

Οι ορότυποι των *Salmonella* spp. έχουν κατορθώσει να επεκτείνουν το εύρος των ξενιστών τους μέσω της απόκτησης νέων γονιδίων από οριζόντια γονιδιακή μεταφορά πλασμιδίων ή «νησιών παθογονικότητας». Αυτά παρέχουν γενετικά στοιχεία που αυξάνουν τις πιθανότητες της μόλυνσης νέων ξενιστών. Η προσθήκη των νησιών παθογονικότητας στο γονιδίωμα των *Salmonella* spp. οδήγησε στην ικανότητα να εισβάλλουν στα κύτταρα του ξενιστή και να εμμένουν στην πρόκληση ασθένειας. Κάποιες από αυτές τις μεταφορές συνέβησαν πιο πρόσφατα, επομένως δεν διαθέτουν αυτά τα γενετικά στοιχεία όλοι οι ορότυποι, ενώ άλλες συνέβησαν παλαιότερα οπότε υπάρχουν σε πολλούς γενεαλογικούς κλάδους της *S.* Enterica (Amavisit *et al*. 2003). Υπάρχουν πέντε νησιά παθογονικότητας (SPI-5) που θεωρούνται σημαντικά για την παθογενετική ικανότητα των *Salmonellae* (Foley and Lynne 2008).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι ορότυποι της *Salmonella* spp. σχετίζονται στενά, μετά από ανάλυση των ορθόλογων γονιδίων. Η διαφορά μεταξύ των νουκλεοτιδικών τους αλληλουχιών ποικίλλει μεταξύ 3.8% και 4.6% και οι διαφορές στην αλληλουχία αμινοξέων ποικίλλουν μεταξύ 0,7 και 1,3% (Selander *et al*. 1992). Η στενή συγγένεια μεταξύ των διάφορων οροτύπων του γένους αποδεικνύουν την κοινή τους καταγωγή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

από ένα πρόγονο που υπήρξε πριν 24-40 εκατομμύρια χρόνια. Όμως, δεν έχει διερευνηθεί πλήρως ποιοι παράγοντες οδήγησαν στην απόκλιση του γένους από τον πρόγονο και στην ανάδυση οροτύπων που διαφέρουν στο εύρος των ξενιστών τους (Baumler *et al*. 1998). Είναι γνωστό ότι η εξέλιξη των *Salmonella* spp. έγινε σε 3 φάσεις: Κατά την πρώτη φάση αποκτήθηκε το *SPI 1* (*Salmonella* pathogenicity island) μέσω οριζόντιας μεταφοράς με πλασμίδιο ή φάγο, το οποίο είναι παρόν σε όλους τους ορότυπους του γένους ενώ απουσιάζει από την *E. coli* και άλλους συγγενείς μικροοργανισμούς (Mills *et al*. 1995, Li *et al*. 1995). Δεύτερη φάση θεωρείται ο σχηματισμός δύο ξεχωριστών ειδών των *Salmonellae* spp. όπως αποδείχθηκε μετά από βιοχημική ταξινόμηση και μέτρηση της γενετικής απόστασης χρησιμοποιώντας DNA-DNA υβριδισμό ως κριτήριο. Αποκαλύφθηκε ότι οι ορότυποι που ανήκουν στη *S. enterica* απέκτησαν ένα δεύτερο «νησί παθογονικότητας» το *SPI 2* που απουσιάζει από αυτούς της *S.* bongori. Τα γονίδια παθογονικότητας που βρίσκονται στο *SPI 2* έχουν κατά μέσο όρο περιεκτικότητα G+C 41% που είναι πολύ χαμηλότερη από τη συνολική περιεκτικότητα G+C στο γονιδίωμα της *S. enterica* (52%), πράγμα που δείχνει ότι το *SPI 2* αποκτήθηκε από τη *S. enterica* μετά την εξέλιξή της από τη *S.* bongori (Ochman and Groisman 1996, Hensel *et al*. 1997,). Τέλος, η γενεαλογία της *Salmonella* οδήγησε στη δημιουργία διαφορετικών γενεαλογικών κλάδων που με την τρέχουσα ονοματολογία θεωρούνται υποείδη. Η δημιουργία ενός από αυτούς τους κλάδους (*S. enterica* subspecies I) εμπεριέχει μια αξιοσημείωτη επέκταση του εύρους ξενιστών: ενώ οι S. *bongori* και τα υποείδη της *S.* enterica II, IIIa, IIIb, IV, VI, VII σχετίζονται με ψυχρόαιμα σπονδυλωτά, οι ορότυποι του υποείδους I συνήθως απομονώνονται από πτηνά και θηλαστικά (Aleksic *et al*. 1996). Η προσαρμογή ξενιστή του υποείδους I σε θερμόαιμα σπονδυλωτά συνιστά την τρίτη φάση στην εξέλιξη της παθογονικότητας του γένους *Salmonella*, καθώς αντιμετωπίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών που παρουσιάζει καλύτερη δομή και οργάνωση από των ψυχρόαιμων (Bäumler *et al*. 1998).

Πάντως είναι γεγονός ότι αν και το υποείδος I της *S. enterica* περιλαμβάνει 1367 διαφορετικούς ορότυπους (Poppof *et al*. 1993), μόνο ένα ή μερικά από αυτά συνδέονται με την πλειοψηφία των περιπτώσεων μια νόσου σε ένα συγκεκριμένο είδος πτηνού ή θηλαστικού. Οι ορότυποι αυτοί παρουσιάζουν διαφορετικούς βαθμούς προσαρμογής στον ξενιστή. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί χωρίς ειδικότητα ξενιστή, όπως η *S.* Typhimurium και η *S.* Enteritidis τείνουν να συνδέονται με νόσο σε νεαρά ζώα, ενώ αυτοί με ειδικότητα ξενιστή έχουν την ικανότητα να προσπερνούν τους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

μηχανισμούς άμυνας σε ενήλικα ζώα, όπως υποδεικνύεται από τη συσχέτισή τους με νόσο σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, ενώ τείνουν να είναι πιο λοιμογόνα, αφού προκαλούν μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας. Έχει προταθεί μια θεωρία ότι τα παθογόνα των σπονδυλωτών που προκαλούν μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας χαρακτηρίζονται ως νέα άφιξη στον πληθυσμό που δεν είναι καλά προσαρμοσμένα σε αυτόν ενώ εξελίσσονται με το χρόνο, προσαρμόζονται και μεταβάλλονται σε λιγότερο λοιμογόνες μορφές (Burnet and White 1972). Όμως, ειδικά στην περίπτωση του υποείδους I της *S. enterica* φαίνεται ότι η εξέλιξη οδήγησε τις αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου στην αντίθετη κατεύθυνση, αφού οι προσαρμοσμένοι στον ξενιστή ορότυποι προκαλούν μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η *S.* Typhi που είναι προσαρμοσμένη στον άνθρωπο και προκαλεί τον τυφοειδή πυρετό (θνησιμότητα 12-32%). Αντίθετα, κρούσματα άλλων ζωονοτικών στελεχών *Salmonella* όπως η *S.* Enteritidis καταλήγουν σε θάνατο σε ποσοστό λιγότερο του 0,5% (Miller *et al*. 1990).

Ακόμα, έχει βρεθεί το *spv* οπερόνιο (*Salmonella* plasmid virulence operon) σε κάποιους συγκεκριμένους οροτύπους του υποείδους I της *S.* enterica, συμπεριλαμβανομένων των *S.* Typhimurium, Cholerasuis, Gallinarum/Pullorum, Abortusovis, Paratyphi C και Dublin (Molbak *et al*. 1999, Hjartardottir *et al*. 2002, Hurd *et al*. 2002, Gyles 2004, Cortés *et al*. 2006,). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι αυτοί οι ορότυποι είναι οι πιο συχνά συνδεδεμένοι με ασθένεια σε ομοιόθερμα σπονδυλωτά, υποδεικνύοντας ότι το *spv* ενδεχομένως παίζει ρόλο κατά τη λοίμωξη των ξενιστών και απαιτείται για τη συστημική φάση της ασθένειας που προκαλείται από τη *S.* Choleraesuis στους χοίρους (Steinmuller *et al*. 2006), S. Gallinarum/Pullorum στα κοτόπουλα (CDC 2008,), S. Dublin σε βοοειδή (Smith *et al*. 1980), και *S.* Typhimurium και Enteritidis σε ποντίκια (Ersboll *et al*. 2008). Επιδημιολογικά δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση ότι το οπερόνιο *spv* είναι σημαντικό για την παθογένεση των επιπλέον εντερικών λοιμώξεων, οφειλόμενων σε μη τυφοειδείς ορότυπους *Salmonella* σε ανθρώπους (Cummings *et al*. 2009).

Συνεπώς, φαίνεται ότι το *spv* οπερόνιο απατείται για τη συστημική φάση των λοιμώξεων που προκαλούνται από τα μη τυφοειδή στελέχη στα θερμόαιμα ζώα και τους ανθρώπους (Hurd *et al*. 2002, CDC 2008), αν και δεν είναι απαραίτητο ο μηχανισμός της συστηματικής μόλυνσης μέσω του *spv* να είναι περιορισμένος στους μη τυφοειδείς ορότυπους, αφού έχει ανιχνευθεί και στη *S.* Paratyphi C (Gyles 2004). Οι τυφοειδείς ορότυποι που δεν περιλαμβάνουν τα *spv* γονίδια προκαλούν εντερικό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

πυρετό μέσω ενός ανεξάρτητου μηχανισμού από τα γονίδια αυτά και φαίνεται ότι τα γενετικά στοιχεία που καθορίζουν την παθογονικότητα δεν έχουν ακόμη βρεθεί (CDC 2008). Το συγκεκριμένο οπερόνιο έχει ανιχνευθεί σε στελέχη της *S.* bongori και των υποειδών IIIa και IV, εκτός από αυτά του I της *S.* Enterica (Cote *et al*. 2004). Επομένως, η επέκταση του εύρους των ξενιστών που παρατηρείται για τους ορότυπους του υποείδους I δεν μπορούν να εξηγηθούν μόνο με την παρουσία των γονιδίων αυτών. Γενικά, η ικανότητα πρόκλησης συστημικού νοσήματος σε θερμόαιμα ζώα είναι ιδιαίτερα περίπλοκος φαινότυπος που δεν μπορεί να αποδοθεί στην απόκτηση ενός και μόνο καθοριστικού γενετικού στοιχείου. Επίσης, το γεγονός ότι βρίσκεται σε συγκεκριμένα πλασμίδια του υποείδους I της *S.* enterica υποδεικνύει ότι το οπερόνιο αποκτήθηκε από οριζόντια γονιδιακή μεταφορά (Baumler *et al*. 1998).

Οι ορότυποι των *Salmonellae* προσκολλώνται στον εντερικό βλεννογόνο του ξενιστή. Η αναγνώριση της επιφανειακής στοιβάδας του εντέρου από τις προσκολλητίνες είναι δυνατό να συνεισφέρει στην προσαρμογή των ορότυπων σε ξενιστές. Μία μη κροσσωτή προσκολλητίνη που ίσως παίζει ρόλο στην προσαρμογή στους ξενιστές κωδικοποιείται από το *invH*, ένα γονίδιο που βρίσκεται εντός του SPI1 της *S.* enterica. Η υπόθεση ότι το *invH* εμπλέκεται στην προσκόλληση του βακτηρίου βασίζεται στο εύρημα ότι η αδρανοποίηση μέσω μετάλλαξης μειώνει και την προσκόλληση και την εισβολή των ορότυπων σε καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα. (Altmeyer *et al*. 1993). Αντιθέτως, μεταλλάξεις στα γονίδια *invA* και *invE* που επίσης περιλαμβάνονται στο *SP1*, καθιστούν τους οροτύπους μη ικανούς να εισβάλλουν στα κύτταρα, αλλά δεν επηρεάζουν την προσκόλληση (Ginocchio *et al*. 1992), που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η προσκόλληση και η εισβολή είναι γενετικά ξεχωριστά γεγονότα. Οι προσκολλητίνες που εκφράζονται από ένα παθογόνο καθορίζουν τις δομές όπου θα προσκολληθεί στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι διαφορετικοί ορότυποι χρησιμοποιούν διαφορετικούς υποδοχείς όπου προσδένονται πράγμα που και αυτό ενδεχομένως επηρεάζει το εύρος ξενιστών μέσω γονιδιακού ανασυνδυασμού.

Επιπλέον, η απώλεια γονιδίων ή γονιδιακών λειτουργιών μπορεί επίσης να επηρεάσει την εξέλιξη του γονιδιώματος και του εύρους των ξενιστών, μέσω της απενεργοποίησης γονιδίων απαραίτητων για τη μόλυνση πολλών διαφορετικών ξενιστών (Maurelli 2007). Αυτός θεωρείται γενικά ως ένας δεύτερος εξελικτικός μηχανισμός, φαινομενικά αντίθετος με τον προηγούμενο, δηλαδή την οριζόντια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

γονιδιακή μεταφορά, που επηρεάζει το εύρος ξενιστών που μπορεί να προσβάλλει ένας μικροοργανισμός (Groisman and Ochman 1997). Τα στελέχη των *Salmonella* spp. που είναι προσαρμοσμένα σε έναν ξενιστή διαθέτουν σχετικά μεγάλο αριθμό ψευδογονιδίων και χρωμοσωμικών ανακατάταξεων σχετιζόμενων με τα γονίδια του ριβοσωμικού RNA (Matthews *et al*. 2010). Επίσης, οι προσαρμοσμένοι σε ξενιστή ορότυποι (*S*. Typhi, *S*. Paratyphi A, *S*. Dublin, *S*. Choleraesuis, και *S*. Gallinarum) περιέχουν μεγάλο ποσοστό ψευδογονιδίων στο γονιδίωμά τους συγκρινόμενοι με τους ορότυπους με ευρύ φάσμα ξενιστών (*S*. Enteritidis και *S*. Typhimurium) (Feng *et al*. 2012). Τα ψευδογονίδια είναι γονίδια που έχουν απενεργοποιηθεί λόγω ενθέσεων, διαγραφών, αντικαταστάσεων νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα την αποτυχία έκφρασης του προϊόντος του αρχικού γονιδίου.

Σχετικά με την προσαρμογή, είναι αμφίβολο αν η παρουσία των ψευδογονιδίων και η απώλεια της λειτουργίας οδηγεί σε περιορισμό του εύρους των ξενιστών ή ο αυξημένος αριθμός γονιδίων προέκυψε από τους ορότυπους που προσαρμόζονται σε είδη. Πιο πιθανή φαίνεται η συσσώρευση ψευδογονιδίων και η γενετική εξέλιξη έγινε λόγω προσαρμογής σε συγκεκριμένους ξενιστές (Holt *et al*. 2009). Άλλοι παράγοντες που πιθανότατα παίζουν ρόλο στην ποικιλομορφία του εύρους των ξενιστών συμπεριλαμβάνουν τη γενετική προσαρμοστικότητα των οργανισμών σε συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά που αφθονούν στους οργανισμούς των ξενιστών αλλά περιορισμένα σε άλλα περιβάλλοντα (Maurelli 2007).

Το φαινόμενο της προσαρμογής του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε ξενιστές είναι πολύπλοκο, εμπλέκει πολλούς γενετικούς μηχανισμούς και παρά τις πολλές μελέτες στον τομέα αυτό, οι γνώσεις είναι ακόμη περιορισμένες. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν εξαπλωθεί σε νέους ξενιστές, μέσω περαιτέρω έρευνας της γενετικής βάσης της προσαρμογής μπορεί να είναι χρήσιμη για την πρόβλεψη της εξέλιξης του νοσήματος στο μέλλον, πράγμα που έχει άμεσο αντίκτυπο στη Δημόσια Υγεία (Evangelopoulou *et al*. 2013)

1.4 Παρουσία των *Salmonella* spp. στα διάφορα είδη ζώων και Δημόσια Υγεία

Οι *Salmonella* spp. είναι σημαντικοί μικροοργανισμοί για τη Δημόσια Υγεία, τόσο λόγω των επιπτώσεων της στην υγεία του ανθρώπου, όσο και από οικονομικής άποψης. Γενικά, οι λοιμώξεις στον άνθρωπο εξαιτίας των ορότυπων των *Salmonella*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

spp. εκτός από αυτούς των *S.* Typhi και *S.* Paratyphi, αποδίδονται με τον όρο σαλμονέλλωση. Θεωρείται περισσότερο τροφιμογενές νόσημα, αφού πολλές φορές οι άνθρωποι μολύνονται τρώγοντας ανεπαρκώς μαγειρεμένο ή ακατάλληλα προετοιμασμένο, μολυσμένο φαγητό. Η περίοδος επώασης και τα συμπτώματα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση των βακτηρίων στην τροφή, την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς και τον ορότυπο (ECDC 2014). Σε μια πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι περίπου 93.8 εκατομμύρια κρούσματα γαστρεντερίτιδας σε ανθρώπους και 155 χιλιάδες θάνατοι οφείλονται σε λοίμωξη από *Salmonella*, ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο (Majowicz *et al*. 2010). Επίσης, οι λοιμώξεις του ανθρώπου εξαιτίας του μικροοργανισμού υπολογίζονται ότι κοστίζουν περίπου 3 δισεκατομμύρια ευρώ ανά έτος (EFSA 2008).

Η σαλμονέλλωση είναι ζωοανθρωπονόσος, δηλαδή νόσος η οποία μεταδίδεται άμεσα ή έμμεσα ανάμεσα στα ζώα και τον άνθρωπο. Στον άνθρωπο προκαλεί διάρροια, πυρετό και κοιλιακό άλγος, ενώ αν εισέλθει στο κυκλοφορικό σύστημα μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Διάφορα ζώα αποτελούν δεξαμενές των *Salmonellae,* όπως τα πουλερικά, χοίροι, βοοειδή και ερπετά. Όπως έχει αναφερθεί, πολλές φορές βρίσκεται στο έντερο κλινικώς ασυμπτωματικών ζώων. Σχετικά με τα τρόφιμα, πολλές φορές βρίσκεται σε αυγά ή ωμό κρέας χοίρων και πουλερικών (EFSA 2008). Επίσης, σύμφωνα με τα δεδομένα του ECDC, τα επιβεβαιωμένα κρούσματα σαλμονέλλωσης στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το 2012 ήταν 21,9 περιπτώσεις σε πληθυσμό 100.000 ατόμων, ενώ στα παιδιά ο επιπολασμός ήταν πολύ υψηλότερος (98,15 κρούσματα ανά 100.000 παιδιά) και παραμένει η δεύτερη πιο συχνή αιτία λοίμωξης του γαστρεντερικού συστήματος στην Ευρώπη (ECDC 2014). Στην Ελλάδα, σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ, ο επιπολασμός των σαλμονελλώσεων έχει μειωθεί τα τελευταία χρόνια άλλα παραμένει υψηλός στα παιδιά (47,4 κρούσματα ανά 100.000 παιδιά το 2013). Στη Μ. Βρετανία, έχουν αναφερθεί περισσότερα από 7500 κρούσματα σαλμονέλλωσης σε ανθρώπους, κατά το 2013 και από αυτά υπολογίζονται ότι σε ποσοστό 55-95% οφείλονται σε τροφιμογενή μετάδοση, αλλά περίπου 9% αυτών αποδίδονται σε άμεση επαφή με το ζώο. (EFSA 2008).

Είναι γεγονός ότι ο επιπολασμός της σαλμονέλλωσης παρουσιάζει πτωτική τάση την τελευταία πενταετία στην Ευρωπαϊκή Ένωση καθώς και στην Ευρωζώνη, η οποία κατά κύριο λόγο αποδίδεται στην εφαρμογή των συντονισμένων προγραμμάτων κτηνιατρικής επιτήρησης και ελέγχου, ειδικά στα πτηνά. Εξαίρεση αποτελούν η Γαλλία και η Ολλανδία (ECDC 2014). Η αύξηση του επιπολασμού στη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Γαλλία μπορεί να εξηγηθεί από τη αυξανόμενη αποστολή δειγμάτων στα Εθνικά Εργαστήρια Αναφοράς για τη *Salmonella* μετά το 2008, ενώ για την Ολλανδία λόγω της μεγάλης επιδημίας της *S*. Thompson από μολυσμένο σολωμό το 2012 με 866 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις σαλμονέλλωσης (Friesema *et al*. 2012).

Το 2012, οι πιο κοινά αναφερόμενοι ορότυποι, στην Ευρώπη ήταν οι: *S*. Enteritidis, *S*. Typhimurium, monophasic *S*. Typhimurium, *S*. Infantis, και *S*. Stanley. Η τελευταία σχετίζεται με την πρόσφατη επιδημία σε πολλές χώρες λόγω της κατανάλωσης κρέατος από γαλοπούλα. Δηλαδή, κατά το έτος 2010 οι ορότυποι Typhimurium και Derby (EFSA 2010) ήταν οι πιο διαδεδομένοι στα περισσότερα κράτη-μέλη της ΕΕ. Επίσης, αναφερόταν ότι οι ορότυποι όπως οι London και Infantis απομονώθηκαν μόνο σε περιοχές της Δυτικής Ευρώπης (EFSA 2010). Όμως φαίνεται ότι αυτό πλέον έχει αλλάξει και παρατηρείται ανάδυση άλλων ορότυπων, καθώς πλέον προσμετρώνται ξεχωριστά τα κρούσματα που προκαλούνται από τα αναδυόμενα μονοφασικά στελέχη της *S*. Typhimurium, ενώ νέες είσοδοι στους 10 πιο συχνούς παρατηρούμενους ορότυπους σε επιβεβαιωμένες περιπτώσεις σαλμονέλλωσης σε ανθρώπους ήταν οι *S*. Thompson και *S*. Panama (ECDC 2014).

Όσον αφορά την κατάσταση στην Αμερική, εκτιμάται ότι ο μικροοργανισμός είναι υπεύθυνος για 1,4 εκατομμύρια ανθρώπινα κρούσματα, 15000 νοσηλεύσεις και περισσότερους από 400 θανάτους ετησίως (Voetsch *et al*. 2004). Ωστόσο, υπολογίζεται ότι μόνο ένα ποσοστό 1-5% των κρουσμάτων επιβεβαιώνονται εργαστηριακά και αναφέρονται στο CDC. Ο επιπολασμός διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές, γεγονός που παρατηρείται και στην Ευρώπη (EFSA 2008, Lanzieri *et al*. 2008,). Κατά το 2009, η *Salmonella* ήταν το πιο συχνά αναφερόμενο βακτηριακό παθογόνο υπαίτιο για τροφιμογενή νόσο στον άνθρωπο, προκαλώντας το 44% των επιβεβαιωμένων τροφιμογενών βακτηριακών λοιμώξεων (CDC 2009). Ακόμη, το 20% των στελεχών που απομονώθηκαν από κλινικές περιπτώσεις ανθρώπων ανήκαν σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών, γεγονός που τονίζει την ιδιαίτερη προσοχή που πρέπει να αποδίδεται σε αυτή την ηλικιακή ομάδα (CDC 2008). Λόγω του υψηλού επιπολασμού των λοιμώξεων των *Salmonellae* spp., υπολογίστηκε το ετήσιο κόστος που δαπανάται εξαιτίας των σαλμονελλώσεων στα 2,5 δισεκατομμύρια δολλάρια, ξεπερνώντας το αντίστοιχο κόστος των λοιμώξεων από *E.coli* (460 εκατομμύρια δολλάρια) και της λιστερίασης (2 δις δολλάρια) (Ivanek *et al*. 2004).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Οι Majowicz *et al*. (Majowicz *et al*. 2010) πρόσφατα υπολόγισαν ότι οι 80,3 από τις 93,8 εκατομμύρια περιπτώσεις σαλμονελλώσεων οφείλονται σε τροφιμογενείς αιτίες, δηλαδή σε ποσοστό 86% των κρουσμάτων. Μια άλλη μελέτη βασισμένη σε ανάλυση της γνώμης ειδικών υπολόγισε ότι περίπου το 55% των σαλμονελλώσεων είναι τροφιμογενείς, το 14% σχετίζονται με ταξίδια, 13% αποκτώνται από το περιβάλλον, 9% οφείλονται σε άμεση επαφή μεταξύ ανθρώπων, και 9% σε άμεση επαφή με ζώα (Vargas-Galindo 2007). Μια άλλη μελέτη, με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα εκτιμά ότι το 95% των μη τυφοειδών σαλμονελλώσεων είναι τροφιμογενείς (Chalker 1988). Η διχογνωμία αυτή αποτυπώνει την πολυπλοκότητα και την αδυναμία εντοπισμού της προέλευσης των *Salmonella* spp. Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα οι περιπτώσεις που σχετίζονται με τη μετάδοση από ζώα να παραμένουν άγνωστες λόγω μη αναφοράς τους, που ενδεχομένως αποδίδεται σε διάφορους λόγους, όπως: το γεγονός ότι συγκεκριμένοι ορότυποι των *Salmonella* σχετίζονται συχνά με συγκεκριμένα είδη ζώων (π.χ. ερπετά) (Wells et *al*. 2004), κάποιες επαφές με ασυμπτωματικά ζώα δεν μένουν στη μνήμη των ασθενών (Bender and Shulman 2004,) καθώς και το γεγονός ότι λίγες ή ήπιες περιπτώσεις δεν αναφέρονται. Επομένως, τα επιδημιολογικά δεδομένα περιλαμβάνουν περισσότερο μεγαλύτερες επιδημίες, ασυνήθιστους και σπανιότερους ορότυπους, συνδέσεις με συγκεκριμένα είδη ζώων (Hoelzer *et al.* 2011).

Όσον αφορά το ρόλο των ζώων στη μετάδοση των σαλμονελλώσεων και τη Δημόσια Υγεία, διάφορα επιδημιολογικά δεδομένα συνδέουν την επαφή με ζώα και τη ζωονόσο. Τα βοοειδή, τα μικρά μηρυκαστικά και οι χοίροι έχουν αναφερθεί ως πηγές σαλμονελλώσεων, αφού έχουν αναφερθεί κρούσματα σε ανθρώπους μετά από άμεση επαφή με βοοειδή όπως κατά τα έτη 2002 και 2004 σε περιπτώσεις λοίμωξης από S. Newport στις Η.Π.Α. (Hoelzer *et al*. 2011), μετά από επαγγελματική έκθεση σε πρόβατα που κατέληξαν σε λοιμώξεις από *Salmonella* Brandenburg στη Ν. Ζηλανδία (Baker *et al*. 2007) ή μετά από επιδημιολογικό ξέσπασμα *S*. Typhimurium στο Wisconsin που συνδέθηκε με έμμεση επαφή με χοίρο (Steinmuller *et al*. 2006). Η κατανάλωση ωμού γάλακτος ή τυριού περιπλέκει μερικές φορές την ακριβή προέλευση της λοίμωξης, ενώ η επαφή με κοπριά, η εναπόθεση χώματος στα παπούτσια, η ονυχοφαγία έχουν ταυτοποιηθεί ως παράγοντες κινδύνου για λοιμώξεις από *E. coli* σχετιζόμενες με ζώα, άρα πιθανότητα και για σαλμονελλώσεις (Hunter *et al*. 1976). Πολύ λιγότερα είναι γνωστά για τους κινδύνους μέσω της έμμεσης επαφής με τα ζώα και κυρίως για την περιβαλλοντική μόλυνση, ενώ φαίνεται ότι τα κλινικώς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

ασθενή ζώα αντιπροσωπεύουν μεγαλύτερο ρίσκο, αφού είναι πιο πιθανό να εκκρίνουν το μικροοργανισμό σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Όμως και οι ασυμπτωματικοί φορείς μπορούν να εκκρίνουν και να μεταδίδουν τα στελέχη των *Salmonella* spp. για μακροχρόνιες περιόδους.

Ο επιπολασμός της *Salmonella* μεταξύ σκύλων και γατών ποικίλλει και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Έχει βρεθεί σε μελέτη ότι ποσοστό 43,5% των greyhounds που τρέχουν σε αγώνες ταχύτητας απέκκριναν *Salmonella*, ενώ σε άλλη μελέτη το 60% των σκυλιών ελκήθρων της Αλάσκα απέκκριναν το μικροοργανισμό (Cantor *et al.* 1997, Bagcigil *et al*. 2007). Σε έρευνες που έγιναν σε μη αθλητές δεσποζόμενους σκύλους και γάτες φάνηκε ότι το ποσοστό απέκκρισης κυμαινόταν από 1-5% (Kwaga *et al*. 1989, Weber *et al*. 1995, Hill *et al*. 2000, Spain *et al*. 2001, Hackett and Lappin 2003). Η κατανάλωση μολυσμένης τροφής θεωρείται ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου, και κυρίως η ωμή τροφή, όπως φαίνεται σε σχετικές μελέτες (Joffe *et al*. 2002,Finley *et al*. 2007), ενώ οι ορότυποι Typhimurium, Heidelberg, Kentucky φαίνεται να απομονώνονται κυρίως από σκύλους που ακολουθούν ωμή διατροφή. Οι ασυμπτωματικοί σκύλοι απεκκρίνουν το μικροοργανισμό περιοδικά.

Πολλοί ζωονοτικοί ορότυποι έχουν απομονωθεί από κατοικίδιους σκύλους και γάτες, ενώ κρούσματα σαλμονέλλωσης σε ανθρώπους έχουν αποδοθεί σε επαφή με μολυσμένους σκύλους ή γάτες στο σπίτι ή σε κτηνιατρικές κλινικές, όπως το 1999 με περιπτώσεις σαλμονέλλωσης από *S.* Typhimurium που συσχετίστηκαν με επαφή με ασθενή γατάκια σε κτηνιατρική κλινική (Hoelzer *et al*. 2011). Έχει πλέον αποδειχθεί και η μετάδοση από ένα ζώο στο άλλο ύστερα από κατανάλωση μολυσμένης τροφής σε κυνοκομείο στρατιωτικών σκύλων (Schotte *et al*. 2007). Όλα αυτά τα στοιχεία υποδεικνύουν σαφώς ότι η επαφή με σκύλους και γάτες σε σπίτια, κτηνιατρικές κλινικές και καταφύγια καθώς και η επαγγελματική ενασχόληση με τα ζώα αυτά συνιστούν εν δυνάμει απειλή για την υγεία του ανθρώπου. Επίσης, οι ζωοτροφές έχουν συσχετιστεί με την παρουσία *Salmonella*, τόσο οι εμπορικά διαθέσιμες ωμές τροφές (Finley *et al*. 2008,) αλλά σε μικρότερο βαθμό και οι ξηρές ζωοτροφές που πρόσφατα συνδέθηκαν με μια επιδημία κρουσμάτων σαλμονέλλωσης (CDC 2008). Πάντως τα δεδομένα που αφορούν την παρουσία *Salmonella* στις ζωοτροφές είναι ακόμη ελλιπή.

Τέλος, πλήθος άλλων ζώων έχουν συμμετοχή στη μετάδοση των *Salmonella* spp. όπως τα τρωκτικά, τα κουνέλια, τα «λεγόμενα εξωτικά κατοικίδια ζώα» (ερπετά,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

αμφίβια, πρωτεύοντα, σκαντζόχοιροι, νυφίτσες-ferrets,) καθώς και είδη της άγριας πανίδας (πτηνά και θηλαστικά). Υπάρχουν δεδομένα που συνδέουν τα είδη αυτά με κρούσματα σαλμονέλλωσης σε ανθρώπους, αλλά είναι ακόμη ελλιπή και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση (Woodward *et al.* 1997, Riley and Chomel 2005).

1.5 Παθογένεια των *Salmonella* spp.

Πειραματικά, έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητο να καταποθούν πολλοί μικροοργανισμοί για να πραγματοποιηθεί αποικισμός του γαστρεντερικού σωλήνα, ανεξαρτήτως της πρόκλησης ή μη κλινικής νόσου (Greene 2006). Η εγκατάσταση και η εμμονή των μικροοργανισμών στο επιθήλιο και το λεμφικό ιστό του εντέρου είναι υπεύθυνα για την απέκκριση του μικροοργανισμού, που διαρκεί από 3 έως 6 εβδομάδες (Greene 2006). Η απέκκριση είναι συνεχής κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας αλλά στη συνέχεια γίνεται διαλείπουσα. Φαγοκύτταρα του εντερικού λεμφικού ιστού, του ήπατος ή του σπλήνα μπορούν να φιλοξενούν συνεχώς το μικροοργανισμό, ακόμα και όταν δεν απεκκρίνεται. Η υποτροπή με απέκκριση του μικροοργανισμού ή επανεμφάνιση της κλινικής νόσου μπορεί να συμβεί μετά από υποβολή σε παράγοντες stress (π.χ. συνωστισμός), ανοσοκαταστολή, συνυπάρχουσες λοιμώξεις από ιούς.

Η κυριότερη λοιμογόνος δράση των *Salmonella* spp. είναι η προσβολή του εντερικού βλεννογόνου και ο πολλαπλασιασμός τους στον εντερικό λεμφικό ιστό (Gut Associated Lymph Tissue). Όμως, ο γαστρεντερικός σωλήνας του ξενιστή διαθέτει διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς, αποτελώντας εχθρικό περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς. Ο πρώτος από αυτούς μετά την κατάποση είναι το όξινο περιβάλλον του στομάχου, αφού έχει φανεί ότι συνθήκες που αυξάνουν το χαμηλό pH στο όργανο αυτό μειώνουν τη λοιμογόνο δράση των *Salmonella* spp. (Giannella *et al*. 1972). Όσα από τα βακτήρια επιβιώνουν, μεταφέρονται στο λεπτό έντερο. Εκεί υπάρχουν προστατευτικοί αντιμικροβιακοί μηχανισμοί και παράγοντες, όπως χολικά άλατα, εντερική βλέννη, λυσοζύμη, λακτοφερίνη και οργανικά οξέα, καθώς και οι περισταλτικές κινήσεις του εντέρου (Clarke and Gyles 1993). Συνεπώς, το 15% του μικροβιακού φορτίου εντοπίζεται στον αυλό του τυφλού και του παχέος εντέρου και μόνο το 5% καταφέρει να διαπεράσει το τοίχωμα του λεπτού εντέρου και να εγκατασταθεί στο λεμφικό ιστό (Carter and Collins 1970). Εμπόδιο για τον αποικισμό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

από *Salmonella* spp αποτελεί και η φυσιολογική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Hentges and Maier 1970).

Οι μικροοργανισμοί των *Salmonella* spp. προσπαθούν να διαφύγουν από το ανταγωνιστικό περιβάλλον του αυλού του εντέρου και να διεισδύσουν στον εντερικό βλεννογόνο μέσω μια διαδικασίας που ονομάζεται μακροπινοκυττάρωση (Frances *et al*. 1993): με την προσκόλληση των βακτηρίων στην επιφάνεια των εντεροκυττάρων προκαλούνται ανακατατάξεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, οδηγώντας στη διάσπαση της φυσιολογικής ψυκτροειδούς παρυφής του επιθηλίου και στο σχηματισμό αναδιπλώσεων της κυτταρικής μεμβράνης που περικλείουν τα βακτήρια σε μεγάλα κενοτόπια (*Salmonella* containing vacuole –SVC). Αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο για την επιβίωση των βακτηρίων, τη μεταφορά τους στα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και τα φαγοκύτταρα (Goosney *et al*. 1999). Τα κενοτόπια μεταφέρονται στη βάση του κυττάρου, ο μικροοργανισμός αλληλεπιδρά με τα μακροφάγα των πλακών του Peyer και εισέρχεται σε αυτά (Galan 2001).

Έτσι, από τον προσβεβλημένο εντερικό βλεννογόνο, τα βακτήρια μεταφέρονται στους επιχώριους λεμφαδένες, όπου τα μακροφάγα αποτελούν ένα πρώτο αποτελεσματικό φραγμό για να αποφευχθεί περαιτέρω μετάδοση. Αν επιτευχθεί αυτό, η λοίμωξη παραμένει εντοπισμένη στο έντερο και το λεμφικό του ιστό, προκαλώντας οξεία γαστρεντερίτιδα. Σε περίπτωση, όμως, που τα μακροφάγα των λεμφογαγγλίων δεν περιορίσουν τη μετάδοση, είναι δυνατό να προκληθεί συστηματική νόσος, καθώς οι μικροοργανισμοί διασπείρονται μέσω των απαγωγών λεμφαγγείων και του θωρακικού πόρου καταλήγοντας σε σηψαιμία (Rychlik and Barrow 2005). Πάντως, φαίνεται ότι η εκλεκτική εισβολή και ο αποικισμός του λεμφικού ιστού του τοιχώματος του ειλεού, που στα θηλαστικά αποτελούν τις πλάκες του Peyer, είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας για την εξέλιξη της νόσου, είτε εντοπισμένης είτε συστηματικής (Hohmann *et al*. 1978), αφού η διάτρηση του εντέρου στην περιοχή αυτή είναι η συχνότερη αιτία θανάτου κατά τον τυφοειδή πυρετό (Bitar and Tarpley 1985).

Πάντως, η ικανότητα των *Salmonella* spp. να προκαλούν νόσο (εντοπισμένη ή συστηματική) εξαρτάται από πολλούς λοιμογόνους παράγοντες που καθορίζονται από πολλά γονίδια. Τα γονίδια αυτά καθορίζουν τη λοιμογόνο ικανότητα (προσκόλληση, εισβολή, αντίσταση στους αμυντικούς μηχανισμούς) και βρίσκονται σε συγκεκριμένες περιοχές του χρωμοσώματος που ονομάζονται νησίδια παθογένειας (pathogenic islands – PI) (Groisman and Ochman 1996). Τα γονίδια που είναι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

απαραίτητα για την επιβίωση των βακτηρίων και σε συνθήκες stress, εκτός των κυττάρων του ξενιστή, θεωρούνται γονίδια βασικών λειτουργιών και συναντώνται και σε άλλα συγγενή βακτήρια (π.χ. *E. coli*). Τέλος, υπάρχουν ρυθμιστικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τόσο την απόκριση στα περιβαλλοντικά σήματα αλλά και την έκφραση των γονιδίων βασικών λειτουργιών και των ειδικών για τη *Salmonella* γονιδίων (Fedorca-Cray *et al*. 2000, Erhardt and Dersch 2015).

1.6 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική πράξη για θεραπευτικούς σκοπούς, κυρίως κατά των λοιμωδών νοσημάτων που οφείλονται σε βακτήρια, από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Οι ουσίες αυτές υπήρξαν εξαιρετικά αποτελεσματικές στη θεραπευτική αντιμετώπιση νοσημάτων του ανθρώπου και των ζώων ενώ παλαιότερα χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες για τη βελτίωση των αποδόσεων των παραγωγικών ζώων (Aarestrup and Wegener 1999, Mathew *et al*. 2007). Με βάση το μηχανισμό δράσης τους, ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες:

Α) Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος: β-λακταμικά αντιβιοτικά (πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες, αναστολείς β-λακταμασης, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες) και τα γλυκοπεπτίδια (βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη) που αναστέλλουν το σχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.

Β) Αναστολή πρωτεϊνικής σύνθεσης: σπεκτινομυκίνη, λινκοσαμίδες, τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη, αμινογλυκοσίδες, μακρολίδια, που δρουν μέσα στο κυτταρόπλασμα και αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση σε διάφορα στάδιά της. Διαταράσσουν κυρίως τη ριβοσωμική λειτουργία, αφού τα ριβοσώματα των μικροβίων με βάση το μέτρο πυκνότητας ανήκουν στη 70S ομάδα. Αντίθετα, αυτά των θηλαστικών κατατάσσονται στην 80S, και έτσι εξηγείται η επιλεκτική δράση των αντιβιοτικών στα βακτηριακά κύτταρα και όχι σε αυτά του ξενιστή.

Γ) Αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων: σουλφοναμίδες, νοβοκιονίνη, τριμεθοπρίμη, ριφαμπικίνη, κινολόνες που παρεμβαίνουν σε διάφορα στάδια σύνθεσης πυρηνικών οξέων.

Δ) Αναστολή λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης: πολυμυξίνη Β, αμφοτερικίνη Β, κολιστίνη, νυστατίνη που παρεμποδίζουν τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού που οδηγεί σε καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου. Η δομή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

της κυτταρικής μεμβράνης διαφέρει μεταξύ των μικροοργανισμών και ανώτερων οργανισμών και έτσι δικαιολογείται η επιλεκτική δράση των αντιβιοτικών.

Ωστόσο, η ανθεκτικότητα σε αυτές τις ουσίες ανιχνεύθηκε σε συγκεκριμένα παθογόνα, κάποια χρόνια μετά τη χρήση τους σε ανθρώπους (Alanis 2005). Η επιλεκτική πίεση που δημιουργήθηκε λόγω της χρήσης των αντιβιοτικών, ταυτοποιήθηκε ως η κινητήριος δύναμη πίσω από την ανάδυση της ανθεκτικότητας σε αυτά, και κωδικοποιείται γενετικά (Frye and Jackson 2013). Η ιδιότητα αυτή κληρονομείται από μετέπειτα απογόνους ανθεκτικών παθογόνων και κάποιες φορές γίνεται οριζόντια μεταφορά ακόμα και σε μη συγγενικά βακτήρια (Linton 1977). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, ο αριθμός των λοιμώξεων σε ανθρώπους που οφείλονται σε ανθεκτικά στελέχη στα αντιβιοτικά έχει αυξηθεί, δυσχεραίνοντας τη θεραπευτική προσπάθεια των γιατρών (Alanis 2005). Λόγω των γενετικών μηχανισμών που σχετίζονται με την απόκτηση ανθεκτικότητας και την ικανότητα των μικροοργανισμών να εξελιχθούν μετά την διάδοση των αντιβιοτικών, η εκτεταμένη χρήση τους στα ζώα θεωρήθηκε μία ενδεχόμενη πηγή ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων που θα μπορούσαν να μεταδοθούν στον άνθρωπο (Aarestrup 2005, Aarestrup *et al*. 2008, Shryock and Richwine 2010).

Έρευνες σχετικές με την επίδραση στην υγεία του ανθρώπου από τη χρήση των αντιβιοτικών στα ζώα εστίασαν στο να καθορίσουν το ποσοστό της ανθεκτικότητας σε βακτήρια που απομονώθηκαν από ζώα και ανθρώπους (Tollefson *et al*. 1998). Έπειτα, έγινε προσπάθεια να χαρακτηριστούν οι μηχανισμοί που οδήγησαν σε ανθεκτικότητα και να διαπιστωθεί αν τα ανθεκτικά στελέχη που βρέθηκαν σε κρούσματα λοιμώξεων από ανθρώπους πρώτα παρουσιάστηκαν σε ζώα. Εφαρμόστηκαν, λοιπόν, προγράμματα για την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε πολλές χώρες, όπως Η.Π.Α., Καναδάς, Μεξικό, Ε.Ε. (Tollefson *et* al. 1998, Martel *et al*. 2000, Hammerum *et al*. 2007). Στόχος των προγραμμάτων αυτών είναι η παρακολούθηση αλλαγών στην ανθεκτικότητα ζωονοτικών παθογόνων, από κλινικά δείγματα ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης, από υγιή παραγωγικά ζώα και από ωμά προϊόντα ζωικής προέλευσης στο σφαγείο και κατά την επεξεργασία τους, καθώς και η διάχυση των πληροφοριών παγκοσμίως. Στο πλαίσιο των προγραμμάτων αυτών, εφαρμόζονται επιδημιολογικές, μικροβιολογικές και μοριακές μέθοδοι για να γίνουν περισσότερο κατανοητά τα στοιχεία που συλλέγονται.

Οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ανθεκτικότητα ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες: 1) απενεργοποίηση των αντιβιοτικών μέσω υδρολυτικών ή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

τροποποιητικών ενζύμων 2) η ελαττωμένη διαπερατότητα του βακτηριακού τοιχώματος 3) η ενεργητική απέκκριση του αντιβιοτικού μέσω αντλιών ενεργητικής εκροής αποβολής (efflux pumps) 4) αλλαγή του βιολογικού στόχου δράσης (αλλαγή διαμόρφωσης σημείων δράσης) του αντιβιοτικού 5) χρήση εναλλακτικού μεταβολικού μονοπατιού από αυτό που αναστέλλεται από το αντιβιοτικό (McDermott *et al*. 2003, Foley and Lynne 2008).

Η ανθεκτικότητα οφείλεται σε γενετικούς μηχανισμούς που ποικίλλουν από μεταλλάξεις σε ενδογενή γονίδια μέχρι την απόκτηση γονιδίων ανθεκτικότητας που περικλείονται σε μεταθετά γενετικά στοιχεία μέσω οριζόντιας μεταφοράς (mobile genetic elements MGEs), όπως τα πλασμίδια. Οι σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν στόχους αντιβιοτικών μπορούν να καταλήξουν σε έναν ανθεκτικό στόχο, όπως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της γυράσης οδηγούν στην έκφραση ενός ανθεκτικού στις φθοριοκινολόνες ένζυμο γυράσης (Eaves *et al*. 2004, Hopkins *et al*. 2005). Τα εξωγενή γονίδια ανθεκτικότητας που βρίσκονται σε πλασμίδια, ενσωματόνια, φάγους και μεταθετόνια μπορούν να μεταφερθούν οριζόντια μέσω βακτηριακής σύζευξης (conjugation), μετασχηματισμού (transformation), μεταγωγής (transduction). Γεγονός είναι ότι όλοι οι τρόποι που καταλήγουν σε γονίδια αντιβιοαντοχής (ενδογενείς ή εξωγενείς) μπορούν να οδηγήσουν στην απόκτηση και των τεσσάρων μηχανισμών ανθεκτικότητας. Η ανάλυση του τρόπου απόκτησης των γονιδίων και των μηχανισμών ανθεκτικότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει τη γενετική σχέση μεταξύ ανθεκτικών στελεχών από ανθρώπους και ζώα (Boerlin 2004).

Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες, παρέχεται από τις β-λακταμάσες που ενζυμικά διασπούν το δακτύλιο β –λακτάμης, αδρανοποιώντας τον και εμποδίζοντας το ένζυμο από το να ολοκληρώσει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Frye and Jackson 2013). Για το λόγο αυτό, έγιναν τροποποιήσεις των χημικών ομάδων γύρω από το δακτύλιο των β-λακταμών, για να παραχθούν αντιβιοτικά- ανθεκτικές στις β-λακταμάσες, που κατέληξαν σε ουσίες όπως μεθικιλλίνη και οξακιλλίνη, κεφαλοσπορίνες όπως κεφαλοθίνη , κεφοξιτίνη , κεφτριαξόνη, κεφιπίμη που είναι κεφαλοσπορίνες $1^{ης}$ και $4^{ης}$ γενιάς αντιστοίχως, και καρβαπενέμες όπως ιμιπενέμη και μεροπενέμη (Frye and Jackson 2013). Εξαιτίας της επιλεκτικής πίεσης που ασκήθηκε από αυτά τα νέα αντιβιοτικά, μεταλλάξεις σε γονίδια της β-λακταμάσης έχουν δημιουργήσει ένζυμα που μπορούν να αδρανοποιήσουν αυτές τις β-λακτάμες νέας γενιάς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Η ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες στα βακτήρια του γένους *Salmonella*, κωδικοποιείται από οριζόντια μεταφορά γονιδίων β-λακταμασών. Στις Η.Π.Α., σε στελέχη *Salmonella* από ζωικής προέλευσης, τα γονίδια β-λακταμασών που βρέθηκαν συχνότερα είναι τα *blaTEM-1* και *blaPSE-1* (δηλαδή *blaCARB2*), που κωδικοποιούν ανθεκτικότητα στην αμπικιλλίνη, και το *blaCMY-2*, που κωδικοποιεί αντίσταση στην αμπικιλλίνη, τις κεφαλοσπορίνες 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς και είναι επίσης ανθεκτικό στους αναστολείς των β-λακταμασών (π.χ. αυτών που περιέχονται σε αντιβιοτικά όπως αμοξικιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ) (Frye and Jackson 2013). Σε παγκόσμιο επίπεδο, έχουν ανιχνευθεί και άλλες β-λακταμάσες, όπως *blaTEM, blaCTX-M, blaIMP, blaVIM, blaKPC, blaSHV,* και *blaOXA* και διάφορες παραλλαγές των γονιδίων αυτών που κωδικοποιούν ανθεκτικότητα στις ευρέος φάσματος β-λακτάμες ή δραστηριότητα καρβαπενεμάσης. Τα γονίδια ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες που ανιχνεύθηκαν σε στελέχη απομονωθέντα από ζώα από το NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System- CDC) ήταν τα εξής*: blaTEM-1, blaPSE-1,* και *blaCMY-2*.

Οι αναστολείς της οδού του φολικού οξέος, όπως είναι οι σουλφοναμίδες που αναστέλλουν το ένζυμο DHPS (dihydropteroate synthase) και η τριμεθοπρίμη που αναστέλλει το ένζυμο DHFR (dihydrofolate reductase) έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε παραγωγικά ζώα τόσο ως αυξητικοί παράγοντες αλλά και για τη θεραπεία των λοιμωδών νοσημάτων (π.χ. κολιβακίλλωση). Η ανθεκτικότητα στις σουλφοναμίδες αυτή επετεύχθη μέσω της απόκτησης γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που δεν δεσμεύουν αυτές τις ουσίες, όπως είναι τα sul1,sul2,sul3, και έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη *Salmonellae* παγκοσμίως (Frye and Jackson 2013). Ωστόσο, μελέτες στις Η.Π.Α., έχουν δείξει ότι η ανθεκτικότητα οφείλεται συχνότερα είτε στο *sul1* είτε στο *sul2* (Frye and Jackson 2013). Αντίστοιχα, η ανθεκτικότητα στην τριμεθοπρίμη κωδικοποιείται από τα γονίδια *dhfr, ordfr*, που επίσης έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη *Salmonellae* ζωικής προέλευσης από τις Η.Π.Α. (Frye *et al*. 2011). Η συνδυασμένη χρήση σουλφοναμιδών/τριμεθοπρίμης θεωρείτο ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για τις σαλμονελλώσεις από στελέχη ανθεκτικά σε άλλα αντιβιοτικά (Hohmann, 2001).

Όσον αφορά τις τετρακυκλίνες, που έχουν χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση αρθροποδογενών νοσημάτων (μπορρελίωση, ερλιχίωση, ρικετσίωση, τουλαραιμία), άλλων λοιμώξεων κυρίως του αναπνευστικού συστήματος (Mathers *et al*. 2011) (πνευμονία, βρουκέλλωση, λιστερίαση) σε παραγωγικά ζώα (Roberts

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

1996), αλλά και ως αυξητικοί παράγοντες, στοχεύουν στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος και αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση στο βακτηριακό κύτταρο. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε αυτές περιλαμβάνουν ενεργητική εκροή και αποβολή, τροποποίηση του rRNA στόχου και αδρανοποίηση του ενεργού συστατικού του φαρμάκου. Ωστόσο, η ενεργητική απέκκριση μέσω αντλιών ενεργητικής εκροής αποβολής είναι ο συχνότερος μηχανισμός και περιλαμβάνει τα γονίδια *tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(G)*, και *tet(H)*. Στις Η.Π.Α., τα γονίδια που ανιχνεύθηκαν περισσσότερες φορές από στελέχη *Salmonella* ζωικής προέλευσης είναι τα *tet(A), tet(B), tet(C), tet(D),* και *tet(G)* και ο ρυθμιστικος παράγοντας *tetR* (Frye *et al*. 2011, Glenn *et al*. 2011). Σύμφωνα με τα δεδομένα του NARMS, ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες παρατηρείται σε 16,9% των στελεχών *Salmonella* spp.από ανθρώπους και 34,9% αυτών από ζώα, λόγω της μακρόχρονης χρήσης της (Witte 2000, Chopra and Roberts 2001, Jones and Ricke 2003).

Οι κινολόνες και οι φθοριοκινολόνες είναι συνθετικά αντιβιοτικά, που χρησιμοποιούνται εδώ και δύο δεκαετίες με ευρύ φάσμα και χαμηλή τοξικότητα, χαρακτηριστικά που τις κατέστησαν ιδιαίτερα δημοφιλείς. Οι φθοριοκινολόνες που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στα παραγωγικά ζώα είναι οι εξής: ενροφλοξασίνη, διφλοξασίνη, μαρμποφλοξασίνη, ορμπιφλοξασίνη, δανοφλοξασίνη (Hopkins *et al*. 2005). Εκτός από τη θεραπεία λοιμώξεων των ζώων, οι ουσίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν και στην ιατρική του ανθρώπου, με αποτέλεσμα να εμφανιστούν βακτήρια ανθεκτικά σε αυτές, αφού ο μηχανισμός δράσης των φαρμάκων αυτών είναι κοινός σε ζώα και ανθρώπους (Nelson *et al*. 2007). Παραδείγματος χάριν, μετά την κυκλοφορία της ενροφλοξασίνης στην Ευρώπη και τη χρήση της στα παραγωγικά ζώα, παρατηρήθηκαν στελέχη *Campylobacter jejuni* ανθεκτικά στη σιπροφλοξασίνη, για τα οποία υπήρχε υποψία ότι μεταδόθηκαν μέσω του φαγητού, πράγμα που οδήγησε στην απόσυρση αυτών των σκευασμάτων από την Ε.Ε. (Endtz *et al*. 1991, Nelson *et al*. 2007).

Οι ουσίες αυτές δεσμεύονται και εμποδίζουν τη δράση ενζύμων που συμβάλλουν στην αντιγραφή του DNA, όπως οι τοποϊσομεράσες. Η ανθεκτικότητα σε αυτά τα αντιβιοτικά αποδίδεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα, δηλαδή τα γονίδια *gyrA, gyrB, parC* και *parE*. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις συμβαίνουν στην περιοχή *QRDR* (quinolone resistance determining region), που είναι μια συντηρημένη περιοχή. Η ανθεκτικότητα στο ναλιδιξικό οξύ (πρόδρομος των κινολονών) και στις φθοριοκινολόνες παρατηρείται πλέον

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

παγκοσμίως, επέρχεται μετά από μια κλιμακωτή διαδικασία πρόκλησης μεταλλάξεων στην περιοχή αυτή που καταλήγει στην παραγωγή ενζύμων με μια διαφορετική περιοχή-στόχο των κινολονών, όπου δε μπορούν αυτές να προσδεθούν (Chen *et al*. 2007). Ωστόσο, στις Η.Π.Α. έχει βρεθεί ότι σε στελέχη *Salmonella* spp. παρατηρούνται χαμηλότερα ποσοστά κάποιον μηχανισμών ανθεκτικότητας σε σύγκριση με αυτά της *E.coli (*Frye *et al*. 2011, Glenn *et al*. 2011).

Τα γονίδια ανθεκτικότητας συχνά βρίσκονται σε μεταθετά γενετικά στοιχεία, όπως είναι τα ενσωματόνια και τα μεταθετόνια. Η παρουσία τους σε μεταθετά γενετικά στοιχεία, όπως τα προαναφερθέντα και τα πλασμίδια διευκολύνει τόσο την έκφραση των γονιδίων αυτών όσο και την οριζόντια μεταφορά τους μεταξύ βακτηρίων (Folster *et al*. 2007, Frye *et al*. 2011). Παγκοσμίως, έχει παρατηρηθεί ότι τα στελέχη των *Salmonella* spp. διαθέτουν ποικιλία τέτοιων γενετικών στοιχείων (Carattoli 2003, 2009). Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί στις Η.Π.Α. σε στελέχη Salmonellae από παραγωγικά ζώα, έχει ταυτοποιηθεί συχνότερα η παρουσία πλασμιδίων και ενσωματονίων σε σχέση με άλλα γενετικά στοιχεία (Glenn *et al*. 2011, Johnson *et al*. 2011).

Επιπλέον, ανησυχία για την υγεία του ανθρώπου αποτελεί η ανάδυση πολυανθεκτικών στελεχών βακτηρίων, όπως είναι αυτά του ορότυπου *Salmonella* Typhimuriym, που προέκυψε από την εκλεκτική πίεση επιλογής λόγω της κατάχρησης αντιβιοτικών κατά τις προηγούμενες δεκαετίες (van Duijkeren *et al*. 2002, Canton and Morosini 2011). Οι πρακτικές που εφαρμόστηκαν στις κτηνοτροφικές μονάδες και στα είναι υπεύθυνες για το γεγονός αυτό, αφού η χορήγηση αντιβιοτικών γίνεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα παραγωγικά ζώα. Ο βαθμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι ανάλογος της εκτεταμένης έκθεσης των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, δηλαδή του συνολικού όγκου χρησιμοποιούμενων φαρμάκων, ενώ επηρεάζεται και από τους τρόπους χορήγησής τους (Canton and Morosini 2011). Επομένως, φαίνεται ότι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι αναπόφευκτη, αφού οι ίδιες κατηγορίες αντιβιοτικών χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα κατά των σαλμονελλώσεων ανθρώπων και ζώων (Joint FAO/OIE/WHO 2003). Σύμφωνα με την οδηγία “Food and Drug Administration Guidance 213” (FDA 2013), η μείωση της χρήσης αντιβιοτικών στα ζώα από τους κτηνιάτρους, ειδικά εκείνων που θεωρούνται «κρίσιμης σημασίας» για την ιατρική του ανθρώπου, είναι σημαντικό βήμα για τον περιορισμό της συχνότητας εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

1.6 Στόχος της μελέτης

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την απομόνωση στελεχών *Salmonella* spp. από σκύλους και τη διερεύνηση της ύπαρξης ανθεκτικότητας έναντι αντιβιοτικών στα στελέχη αυτά. Δεδομένου ότι υπάρχουν περιορισμένες αναφορές απομόνωσης *Salmonella* spp. από σκύλους σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το είδος αυτό θεωρείται ασυμπτωματικός φορέας του μικροοργανισμού, η διερεύνηση της ανθεκτικότητας των στελεχών αυτών σε αντιβιοτικά παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη Δημόσια Υγεία. Μετά την απομόνωση στελεχών *Salmonella* spp. σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (με βάση τα χαρακτηριστικά ανάπτυξής τους), σύμφωνα με το ISO 6579:2002, έγινε βιοχημική ταυτοποίησή τους και προσδιορισμός της ανθεκτικότητας, έναντι των σημαντικότερων αντιβιοτικών κάθε κατηγορίας με τη χρήση κατάλληλων δισκίων ευαισθησίας. Ανάλογα με το φαινότυπο στα αντιβιογράμματα, επιχειρήθηκε ανίχνευση και ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) και διερευνήθηκε η πιθανότητα να βρίσκονται σε μεταθετά γενετικά στοιχεία

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψίες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Διενεργήθηκαν δειγματοληψίες από 120 σκύλους, 80 δεσποζόμενους και 40 αδέσποτους από την περιοχή της Θεσσαλίας, της Ηπείρου και της Στερεάς Ελλάδας. Για κάθε σκύλο καταγράφηκε η ηλικία και το φύλο του καθώς και το είδος της διατροφής του (εμπορικά διαθέσιμη τροφή τύπου κονσέρβας ή τύπου ξηρής τροφής/ανθρώπινη τροφή/ ωμή τροφή). Η συλλογή των δειγμάτων έγινε με τη χρήση απλών αποστειρωμένων βαμβακοφόρων στειλεών (swabs), ειδικών για τη μεταφορά βιολογικού υλικού της εταιρείας Sarstedt. Με τον τρόπο αυτό, συλλέχθηκαν κόπρανα από 120 ζώα, τα οποία μεταφέρθηκαν άσηπτα σε 10 ml Buffered Peptone Water (BPW-Oxoid), όσο το δυνατό συντομότερα στο εργαστήριο για την περαιτέρω επεξεργασία τους.

2.2 Απομόνωση των *Salmonella* spp.

Η επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων έγινε μέσα σε 24 ώρες από τη συλλογή τους, σύμφωνα με το ISO 6579:2002, Annex D, το οποίο αφορά στην ανίχνευση *Salmonella* spp. σε κόπρανα ζώων. Η διαδικασία έγινε ως εξής: Τα δείγματα που είχαν ενοφθαλμιστεί σε Buffered Peptone Water (BPW) επώαστηκαν στους 37ºC για 18 ± 2 ώρες (μη εκλεκτικός προεμπλουτισμός). Από το υγρό του προεμπλουτισμού, 0,1 ml ενοφθαλμίστηκαν σε υπόστρωμα Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium (Biokar) και η επώαση έγινε στους 41,5ºC για 24± 3 ώρες.

Έπειτα, μικροοργανισμοί από το όριο της θολερής ζώνης του MSRV ενοφθαλμίστηκαν σε στερεά υποστρώματα, εκλεκτικά για *Salmonella* spp. Τα υποστρώματα αυτά ήταν το προτεινόμενο από το ISO Xylose-Lysine-Deoxycholate agar (XLD-Oxoid) και το *Salmonella-Shigella* agar (SS-Merck). Η επώαση γινόταν στους 37 ºC για 24 ± 3 ώρες. Μετά το στάδιο αυτό, οι αποικίες που ήταν ύποπτες για *Salmonella* spp. στα εκλεκτικά υποστρώματα, μεταφέρονταν σε Nutrient Agar και η επώαση γινόταν για 24 ώρες (Fort Richard Laboratories), ώστε να δημιουργηθούν καθαρές καλλιέργειες. Αν υπήρχαν ύποπτες αποικίες και από τα δύο εκλεκτικά στερεά υποστρώματα, μεταφέρονταν οι αποικίες από το XLD agar.

2.3 Συντήρηση των στελεχών *Salmonella* spp. (glycerol stocks)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Από τις καθαρές καλλιέργειες και μετά από επώαση 24 ωρών στους 37ºC στο στερεό υπόστρωμα Nutrient Agar, λήφθηκαν 4-5 αποικίες που ενοφθαλμίστηκαν σε 5 ml θρεπτικού ζωμού Brain Heart Infusion (BHI-Oxoid), όπου είχε προστεθεί και γλυκερόλη (Sigma-Aldrich) σε περιεκτικότητα 20%. Ακολούθησε επώαση αυτών στους 37ºC για 14-16 ώρες. Έπειτα, διανέμονταν το διάλυμα γλυκερόλης που περιείχε τις αποικίες σε 3 αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf 1,5 ml, ώστε να υπάρχουν διαθέσιμα 3 stock κάθε στελέχους και αυτά αποθηκεύτηκαν στους -80 ºC, μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία των απομονωθέντων στελεχών.

2.4 Βιοχημική και Ορολογική ταυτοποίηση των *Salmonella* spp.

Οι καθαρές καλλιέργειες που προέρχονταν από ύποπτες αποικίες των εκλεκτικών για *Salmonella* spp. υποστρωμάτων, ταυτοποίηθηκαν βιοχημικά με το εμπορικά διαθέσιμο API 20E MicrogenTM GNA+B-ID (Microgen Bioproducts Ltd). Από αυτά, όσα στελέχη ταυτοποίηθηκαν ως θετικά από τη δοκιμή με API, αποστάλθηκαν στο Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας, το οποίο είναι Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Σαλμονελλών και Μικροβιακής Αντοχής, όπου και έγινε οροταυτοποίηση με χρήση αντι-ορών και ταυτοποιήση σε επίπεδο στελέχους.

2.5 Έλεγχος ευαισθησίας/ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Τα στελέχη που αναγνωρίστηκαν ως *Salmonella* spp από το API 20E MicrogenTM GNA+B-ID και το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας, διερευνήθηκαν για την ανθεκτικότητα τους σε 11 αντιβιοτικά. Οι δοκιμές αυτές έγιναν με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων (μέθοδος Kirby-Bauer). Τα επιλεχθέντα αντιβιοτικά ήταν αντιπροσωπευτικά κάθε κατηγορίας των φαρμάκων αυτών και προτιμήθηκαν με βάση τη χρήση τους στην ιατρική και κτηνιατρική κλινική πράξη. Διενεργήθηκαν, λοιπόν, δοκιμές για τις εξής: αμπικιλλίνη (10 μg), αμοξικιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (20/10 μg), σουλφομεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (23,75/1,25 μg), κεφοταξίμη (30 μg), κεφταζιδίμη (30 μg), αζτρεονάμη (30 μg), γενταμυκίνη (10 μg), χλωραμφαινικόλη (30 μg), τετρακυκλίνη (30 μg), ναλιδιξικό οξύ (30 μg), ενροφλοξασίνη (5 μg).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Συνοπτικά, η διαδικασία έχει ως εξής: από τις καθαρές καλλιέργειες των *Salmonellae* spp. και μετά από 24ωρη επώαση σε υπόστρωμα Nutrient Agar λαμβάνονταν 2-3 αποικίες, οι οποίες τοποθετούνταν σε 5 ml στείρου υδατικού διαλύματος 0,8% NaCl , ώστε να δημιουργηθεί βακτηριακό εναιώρημα 0.5 της κλίμακας Mc Farland. Έπειτα, με έναν στείρο βαμβακοφόρο στειλεό, ο οποίος τοποθετούνταν στο εναιώρημα, γινόταν επίστρωση σε Mueller Hinton Agar (Biolife). Αμέσως μετά, γινόταν η τοποθέτηση των δισκίων ευαισθησίας σε αντιβιοτικά. Ακολουθούσε επώαση στους 37ºC για 24 ώρες και έπειτα γινόταν αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των αντιβιογραμμάτων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες των Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2011), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2013). Όσα στελέχη παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον τρεις από τις κατηγορίες των αντιβιοτικών θεωρήθηκαν πολυανθεκτικά (Multi – Drug – Resistant – MDR) (Schwartz et al 2010). Η αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων προσδιορίστηκε με βάση τη διάμετρο των ζωνών αναστολής, αφού μετρήθηκε σε χιλιοστόμετρα (mm).

2.6 Απομόνωση DNA των *Salmonella* spp.

Από τα στελέχη που είχαν συντηρηθεί σε stock γλυκερόλης, στους -80 ºC, έγινε ενοφθαλισμός με το μικροβιολογικό κρίκο σε στερεό υπόστρωμα Nutrient agar Broth (Fort Richard Laboratories) και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37ºC. Από τις καθαρές αυτές καλλιέργειες, ενοφθαλμίστηκαν μερικές αποικίες σε Nutrient Broth (Fort Richard Laboratories) και επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37ºC. Από το διάλυμα αυτό, χρησιμοποιήθηκε 1 ml, το οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 8000g για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο για την απομόνωση DNA από βακτήρια, του εμπορικά διαθέσιμου “Genomic DNA from tissue” kit της Macherey-Nagel, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Το DNA που απομονώθηκε, αποθηκεύτηκε στους -20 ºC, μέχρι να γίνουν οι περαιτέρω αναλύσεις.

2.7 Έλεγχος για την ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με τη χρήση PCR

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Ανάλογα με το φαινότυπο που έδειξαν τα στελέχη των *Salmonella* spp. στα κλασσικά αντιβιογράμματα, επιλέχθηκαν συγκεκριμένα γονίδια και περιοχές γενετικών στοιχείων ως στόχοι για ενίσχυση με τη μέθοδο PCR, ώστε να διερευνηθεί ποια γονίδια συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα, σε κάθε στέλεχος. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν ήταν τα εξής:

Α) Για τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες: *blaTEM-1, blaPSE-1*.

Β) Για τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας στις τετρακυκλίνες: *tetA, tetB, tetC, tetG*.

Γ) Για τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας στη σουλφομεθοξαζόλη: *sul1, sul2*

Δ) Για τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας στο ναλιδιξικό οξύ και την ενροφλοξασίνη: *gyrA* και *parC*

Αντίστοιχα, αλληλουχίες γενετικών στοιχείων που επιλέχθηκαν να ενισχυθούν είναι οι εξής:

Α) Για το ενσωματόνιο κλάσης 1: *int1*

Β) Για το *Salmonella* Genomic Island 1: *U7-L12* (στόχος: γονίδιο tdhf), *LJ-R1* (στόχος: γονίδιο int), *104RJ* (στόχος: γονίδιο S044), *C9-L* (στόχος: γονίδιο int2).

Οι εκκινητές για τα γονίδια ανθεκτικότητας επιλέχθηκαν με βάση τις μελέτες των Camarda *et al.* 2013, Reche *et al.* 2002, Wiuff *et al.* 2000 και φαίνονται στον εξής πίνακα (Πίνακας 2):

Primer	**Αλληλουχία (5΄-3΄)**	**Στόχος**	**Μέγεθος Προϊόντος (bp)**	**Αναφορά**
blaTEM-1- F	TGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG	*bla*$_{\text{TEM-1}}$	700	Camarda *et al.* 2013
blaTEM-1-R	AGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGA			
blaPSE-1-F	GGATTACAATGGCAATCAGCGCTTCC	*bla*$_{\text{PSE-1}}$	658	Camarda *et al.* 2013
blaPSE-1-R	AATCGCATCATTTCGCTCTGCCATTG			
tetA-F	GTAATTCTGAGCACTGTCGC	*tet*A	957	Camarda *et al.* 2013
tetA-R	CTGCCTGGACAACATTGCTT			
tetB-F	CAGG-TTATCTTTGCTCCTTGGCTTGG	*tet*B	1014	Camarda *et al.* 2013
tetB-R	TTGAGGGGTTAACATGAAGGTCATCG			
tetC-F	GGATATCGTCCATTCCGACAGCATCG	*tet*C	745	Camarda

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

tetC-R	GATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAAC			*et al*. 2013
tetG-F	GAGCCGCAGTCGATTACACGATTATG	*tet*G	680	Camarda
tetG-R	CAACAGAATCGGGAACACCATCCATC			*et al*. 2013
sul1-F	TCGGCATTCTGAATCTCACCGAGGAC	*sul1*	786	Camarda
sul1-R	AAATTTCGCGAGGGTTTCCGAGAAGG			*et al*. 2013
sul2-F	GACAGTTTCTCCGATGGAGGCCGGTA	*sul2*	700	Camarda
sul2-R	GTGTGCGGATGAAGTCAGCTCCACCT			*et al*. 2013
gyrA-1	GGTACACCGTGCCGTACTTT	*gyrA*	312	Reche *et*
gyrA-2	CGAAATCCACCGTC			*al*. 2002

Οι εκκινητές για τα ενσωματόνια και τα γονιδιωματικά νησιά φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3):

Primer	**Αλληλουχία**	**Στόχος**	**Μέγεθος Προϊόντος (bp)**	**Αναφορά**
int1- F	CGAACCGAACAGGCTTATGTCCACTG	*intI-1*	838	Camarda
int1-R	CATCGTCGTAGAGACGTCGGAATGG			*et al*. 2013
U7-L12	ACACCTTGAGCAGGGCAAAG	*tdhF*	500	Camarda
LJ-R1	AGTTCTAAAGGTTCGTAGTCG	*int*		*et al*. 2013
104-RJ	TGACGAGCTGAAGCGAATTG	S044	515	Camarda
C9-L	AGCAAGTGTGCGTAATTTGG	*int2*		*et al*. 2013

Για τα όλα τα γονίδια εκτός των *gyrA* και *parC*, η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit KAPA Taq PCR της εταιρίας KAPA BIOSYSTEMS σε τελικό όγκο 25μl, σύμφωνα με το πρωτόκολλο: 5X PCR buffer, 200 μM από κάθε dNTP, 0,5 μM από κάθε εκκινητή, 2,5 mM από $MgCl_2$, 2 U Taq Polymerase και 2,5 μl από το DNA προς εξέταση.

Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε είναι, το εξής:

-αρχικά, στους 94 ºC για 5 λεπτά,

- 94 ºC για 1 λεπτό/ 56 ºC για 30 δευτερόλεπτα/ 72 ºC για 1 λεπτό, και επανάληψη για 30 κύκλους

- τελική επιμήκυνση στους 72 ºC για 10 λεπτά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Για το γονίδιο *gyrA*, η PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Ex Taq DNA Polymerase της εταιρείας Takara/ClonTech και του αντίστοιχου ExTaq Buffer και dNTPs σε τελικό όγκο 25 μl, σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο: 10X Ex Taq PCR Buffer, 200 μM από κάθε dNTP, 0,5 μM από κάθε εκκινητή και 2,5 μl από το DNA προς εξέταση. Το πρόγραμμα της PCR ήταν το ίδιο με αυτό που ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα γονίδια.

2.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Μετά το πέρας της μεθόδου της PCR, έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης (Nippon Genetics Europe) (1-2% w/v) και χρήση διαλύματος Tris-Boric-EDTA 1X. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων με βάση τον προσδιορισμό των βάσεων σε σύγκριση με κατάλληλο μάρτυρα αναφοράς (100 bp ladder) της εταιρείας Nippon Genetics Europe

2.9 Καθαρισμός και αλληλούχηση των προϊόντων της PCR

Μετά την ηλεκτροφόρηση, έγινε καθαρισμός των προϊόντων της PCR είτε απευθείας από το πήκτωμα αγαρόζης είτε από την αντίδραση της PCR ώστε να αποσταλούν για αλληλούχηση. Ο καθαρισμός έγινε με εμπορικά διαθέσιμο kit και σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (PCR clean-up Gel Extraction Kit – Macherey-Nagel). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA έγινε φασματοφωτομετρικά (260nm). Έπειτα, τα προϊόντα της PCR στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρία CeMIA SA (Λάρισα).

2.10 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, επεξεργάστηκαν στον υπολογιστή με τα προγράμματα Chromas version 1.45 (Conor McCarthy School of Health Science,Griffith University,Gold Coast Campus, Southport, Queensland Australia)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

και Gene Runner 4.0. Έπειτα, έγινε σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες με τη χρήση του Nucleotide BLAST για την εύρεση αλληλουχιών με το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας, μετά από ομοπαράθεση.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση των στελεχών *Salmonella* spp.

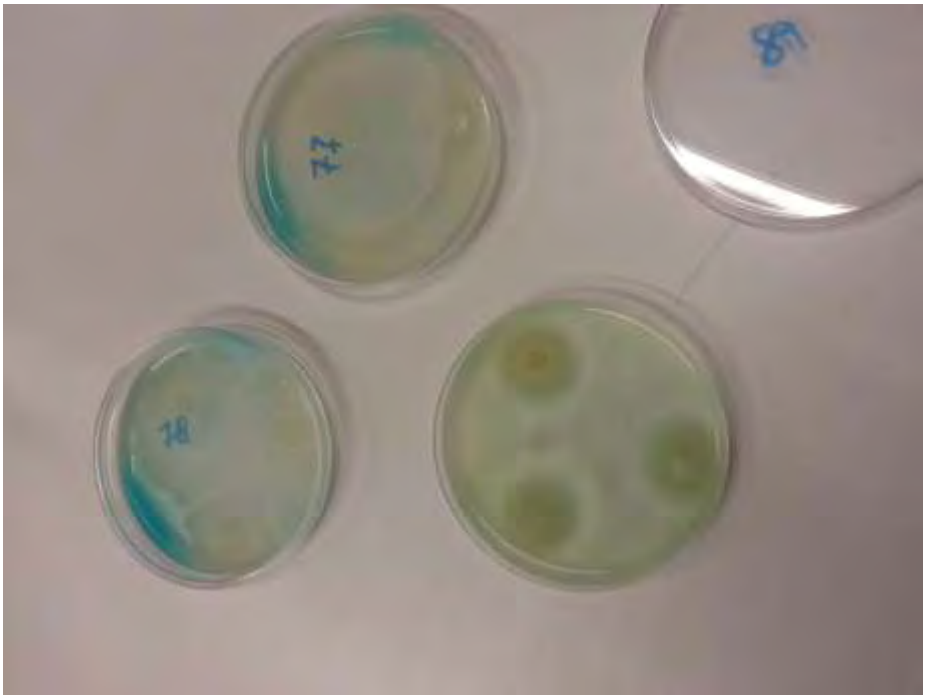
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Η αξιολόγηση των υπόπτων αποικιών σύμφωνα με το ISO 6579:2002, Annex D, καθώς και με βάση τις οδηγίες των παρασκευαστών των επιλεγμένων θρεπτικών υποστρωμάτων έγινε σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4):

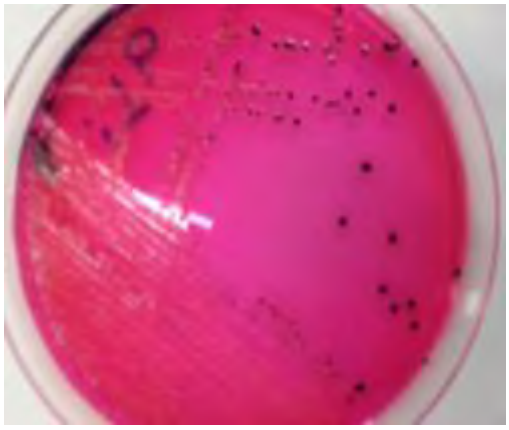
Υπόστρωμα	**Εμφάνιση αποικιών και υποστρωμάτων κατά την απομόνωση των *Salmonella* spp.**
MSRV	Οι κινητές *Salmonellae* δίνουν αποικίες που χαρακτηρίζονται από αδιαφανείς ζώνες θολερότητας διαμέτρου ≥ 30 mm. Χρώμα υποστρώματος: κυανοπράσινο αρχικά που μετατρέπεται σε λευκό.
XLD	Ερυθρές αποικίες με μαύρα κέντρα (συνήθως). Το χρώμα του υποστρώματος από ερυθρό γίνεται βαθύτερο ερυθρό.
SS	Αχυρόχρωμες αποικίες (λακτόζη αρνητικές) με μαύρα κέντρα. Χρώμα υποστρώματος από ερυθρό σε χρώμα αχύρου.
Παραγωγή H_2S	Αποικίες με μαύρο κέντρο στα XLD και SS agar.

Από τις καλλιέργειες 120 δειγμάτων κοπράνων που έγιναν στα στερεά εκλεκτικά υποστρώματα, προέκυψαν 17 στελέχη που παρουσίαζαν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σύμφωνα με την εικόνα που περιγράφεται στον πίνακα, δηλαδή συμβατά με την εικόνα των *Salmonellae* spp. Από αυτά, 12 στελέχη ως *Salmonella* spp.ταυτοποίηθηκαν με τη χρήση της εμπορικά διαθέσιμης δοκιμής API MicrogenTM GNA+B-ID, ενώ τα άλλα πέντε δεν ταυτοποιήθηκαν ως *Salmonella* spp., αλλά ως άλλα γένη εντεροβακτηρίων και προέρχονταν από 12 διαφορετικούς σκύλους από την περιοχή της Θεσσαλίας και της Ηπείρου.

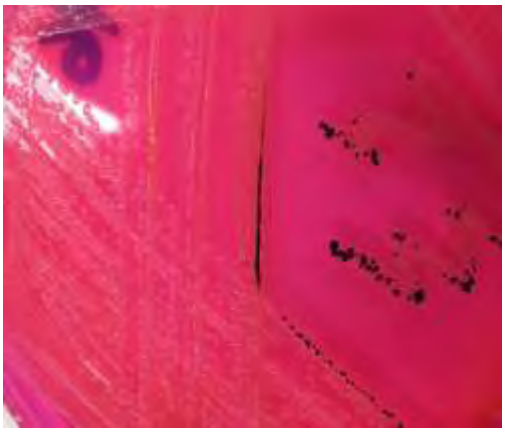
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79



Εικόνα 1:Καλλιέργειες βακτηριακών στελεχών στο MSRV άγαρ. Τα δύο δείγματα στα αριστερά με σήμανση 77,78 δεν έδωσαν αποτέλεσμα φαινοτυπικά συμβατό με *Salmonella* spp. στα εκλεκτικά υποστρώματα (δεν αποχρωματίστηκε το υπόστρωμα), ενώ το δείγμα στα δεξιά με σήμανση 89, έδωσε θετικό αποτέλεσμα (πλήρης αποχρωματισμός του υποστρώματος) που οροταυτοποιήθηκε ως *S.* Infantis.



A



B

Εικόνες 2,3: Καλλιέργειες στο XLD άγαρ. Τα δύο δείγματα (A,B) έδωσαν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (παράγωγη υδρόθειου-αποικία με μαύρο κέντρο) συμβατά με *Salmonella* spp.
στα εκλεκτικά υποστρώματα και ταυτοποίηθηκαν από το API Microgen TM GNA+B-ID ως *Salmonella* spp., και οροταυτοποίηθηκαν ως *S.* Typhimurium και *S.* Infantis αντίστοιχα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

3.2 Οροταυτοποίηση των *Salmonella* spp.

Η οροταυτοποίηση των στελεχών αποτελεί μέθοδο αναφοράς (golden standard) για την ταυτοποίηση των στελεχών *Salmonella* spp. Από τα 12 στελέχη που αρχικά ταυτοποιήθηκαν με το API, τελικά οροταυτοποιήθηκαν εννιά στελέχη. Αυτά ανήκουν στους εξής ορότυπους: δύο στελέχη αναγνωρίστηκαν ως *S.* Infantis (που είχαν λάβει κωδικό δείγματος εργαστηρίου ως 89 και 96), δύο ως *S.* Typhimurium (με κωδικό εργαστηρίου 6 και 91), δύο ως *Salmonella bongori* 61:z35:- (με κωδικό εργαστηρίου 134,135), και από ένα στέλεχος ως μονοφασική *S. enterica* subsp. *enterica* 6,7: k:- (με κωδικό εργαστηρίου 5), *S.* Thompson (με κωδικό εργαστηρίου 83) και *S.* Anatum (με κωδικό εργαστηρίου 99).

3.3 Αποτελέσματα δοκιμών ελέγχου ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

Τα εννέα στελέχη που αναγνωρίστηκαν ως στελέχη *Salmonellae* spp. και με τη χρήση του Microgen TM GNA+B-ID και με τη μέθοδο της οροταυτοποίησης με χρήση αντι-ορών στο Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας διερευνήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα τους σε 11 αντιβιοτικά και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5):

	Αντιβιοτικά – Ζώνη Αναστολής (mm)										
Στελέχη	GN	CTX	AMC	CAZ	SXT	C	NA	TE	AMP	AZT	ENR
S. enterica subsp. *enterica* 6,7: k:- **(5)**	19	30	25	24	25	28	17	16	24	31	22
S. Typhimurium **(6)**	23	39	26	28	28	24	23	17	25	29	14
S. bongori 61:z35:- **(134)**	24	38	30	35	29	29	27	24	29	34	13
S. bongori 61:z35:- **(135)**	24	35	30-	33	28	27	25	21	29	37	13
S. Thompson **(83)**	23	31	25	37	26	28	17	17	24	32	22

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

S. Infantis **(89)**	24	33	25	29	18	21	0	0	22	34	16
S. Typhimurium **(91)**	24	35	21	25	0	27	24	0	0	33	14
S. Infantis **(96)**	25	30	25	26	24	22	0	0	21	30	17
S.anatum **(99)**	24	35	27	29	35	29	10	16	24	33	14

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ανθεκτικότητας στελεχών *Salmonella* spp. στα αντιβιοτικά. GN γενταμυκίνη, CTX κεφοταξίμη, AMC αμοξικιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ, CAZ κεφταζιδίμη, SXT σουλφομεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη, C χλωραμφαινικόλη, NA ναλιδιξικό οξύ, TE τετρακυκλίνη, AMP αμπικιλλίνη, AZT αζτρεονάμη, ENR ενροφλοξασίνη. Οι αριθμοί που σημειώνονται με κόκκινο ως ζώνη αναστολής υποδηλώνουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, σύμφωνα τα καθιερωμένα πρότυπα ανθεκτικότητας.

Από τα αποτελέσματα αυτά, προκύπτει ότι τα δύο στελέχη της *S.* Infantis (στελέχη 89 και 96) είναι ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη, στο ναλιδιξικό οξύ και την ενροφλοξασίνη, ένα στέλεχος *S.* Typhimurium (στέλεχος 91) είναι ανθεκτικό στη σουλφαμεθαξαζόλη/τριμεθοπρίμη, στην τετρακυκλίνη, στην αμπικιλλίνη και την ενροφλοξασίνη, ενώ το στέλεχος S. Anatum (στέλεχος 99) είναι ανθεκτικό στο ναλιδιξικό οξύ και την ενροφλοξασίνη. Από τα υπόλοιπα στελέχη, φάνηκε ότι ένα στέλεχος *S.* Typhimurium (6), δύο στελέχη *S.* bongori (134,135) και ένα στέλεχος *S.* Thompson (83) ήταν ανθεκτικά στην ενροφλοξασίνη. Η εύρεση του στελέχους *S.* Typhimurium (91) που εμφανίζει πολυανθεκτικότητα (στέλεχος Multi Drug Resistant) σε ασυμπτωματικό σκύλο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η συχνότητα εμφάνισης MDR στελεχών *Salmonellae* έχει αυξηθεί παγκοσμίως (Wright et *al.* 2005) και σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα, παρατεταμένη νοσηλεία και αυξημένη θνησιμότητα, όταν προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο σε σύγκριση με ευαίσθητα στα αντιβιοτικά στελέχη (Martin et *al.* 2004, Helms et *al.* 2004, Varma *et al.* 2005). Είναι φανερό ότι η παρουσία του πολυανθεκτικού στελέχους *S.* Typhimurium (91) σε ασυμπτωματικό σκύλο, ένα ζωικό είδος που ζει σε στενή επαφή με τον άνθρωπο, καθιστά το στέλεχος αυτό πολύ σημαντικό για τη Δημόσια Υγεία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

3.4 Αποτελέσματα της αλυσίδωτης αντίδρασης πολυμεράσης για τα γονίδια ανθεκτικότητας

Στελέχη	Γονίδια Ανθεκτικότητας – PCR Products σε bp								
	tetA	*tetB*	*tetC*	*tetG*	bla_{TEM-1}	bla_{PSE-1}	*sul1*	*sul2*	*gyrA*
S. enterica subsp. *enterica* 6,7: k:- **(5)**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Typhimurium **(6)**	-	-	-	-	-	-	-	-	Θ (313)
S. bongori 61:z35:- **(134)**	-	-	-	-	-	-	-	-	Θ (313)
S. bongori 61:z35:- **(135)**	-	-	-	-	-	-	-	-	Θ (313)
S. Thompson **(83)**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Infantis **(89)**	Θ (957)	A	A	A	-	-	-	-	Θ (313)
S. Typhimurium **(91)**	Θ (957)	Θ (1014)	Θ (745)	A	Θ (700)	Θ (658)	Θ (786)	A	Θ (313)
S. Infantis **(96)**	Θ (957)	A	Θ (745)	A	-	-	-	-	Θ (313)
S.anatum **(99)**	-	-	-	-	-	-	-	-	Θ (313)

Πίνακας 6: Φαίνονται τα αποτελέσματα της ενίσχυσης με PCR για κάθε γονίδιο από κάθε στέλεχος. Ο συμβολισμός Θ δείχνει ότι έχουμε πάρει προϊόν ενίσχυσης της PCR στο συγκεκριμένο γονίδιο, Α: αρνητικό αποτέλεσμα PCR για το συγκεκριμένο γονίδιο, ενώ η παύλα (-) δείχνει ότι δεν έχει γίνει η συγκεκριμένη αντίδραση γιατί η εικόνα δε συνάδει με το αντιβιογράμμα.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται ως εξής:

Α) Στο στέλεχος της *S.* Infantis με κωδικό 89, που εμφάνισε ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, το ναλιδιξικό οξύ και την ενροφλοξασίνη, ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR τμήμα του γονίδιου *tetA* 957 βάσεων. Μετά από αλληλούχηση και ανάλυση 909 βάσεων, με τη βοήθεια των προγραμμάτων Chromas, Generunner και Nucleotide BLAST, βρέθηκε ότι το προϊόν της PCR παρουσιάζει 100% ομοιότητα με γονίδιο αντλίας εκροής της τετρακυκλίνης στελέχους *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (expression vector p efflux MFS transporter SY7K *tetA*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

gene για την αντλία εκροής τετρακυκλίνης). Επιπλέον, ενισχύθηκε τμήμα του γονίδιου της γυράσης και μετά από ανάλυση 271 βάσεων προέκυψε 99,6% ομοιότητα με το γονίδιο της υπομονάδας Α της γυράσης στελέχους SH11G104 του οροτύπου *Salmonella* Choleraesuis.

Β) Στο στέλεχος της *S.* Infantis με κωδικό 96 που παρουσίαζε ανθεκτικότητα στα ίδια αντιβιοτικά ενισχύθηκαν προϊόντα για τα γονίδια *tetA* και *tetC* (957 και 745 βάσεις αντίστοιχα). Μετά την αλληλούχηση και την επεξεργασία της αλληλουχίας 506 βάσεων διαπιστώθηκε ότι το προϊόν της PCR για την ενίσχυση του *tetA,* παρουσίαζε ομοιότητα κατά 99,8% με γονίδιο αντλίας εκροής *tetA* του στελέχους *Salmonella* Kentucky 01-2100- (tetracycline resistance MFS efflux pump).

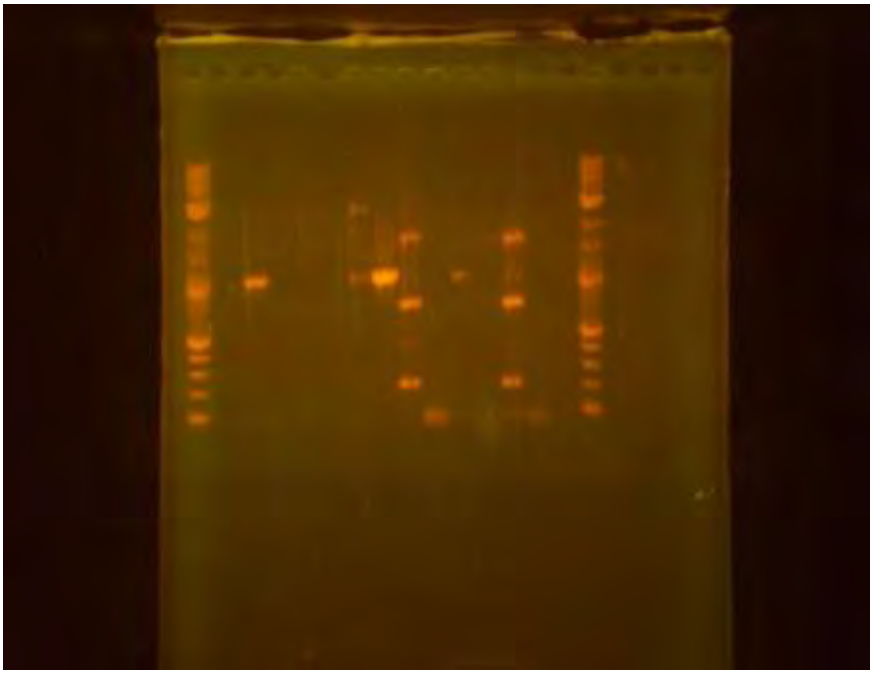
Γ) Όσον αφορά το στέλεχος της S. Typhimurium με κωδικό 91 που έδειξε ανθεκτικότητα στη σουλφαμεθαξαζόλη/ τριμεθοπρίμη, στην τετρακυκλίνη, στην αμπικιλλίνη και την ενροφλοξασίνη, δηλαδή σε τέσσερις κατηγορίες αντιβιοτικών και θεωρείται πολυανθεκτικό (MDR), ενισχύθηκαν προϊόντα για τα γονίδια *tetA, tetB, tetC, blaTEM-1,* και *sul1* (957, 1014, 745, 700, 786 βάσεις αντίστοιχα). Μετά από αληλλούχηση και ανάλυση 811 βάσεων, προέκυψε ότι το προϊόν της PCR που αντιστοιχεί στο *tetB* παρουσίαζε 100% ομοιότητα με την περιοχή ανθεκτικότητας *tetB* του στελέχους *Salmonella enterica* στέλεχος B71 που βρίσκεται στο πλασμίδιο pB71. Ακόμα, το προϊόν που αντιστοιχεί στο *sul1* (597 βάσεων) παρουσίαζε 100% ομοιότητα με το *sul1* γονίδιο της *Salmonella enterica* στέλεχος SRC4 που βρίσκεται στο *SGI-1*. Αντίστοιχα, το προϊόν που αντιστοιχεί στο $bla_{\text{TEM-1}}$, μετά από ανάλυση 617 βάσεων εμφάνιζε 99,5% ομοιότητα με $bla_{\text{TEM-1}}$ γονίδιο για β-λακταμάση που προερχόταν από βακτήριο *E. coli*.

Δ) Σχετικά με τα στελέχη που βρέθηκαν ανθεκτικά στο ναλιδιξικό οξύ (δύο στελέχη *S.* Infantis-89, 96) και την ενροφλοξασίνη (δύο στελέχη *S.* Typhimurium-6,91, δύο *S.* bongori-134,135, δύο *S.* Infantis-89,96 και ένα στέλεχος *S.* Anatum-99) ενισχύθηκαν προϊόντα για τα γονίδια *gyrA* (313 βάσεις) των οποίων οι σημειακες μεταλλάξεις πολλές φορές καταλήγουν σε ανθεκτικότητα στις κινολόνες και το ναλιδιξικό οξύ. Μετά την αλληλούχηση και την επεξεργασία δύο προϊόντων από τα γονίδια *gyrA* των στελεχών με κωδικό 134,135 βρέθηκε για το στέλεχος 134 από αυτά 99,6% ομοιότητα με την υπομονάδα Α του γονιδίου της γυράσης του στελέχους strain SC67 της *Salmonella enterica* subsp. *enterica* μετά από ανάλυση 273 βάσεων. Παρομοίως, για το στέλεχος 135 βρέθηκε 100% με την υπομονάδα Α του γονιδίου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

της γυράσης της *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Java στέλεχος NCTC5706, μετά από ανάλυση 256 βάσεων.

Ε) Τέλος, ενισχύθηκαν με τη μέθοδο PCR προϊόντα για το ενσωματόνιο κλάσης 1 (*int1*-838 βάσεις) στα τρία στελέχη *Salmonella* με κωδικό 89,91,96, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αυτά τα στελέχη εδράζονται σε μεταθετό γενετικό στοιχείο (ενσωματόνιο κλάσης 1). Αντιθέτως, για τα γονίδια ανθεκτικότητας *tetG* (ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη), *sul2* (ανθεκτικότητα στη σουλφομεθαξαζόλη/τριμεθοπρίμη) δεν ενισχύθηκαν προϊόντα σε κανένα στέλεχος, μετά την PCR.



Εικόνα 4: Ενδεικτικά αποτελέσματα της PCR για τα γονίδια *tetA, tetB, tetC, tetG*. Με τη σειρά, τα δείγματα: μάρτυρας αναφοράς, αρνητικό μάρτυρας, 89A (δηλαδή το στέλεχος 89 με το ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο *tetA*), 89B (στέλεχος 89 με ζεύγος εκκινητών για το γονίδιων tetB, κ.ο.κ.), 89C,89G, 91A, 91B, 91C,91G, 96A, 96B, 96C, 96G και τέλος αρνητικό μάρτυρας και μάρτυρας αναφοράς. Μέγεθος προϊόντων που περιμένουμε: *tetA*: 957, *tetB:* 1014, *tetC*: 745, *tetG*:680.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι λοιμώξεις από βακτήρια του γένους *Salmonella* spp. είναι μία από τις κυρίοτερες αιτίες γαστρεντερίτιδων στην Ευρώπη, όπως και στην Ελλάδα (ECDC 2014). Πολλά είδη της άγριας πανίδας αλλά και κατοικίδια ζώα αποτελούν δεξαμενές των *Salmonellae*. Στην Ελλάδα, δεξαμενή του παθογόνου αυτού, θεωρούνται κυρίως οι εκτρεφόμενοι χοίροι και τα εκτρεφόμενα ορνίθια (Evangelopoulou *et al.* 2014, Papadopoulos *et al*. 2016). Είναι γεγονός, όμως, ότι στελέχη του παθογόνου αυτού κυκλοφορούν μέσω της τροφικής αλυσίδας, προερχόμενα από πολλές και διαφορετικές δεξαμενές (Papadopoulos *et al*. 2016). Αυτό υποδηλώνει ότι ενδεχομένως υπάρχουν άλλα ζωικά είδη που φιλοξενούν το μικροοργανισμό, αποτελώντας δεξαμενή ζωονοτικών στελεχών των *Salmonella* spp. και στην Ελλάδα, χωρίς κάτι τέτοιο να έχει διερευνηθεί.

Οι σκύλοι αποτελούν ζωικό είδος που διαβεί σε στενή επαφή με τον άνθρωπο και αλληλεπιδρά με αυτόν, τόσο σε αστικές όσο και σε αγροτικές περιοχές. Στις τελευταίες, οι σκύλοι έρχονται σε επαφή και με πολλά άλλα ζωϊκά είδη, αφού οι ιδιοκτήτες τους πολλές φορές τους χρησιμοποιούν και ως σκύλους φύλαξης κτηνοτροφικών μονάδων ή ως ιχνηλάτες κατά το κυνήγι, πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα η διατροφή τους να διαφέρει από αυτούς που ζουν σε αστικά κέντρα και ακολουθούν βιομηχανοποιημένες δίαιτες. Άλλωστε, τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μια όλο και πιο δημοφιλής τάση διατροφής των σκύλων με ωμό κρέας ή οστά ανάμεσα σε αρκετούς ιδιοκτήτες (Nilsson 2015), κάτι που στην Ελλάδα έχει υιοθετηθεί και για οικονομικούς λόγους σε αρκετές αγροτικές περιοχές. Η τάση αυτή όμως έχει κατακριθεί κάποιες φορές λόγω των κινδύνων μεταφοράς επικίνδυνων παθογόνων για τη Δημόσια Υγεία (Joffe and Schlesinger 2002, Nilsson 2015). Είναι, λοιπόν, εμφανής η σημασία διερεύνησης της ύπαρξης στελεχών *Salmonella* spp. σε σκύλους στην Ελλάδα.

Στην παρούσα εργασία, συλλέχθηκαν 120 δείγματα κοπράνων ασυμπτωματικών σκύλων, από τις περιοχές της Θεσσαλίας, της Ηπείρου και της Στερεάς Ελλάδας. Αυτά εξετάστηκαν με κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους, σύμφωνα με το ISO 6579:2002, Annex D, σε εκλεκτικά υποστρώματα και προέκυψαν 17 στελέχη που παρουσίαζαν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, παρόμοια με αυτά των *Salmonellae* spp. Σε αυτά διεξήχθη βιοχημική δοκιμή API Microgen TM GNA+B-ID, η οποία αναγνώρισε ως *Salmonella* spp. 12 από αυτά, ενώ τα υπόλοιπα πέντε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

αναγνωρίστηκαν ως διαφορετικά στελέχη Εντεροβακτηριοειδών. Τα 12 αυτά στελέχη στάλθηκαν στα Κτηνιατρικά Εργαστήρια Χαλκίδας για οροταυτοποίηση, που αποτελεί και τη μέθοδο αναφοράς των *Salmonella* spp., όπου ταυτοποίηθηκαν εννέα στελέχη, και προέρχονταν από εννέα διαφορετικούς σκύλους από την περιοχή της Θεσσαλίας και της Ηπείρου.

Εν συνεχεία, διερευνήθηκε η ανθεκτικότητά των στελεχών αυτών σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Η εκλογή των αντιβιοτικών έγινε με βάση τη χρήση τους στην ιατρική και κτηνιατρική κλινική πράξη. Έγιναν αντιβιογράμματα, σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων (μέθοδος Kirby-Bauer). Τρία στελέχη (89,91,96) παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά, δηλαδή τα δύο στελέχη *S.* Infantis (89 και 96) παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε τετρακυκλίνη, ναλιδιξικό οξυ και ενροφλοξασίνη, ενώ το στέλεχος 91 *S.* Typhimurium έδειξε ανθεκτικότητα σε τέσσερις κατηγορίες αντιβιοτικών (σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη/ αμπικιλλίνη/ τετρακυκλίνη/ ενροφλοξασίνη) και θεωρείται πολυανθεκτικό στέλεχος (MDR)-στέλεχος 91, με ιδιαίτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία. Επίσης, επτά από τα εννέα στελέχη (6,134,135,89,91,96,99) παρουσίασαν ανθεκτικότητα έναντι της ενροφλοξασίνης, ενός αντιβιοτικού που προτείνεται να χορηγείται σε ζώα μόνο μετά από αντιβιόγραμμα (όπως και όλες οι κινολόνες), και διαπίστωση ανθεκτικότητας σε άλλα αντιβιοτικα, ως φάρμακο τελευταίας επιλογής (φύλλο οδηγιών Bayer για την ενροφλοξασίνη). Αυτή η οδηγία δίνεται ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων στις κινολόνες που μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με άλλες φθοροκινολόνες λόγω πιθανής διασταυρούμενης ανθεκτικότητας. Ακόμη, προτείνεται να λαμβάνονται προφυλάξεις από το άτομο που χορηγεί το σκεύασμα σε ζώα.

Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα των αντιβιογραμμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR για την ενίσχυση τμήματων γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητας έναντι κάθε αντιβιοτικού, σε απομονωθέν DNA των στελεχών 89,96,91 (δύο *S.* Infantis και το MDR *S.* Typhimurium, αντίστοιχα). Για την ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, ο συχνότερα παρατηρούμενος μηχανισμός ανθεκτικότητας στα στελέχη των *Salmonellae*, είναι η ενεργητική απέκκριση μέσω αντλιών εκροής και τα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτόν το μηχανισμό περιλαμβάνουν τα *tetA, tetB, tetC, tetD, tetG,* και *tetH*, εκ των οποίων συχνότερα ανιχνεύονται τα *tetA, tetB, tetG,* ενώ λιγότερα συχνά τα *tetC, tetD* (Michael *et al*. 2006, Thaker, *et al*. 2010). Στα στελέχη της παρούσας μελέτης, ανιχνεύθηκε το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

γονίδιο *tetA* στα δύο στελέχη των *S*. Infantis (89, 96), καθώς και το γονίδιο *tetB* στο πολυανθεκτικό στέλεχος *S*. Typhimurium (91). Από προηγούμενες μελέτες, φαίνεται ότι η ανίχνευση του *tetA* γίνεται συχνότερα σε στελέχη *Salmonella* spp. σε αντίθεση με την εύρεση των *tetB* γονιδίων που είναι σπανιότερη (Thai *et al*. 2012, Camarda *et al*. 2013). Η εύρεση ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη των τριών στελεχών (89,91,96) είναι ιδιαιτέρως ανησυχητική, αφού η τετρακυκλίνη βρίσκεται στη λίστα με τις «Υψηλής Σημασίας για την Ανθρώπινη Υγεία Αντιμικροβιακές Ουσίες» (Highly Important Antimicrobials for Human Health – WHO,2011).

Επίσης, βρέθηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας *sul1*, στο πολυναθεκτικό στέλεχος *S*. Typhimurium (91), το οποίο ανιχνεύεται συχνά σε στελέχη ανθεκτικά σε σουλφοναμίδες. Η ανθεκτικότητα στις σουλφοναμίδες/τριμεθοπρίμη οφείλεται σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα μη ευαίσθητα στις ουσίες αυτές , όπως τα *sul1*, *sul2*, και *sul3* συναντώνται σε στελέχη *Salmonella* spp. παγκοσμίως (Frye and Jackson 2013).Τα γονίδια *sul1* και *sul2* συνήθως βρίσκονται στο *SGI-1* (*Salmonella Genomic Island 1*) των *Salmonellae* (Matayoshi *et al*. 2015), ενώ το γονίδιο *sul1* έχει συσχετιστεί με το ενσωματόνιο κλάσης 1 σε πρόσφατη μελέτη (De Vito *et al*. 2015). Ακόμα, ενισχύθηκε με PCR τμήμα του γονιδίου *blaTEM-1* στο ίδιο στέλεχος, ένα από τα πιο συχνά ανιχνευθέντα γονίδια που κωδικοποιούν μια β-λακταμάση , δημιουργώντας ανθεκτικότητα στην αμπικιλλίνη, όπως παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη (Frye and Jackson 2013). Είναι εμφανές ότι η ανθεκτικότητα στα κλασσικά αντιβιοτικά όπως οι τετρακυκλίνες, οι σουλφοναμίδες και η αμπικιλλίνη καθώς και η εύρεση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αυτά, αποτελούν ανησυχητικό γεγονός για τη Δημόσια Υγεία, αφού περιορίζουν τις θεραπευτικές επιλογές σε ζώα, ενώ σε αρκετές περιοχές χρησιμοποιούνται ακόμη για τον άνθρωπο λόγω χαμηλού κόστους και διαθεσιμότητας (Adesiji et al. 2014). Επιπλέον, η εύρεση πιθανών μεταλλάξεων στο γονίδιο της γυράσης σε τρία στελέχη, ανθεκτικά στην ενροφλοξασίνη (89,134,135) αποτελεί ένδειξη ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό, δημιουργεί ανθεκτικά βακτήρια στην ενροφλοξασίνη.

Τα πολυανθεκτικά αυτά στελέχη θεωρούνται μεγάλο πρόβλημα από την άποψη της Δημόσιας Υγείας, αφού όταν απομονώνονται από ανθρώπινα κρούσματα, συνδέονται με παρατεταμένη περίοδο νοσηλείας, συστημική λοίμωξη και κυρίως αποτυχία της θεραπευτικής, αγωγής (Varna et *al*. 2005, Crump et *al*. 2011). Μεγάλη ανησυχία προκαλεί, επίσης η παγκόσμια εξάπλωση του συχνά πολυανθεκτικού οροτύπου *Salmonella* Typhimurium - phage type DT104 σε ανθρώπους και ζώα, από

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

τη δεκαετία του 1990 και μετά (Lee and Lee 2007). Η κατάχρηση των αντιβιοτικών, μέσω της επιλεκτικής πίεσης, έχει αντίκτυπο στα γονίδια ανθεκτικότητας, τα οποία μπορούν να διατηρούνται στο βακτηριακό γονιδίωμα για δεκαετίες (Sommer and Dantas 2011)

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η απομόνωση αυτών των στελεχών από ασυμπτωματικούς σκύλου για πρώτη φορά στην Ελλάδα, τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη Δημόσια Υγεία, αφού οι σκύλοι αποτελούν ζωικό είδος που διαβιούν σε στενή επαφή και αλληλεπιδρούν με τον άνθρωπο. Στην Ευρώπη, το 52% των νοικοκυριών διαθέτουν κάποιο ζώο συντροφιάς ενώ στις Η.Π.Α. το 61% των νοικοκυριών διαθέτουν σκύλο και τουλάχιστον ένα παιδί (Macpherson, 2005). Παρά το γεγονός ότι η ιδιοκτησία κατοικίδιου ζώου, έχει αποδειχθεί επωφελής για την υγεία των ανθρώπων (Matchock 2015, Kuban *et al*. 2016), ο κίνδυνος μετάδοσης παθογόνων, όπως η *Salmonella* spp., μεταξύ ανθρώπου και σκύλου δε μπορεί να παραβλεφθεί, ιδιαιτέρως σήμερα με την παρουσία αυξανόμενου αριθμού ανοσοκατασταλμένων ατόμων.

Ιδιαιτέρου ενδιαφέροντος, είναι η απομόνωση και οροταυτοποίηση της *S. bongori* 61:z35:- συνδέεται με ψυχρόαιμα ζώα (ερπετά) , έχει απομονωθεί μία φορά ακόμη,από διαρροϊκό σκύλο κατά τη διάρκεια επιδημίας σαλμονέλλωσης, οφειλόμενη σε αυτόν τον ορότυπο, στην Ιταλία (Giammanco *et al*. 2002) ενώ τώρα βρέθηκε για πρώτη φορά σε ασυμπτωματικό σκύλο. Ακόμη, σημαντικό εύρημα είναι η απομόνωση της μονοφασικής *S. enterica* subsp. *enterica* 6,7: k:-, καθώς η συχνότητα εμφάνισης των μονοφασικών τύπων *S.* Typhimurium ή *S.* Typhimurium-like ορότυπων βρίσκεται πλέον στην τέταρτη θέση μεταξύ των συχνότερων ορότυπων στον άνθρωπο (ECDC 2014). Επίσης, η απομόνωση των *S.* Infantis, *S.* Thompson και *S.* Anatum αναφέρεται σποραδικά σε σκύλους, ενώ συχνότερα έχουν συνδεθεί με κρούσματα σαλμονελλώσεων σε ανθρώπους μετά από επαφή με μολυσμένη σκυλοτροφή (Behravesh *et al*. 2010, Imanishi *et al*. 2014). Ένας λόγος που ενδεχομένως εξηγεί γιατί οι ορότυποι των *Salmonella* spp. απομονώνονται πολύ σπανιότερα από αυτό το ζωικό είδος, είναι ότι η καλλιέργεια κοπράνων θεωρείται χαμηλής ευαισθησίας σε σχέση με την καλλιέργεια δειγμάτων από τον ειλεό ή τους μεσεντέριους λεμφαδένες (Bahnson *et al*. 2005). Η λήψη τέτοιων δειγμάτων όμως είναι ανέφικτη εξ’ ορισμού σε ασυμπτωματικούς σκύλους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Τα υποχρεωτικά προγράμματα επιτήρησης των σαλμονελλώσεων του ανθρώπου στην Ε.Ε. καθώς και τα προγράμματα ελέγχου που επιβλήθηκαν στα ορνίθια (ECDC 2014) θεωρήθηκαν επιτυχημένα, αφού ο επιπολασμός των σαλμονελλώσεων παρουσίαση μείωση την τελευταία πενταετία (Hugas and Beloeil, 2014). Όμως, στελέχη άλλων οροτύπων, εκτός των *S.* Enteritidis and *S.* Typhimurium, προκαλούν πλέον επιδημίες στην περιοχή της ΕΕ (Kinross *et al*. 2014, Friesema *et al*. 2012, Friesema *et al*. 2014). Ο αριθμός και η ποικιλία διαφορετικών στελεχών *Salmonella* (7 διαφορετικοί ορότυποι) που βρέθηκαν κατά τη μελέτη αυτή υποδεικνύουν τη σημασία του σκύλου ως δεξαμενή πολλών οροτύπων του παθογόνου αυτού που μπορούν ταυτόχρονα να μολύνουν ανθρώπους και άλλα ζώα, καθώς και να οδηγήσουν σε περαιτέρω μόλυνση του περιβάλλοντος. Η παρούσα μελέτη για πρώτη φορά διαπίστωσε την ύπαρξη οροτύπων *Salmonella* spp. σε ασυμπτωματικούς σκύλους στην Ελλάδα, την παρουσία ανθεκτικότητας σε αυτούς και την απομόνωση πολυανθεκτικού στελέχους. Σήμερα, οι ιδιοκτήτες ζώων συντροφιάς τα αντιμετωπίζουν πλέον ως μέλη της οικογένειας και τους παρέχουν μεγάλη ελευθερία κινήσεων στους χώρους τους σπιτιού (Overgaauw *et al*. 2009). Είναι, λοιπόν, κρίσιμης σημασίας η επιδημιολογική επαγρύπνηση και ο σχεδιασμός προγραμμάτων επιτήρησης, καθώς και η ενημέρωση του κοινού για τη λήψη των κατάλληλων μέτρων πρόληψης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

5. ΥΠΟΜΝΗΜΑ

1)Προϊόν PCR 89A (89*tetA*): 100% ομοιότητα με: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis expression vector pSY7K tet(A) gene for tetracycline efflux MFS transporter Tet(A), complete CDS
Βάσεις 909 / expect 0/ identity 100% (909/909) / κενά 0.
Sequence ID: ref|NG_048154.1|
Αλληλουχία που αναλύθηκε:

ATGCCGGTGCTGCCGGGCCTCCTGCGCGATCTGGTTCACTCGAACGACGTCACCGCCCACT
ATGGCATTCTGCTGGCGCTGTATGCGTTGATGCAATTTGCCTGCGCACCTGTGCTGGGCGC
GCTGTCGGATCGTTTCGGGCGGCGGCCGGTCTTGCTCGTCTCGCTGGCCGGCGCTGCTGTC
GACTACGCCATCATGGCGACGGCGCCTTTCCTTTGGGTTCTCTATATCGGGCGGATCGTGG
CCGGCATCACCGGGGCGACTGGGGCGGTAGCCGGCGCTTATATTGCCGATATCACTGATG
GCGATGAGCGCGCGCGGCACTTCGGCTTCATGAGCGCCTGTTTCGGGTTCGGGATGGTCG
CGGGACCTGTGCTCGGTGGGCTGATGGGCGGTTTCTCCCCCCACGCTCCGTTCTTCGCCGC
GGCAGCCTTGAACGGCCTCAATTTCCTGACGGGCTGTTTCCTTTTGCCGGAGTCGCACAAA
GGCGAACGCCGGCCGTTACGCCGGGAGGCTCTCAACCCGCTCGCTTCGTTCCGGTGGGCC
CGGGGCATGACCGTCGTCGCCGCCCTGATGGCGGTCTTCTTCATCATGCAACTTGTCGGAC
AGGTGCCGGCCGCGCTTTGGGTCATTTTCGGCGAGGATCGCTTTCACTGGGACGCGACCAC
GATCGGCATTTCGCTTGCCGCATTTGGCATTCTGCATTCACTCGCCCAGGCAATGATCACC
GGCCCTGTAGCCGCCCGGCTCGGCGAAAGGCGGGCACTCATGCTCGGAATGATTGCCGAC
GGCACAGGCTACATCCTGCTTGCCTTCGCGACACGGGGATGGATGGCGTTCCCGATCATG
GTCCTGCTTGCTTCGGGTGGCATCGGAATGCCGGCGCTGCAAGCAATGTTGTCCAGGCAG

2)Προϊόν PCR 96A (96*tetA*): ομοιότητα 99,8% με *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Kentucky 01-2100 *tet(A)* gene for tetracycline efflux MFS transporter Tet(A), complete CDS
Βάσεις 506/ expect 0/ Identity 99,8% (505/506) / κενά 0.
Sequence ID: ref|NG_048158.1|
Αλληλουχία που αναλύθηκε:

TATGCCGGTGCTGCCGGGCCTCCTGCGCGATCTGGTTCACTCGAACGACGTCACCGCCCAC
TATGGCATTCTGCTGGCGCTGTATGCGTTGATGCAATTTGCCTGCGCACCTGTGCTGGGCG
CGCTGTCGGATCGTTTCGGGCGGCGGCCGGTCTTGCTCGTCTCGCTGGCCGGCGCTGCTGT
CGACTACGCCATCATGGCGACGGCGCCTTTCCTTTGGGTTCTCTATATCGGGCGGATCGTG
GCCGGCATCACCGGGGCGACTGGGGCGGTAGCCGGCGCTTATATTGCCGATATCACTGAT
GGCGATGAGCGCGCGCGGCACTTCGGCTTCATGAGCGCCTGTTTCGGGTTCGGGATGGTC
GCGGGACCTGTGCTCGGTGGGCTGATGGGCGGTTTCTCCCCCCACGCTCCGTTCTTCGCCG
CGGCAGCCTTGAACGGCCTCAATTTCCTGACGGGCTGTTTCCTTTTGCCGGAGTCSCACAA
AGGCGAACGCCGGCCGTTAC

3) Προϊόν PCR 91B (91*tetB*): ομοιότητα 100% με *Salmonella enterica* strain B71 plasmid pB71, complete sequence
Βάσεις 811/ expect 0/ Identity 100% (811/811) / κενά 0.
Sequence ID: gb|KP899806.1|
Αλληλουχία που αναλύθηκε:

GTGCGCTTTGGATGCTGTATTTAGGCCGTTTGCTTTCAGGGATCACAGGAGCTACTGGGGC
TGTCGCGGCATCGGTCATTGCCGATACCACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTGGTTCGGT
TGGTTAGGGGCAAGTTTTGGGCTTGGTTTAATAGCGGGGCCTATTATTGGTGGTTTTGCAG
GAGAGATTTCACCGCATAGTCCCTTTTTTATCGCTGCGTTGCTAAATATTGTCGCTTTCCTT

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

GTGGTTATGTTTTGGTTCCGTGAAACCAAAAATACACGTGATAATACAGATACCGAAGTA
GGGGTTGAGACGCAATCGAATTCGGTATACATCACTTTATTTAAAACGATGCCCATTTTGT
TGATTATTTATTTTTCAGCGCAATTGATAGGCCAAATTCCCGCAACGGTGTGGGTGCTATT
TACCGAAAATCGTTTTGGATGGAATAGCATGATGGTTGGCTTTTCATTAGCGGGTCTTGGT
CTTTTACACTCAGTATTCCAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAATAGCCACTAAATGGGGCGAA
AAAACGGCAGTACTGCTCGGATTTATTGCAGATAGTAGTGCATTTGCCTTTTTAGCGTTTA
TATCTGAAGGTTGGTTAGTTTTCCCTGTTTTAATTTTATTGGCTGGTGGTGGGATCGCTTTA
CCTGCATTACAGGGAGTGATGTCTATCCAAACAAAGAGTCATCAGCAAGGTGCTTTACAG
GGATTATTGGTGAGCCTTACCAATGCAACCGGTGTTATTGGCCCATTACTGTTTGCTGTTA
TTTATAATCATTCACTACC

4) Προϊόν PCR 91sul1 (91sul1): ομοιότητα 100% με *Salmonella enterica* strain SRC4 TrmE (trmE) gene, complete cds; *Salmonella Genomic Island 1* variant SGI1-I, complete sequence; YidY (yidY) genes, complete cds
Βάσεις 597/ expect 0/ Identity 100% (597/597) / κενά 0.
Sequence ID: gb|KU563154.2
Αλληλουχία που αναλύθηκε:

ACGTATTGCGCCGCTCTTAGACGCCCTGTCCGATCAGATGCACCGTGTTTCAATCGACAGC
TTCCAACCGGAAACCCAGCGCTATGCGCTCAAGCGCGGCGTGGGCTACCTGAACGATATC
CAAGGATTTCCTGACCCTGCGCTCTATCCCGATATTGCTGAGGCGGACTGCAGGCTGGTGG
TTATGCACTCAGCGCAGCGGGATGGCATCGCCACCCGCACCGGTCACCTTCGACCCGAAG
ACGCGCTCGACGAGATTGTGCGGTTCTTCGAGGCGCGGGTTTCCGCCTTGCGACGGAGCG
GGGTCGCTGCCGACCGGCTCATCCTCGATCCGGGGATGGGATTTTTCTTGAGCCCCGCACC
GGAAACATCGCTGCACGTGCTGTCGAACCTTCAAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGGGCTTCC
GCTATTGGTCTCGGTGTCGCGGAAATCCTTCTTGGGCGCCACCGTTGGCCTTCCTGTAAAG
GATCTGGGTCCAGCGAGCCTTGCGGCGGAACTTCACGCGATCGGCAATGGCGCTGACTAC
GTCCGCACCCACGCGCCTGGAGATCTGCGAAGCGCAATCACCTTCTCGGAAAC

5) Προϊόν PCR 91blaTEM-1 (91*blaTEM-1*): 99, 5% ομοιότητα με Escherichia coli *blaTEM* gene for class A beta-lactamase TEM-150, complete CDS
Βάσεις 617/ expect 0/ Identity 99,5%/ (614/617) / κενά 0
Sequence ID: ref|NG_050194.1|
Αλληλουχία που αναλύθηκε:

AACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGYGCGGTATTATCCCGTGT
TGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGA
GTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAG
TGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCKGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGT
TGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGY
AGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG
GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC
CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGT
ATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACG
GGGAGTCAGGCAACTT

6) Προϊόν PCR 89gyrA (89*gyrA*) ομοιότητα 99,6% με *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis strain SH11G104 DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds
Sequence ID: gb|KP184391.1|
Βάσεις 256/ Expect 1e-136/ Identity 99,6% (270/271)/ κενά 0
Αλληλουχία που αναλύθηκε:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

GCATGACTGGGACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAA
ATACCATCCCCACGGCGATTACGCAGTGTATGACACCATCGTTCGTATGGCGCAGCCATTC
TCGCTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATTGACGGCGACTCCG
CGGCGGCAATGCGTTATACGGAGATCCGTCTGGCGAAAATCGCCCACGAACTGATGGCCG
ATCTCGAAAAAGAGACGGTGGATTTCGTGGA

7) Προϊόν PCR 134gyrA (134*gyrA*): ομοιότητα 99,6% με *Salmonella enterica* subsp. *enterica* partial gyrA gene for DNA gyrase subunit A, strain SC67
Sequence ID: emb|FR716824.1|
Βάσεις 273/ expect 1e-137/ Identity 99,6% (272/273) / κενά 0.
Αλληλουχία που αναλύθηκε:

GCATGACTGGGACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAAT
ACCATCCCCACGGCGATTCCGCAGTGTATGACACCATCGTTCGTATGGCGCAGCCATTCTCG
CTGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATTGACGGCGACTCCGCGGC
GGCAATGCGTTATACGGAGATCCGTCTGGCGAAAATCGCCCACGAACTGATGGCCGATCTCG
AAAAAGAGACGGTGGATTTCGTGGAA

8) Προϊόν PCR 135gyrA (135*gyrA)*: 100% ομοιότητα με *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Java strain NCTC5706
Sequence ID: emb|LT571437.1|
Βάσεις 256/ Expect 6e-130 / Identity 100% (256/256) κενά 0.
Αλληλουχία που αναλύθηκε:

TCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCACGGCGA
TTCCGCAGTGTATGACACCATCGTTCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGG
TGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATTGACGGCGACTCCGCGGCGGCAATGCGTTATACG
GAGATCCGTCTGGCGAAAATCGCCCACGAACTGATGGCCGATCTCGAAAAAGAGACGGTGGA
TTTCGTGGA

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1) Aarestrup FM. 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Basic and Clinic Pharmacology and Toxicology 96(4), 271-281.

2) Aarestrup FM, Oliver Duran C, Burch DG. 2008. Antimicrobial resistance in swine production. Animal Health Research Reviews 9(2), 135-148.

3) Aarestrup FM, Wegener HC. 1999. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. Microbes and Infection 1(8), 639-644.

4) Adesiji YO, Deekshit VK, Karunasagar I. 2014. Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources. Food Science and Nutrition 2(4), 436-442**.**

5) Alanis AJ. 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Archives of Medical Research 36(6), 697-705.

6) Aleksic S, Heinzerling F, Bockemuhl J. 1996. Human infection caused by *Salmonellae* of subspecies II to VI in Germany, 1977-1992. Zentralblatt für Bakteriologie 283(3), 391-398.

7) Altmeyer RM, McNern JK, Bossio JC, Rosenshine I, Finlay BB, Galán JE. 1993. Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. Molecular Microbiology 7(1), 89-98.

8) Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. 2003. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. Journal of Bacteriology (12), 3624-3635.

9) Bagcigil AF, Ikiz S, Dokuzeylu B, Basaran B, Or E, Ozgur NY. 2007, Fecal shedding of *Salmonella* spp. in dogs. Journal of Veterinary Medical Science 69 (7), 775-777.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

10) Bahnson PB, Kim JY, Weigel RM, Miller GY, Troutt HF. 2005. Associations between on-farm and slaughter plant detection of *Salmonella* in market-weight pigs. Journal of Food Protection 68(2), 246-250.

11) Baker MG, Thornley CN, Lopez LD, Garrett NK, Nicol CM. 2007. A recurring salmonellosis epidemic in New Zealand linked to contact with sheep. Epidemiology and Infection 135(1), 76-83.

12) Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. Infection and Immunity 66, 4579-4587.

13) Behravesh CB, Ferraro A, Deasy M 3rd, Dato V, Moll M, Sandt C, Rea NK, Rickert R, Marriott C, Warren K, Urdaneta V, Salehi E, Villamil E, Ayers T, Hoekstra RM, Austin JL, Ostroff S, Williams IT: *Salmonella* Schwarzengrund Outbreak Investigation Team. 2010. Human *Salmonella* infections linked to contaminated dry dog and cat food, 2006-2008. Pediatrics 126(3), 477-83.

14) Bender JB, Shulman SA. 2004. Reports of zoonotic disease outbreaks associated with animal exhibits and availability of recommendations for preventing zoonotic disease transmission from animals to people in such settings. Journal of American Veterinary Medicine Association 224(7), 1105-1109.

15) Bitar R and Tarpley J. 1985. Intestinal perforation and typhoid fever: a historical and state of the art review. Review of Infectious Diseases 7(2), 257-271.

16) Boerlin P. 2004. Molecular epidemiology of antimicrobial resistance in veterinary medicine: where do we go? Animal Health Research Reviews 5(1), 95-102.

17) Burnet MF and White DO. 1972. Natural history of infectious diseases, 4th Ed. Cambridge University Press, Cambridge, England.

18) Camarda A, Pugliese N, Pupillo A, Oliva M, Circella E, Dionisi AM, Ricci A, Legretto M, Caroli A, Pazzani C. 2013. Resistance Genes, Phage Types and Pulsed Field Gel Electrophoresis Pulsotypes in *Salmonella* enterica Strains from Laying Hen Farms in Southern Italy. International Journal of Environmental Research and Public Health 10(8), 3347-3362.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

19) Cantón R, Morosini MI. 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. FEMS Microbiology Reviews 35(5), 977-991.

20) Cantor GH, Nelson S Jr, Vanek JA, Evermann JF, Eriks IS, Basaraba RJ, Besser TE. 1997. *Salmonella* shedding in racing sled dogs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 9(4), 447-448.

21) Carattoli A. 2003. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. Current Issues in Molecular Biology 5, 113–122.

22) Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53, 2227–2238.

23) Carter PB and Collins FM. 1974. The route of enteric infection in normal mice. Journal of Experimental Medicine 139, 1189-1203.

24) CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2008. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections caused by contaminated dry dog food– United States, 2006-2007. Morbidity and Mortality Weekly Report 2008, 57(19), 521-524.

25) CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2009. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - 10 states. Morbidity and Mortality Weekly Report, 59(14), 418-422.

26) Chalker RB, Blaser MJ. 1988. A Review of Human Salmonellosis: III. Magnitude of *Salmonella* Infection in the United States. Reviews of Infectious Diseases 10(1), 111-124.

27) Chen S, Cui S, McDermott PF, Zhao S, White DG, Paulsen I, Meng J. 2007. Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51(2):535-542.

28) Chopra I and Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews 65, 232–260.

29) Clarke RC and Gyles CL. 1993. *Salmonella*. In: Gyles CL and Thoen CO (eds) Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames Iowa. P. 133-153.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

30) Cortés C, de la Fuente R, Contreras A, Sánchez A, Corrales JC, Martínez S, José A, Orden JA. 2006. A survey of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in dairy goat faeces and bulk tank milk in the Murcia region of Spain. Irish Veterinary Journal 59(7), 391-393.

31) Cote S, Letellier A, Lessard L, Quessy S 2004. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. Canadian Journal of Veterinary Research 68(4), 241-248.

32) Crosa Jh, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. 1973. Molecular relationships among the *Salmonellae*. Journal of Bacteriology 115, 307-315.

33) Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM, Barzilay EJ; Emerging Infections Program NARMS Working Group. 2011. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55(3), 1148-1154.

34) Cummings KJ, Warnick LD, Alexander KA, Cripps CJ, Grohn YT, James KL, McDonough PL, Reed KE. 2009. The duration of fecal *Salmonella* shedding following clinical disease among dairy cattle in the northeastern USA. Preventive Veterinary Medicine 92, 134-139.

35) Daniels EM, Schneerson R, Egan WM, Szu SC, Robbins JB. 1989. Characterization of the *Salmonella* Paratyphi C Vi polysaccharide. Infection and Immunity 57, 3159-3164.

36) De Vito D, Monno R, Nuccio F, Legretto M, Oliva M, Coscia MF, Dionisi AM, Calia C, Capolongo C, Pazzani C. Diffusion and persistence of multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium strains phage type DT120 in southern Italy. Biomedical Research International 2015, 265042.

37) Eaves DJ, Randall L, Gray DT, Buckley A, Woodward MJ, White AP, Piddock LJ. 2004. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of gyrA, gyrB, parC, and parE and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48, 4012–4015.

38) ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2014. Salmonellosis In: Annual Epidemiological Report. Food – waterborne diseases and zoonoses. P. 58-63.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

39) EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on a quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat: Source attribution for human salmonellosis from meat. The EFSA Journal 625, 1-32.

40) EFSA (European Food Safety Authority). 2010. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. The EFSA Journal 1496, 1-288.

41) Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP. (1991). Quinolone resistance in *campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 27, 199–208.

42) Erhardt M and Dersch P. 2015. Regulatory principles governing *Salmonella* and *Yersinia* virulence. Frontiers in Microbiology 6, 949.

43) Ersboll AK, Nielsen LR 2008. The range of influence between cattle herds is of importance for the local spread of *Salmonella* Dublin in Denmark. Preventive Veterinary Medicine 84(3-4), 277-290.

44) Euzeby JP. 2010. List of prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Salmonella*. www.bacteriocict.fr/s/salmonella.html. Accessed 7July 2010.

45) Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A and Burriel AR. 2013. Animal salmonelloses: A brief review of "Host Adaptation and Host Specificity" of *Salmonella* spp., Veterinary World 6(10), 703-708.

46) Evangelopoulou G, Filioussis G, Kritas S, Christodoulopoulos G, Triantafillou EA, Burriel AR. 2014. Colonisation of pig gallbladders with *Salmonella* species important to public health. Veterinary Record 176(7), 174.

47) Falkow JP and Mekalanos J. 1990. The enteric bacilli and vibrios. In: Davis B, Dulbecco R, Eisen H and Ginsberg H (eds) Microbiology 4th edn. JB Lippincott, Philadelphia. P. 576-579.

48) FDA. 2013. Guidance for Industry #213. http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement?GuidanceforIndustry/UCM299624.pdf

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

49) Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Wray C. 2000. *Salmonella* Infection in Pigs. In: Wray C, Wray A (eds) *Salmonella* in Domestic animals. CABI publishing, New York. P. 191-207.

50) Feng Y, Chien KY, Chen HL, Chiu CH. 2012. Pseudogene recoding revealed from proteomic analysis of *salmonella* serovars. Journal of Proteome Research 11(3), 1715-1719.

51) Finley R, Ribble C, Aramini J, Vandermeer M, Popa M, Litman M, ReidSmith R. 2007. The risk of *salmonellae* shedding by dogs fed *Salmonella* contaminated commercial raw food diets. Canadian Veterinary Journal 48 (1), 69-75.

52) Foley SL, Lynne AM. 2008. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. Journal of Animal Science 86, 173-187.

53) Folster JP, Pecic G, McCullough A, Rickert R, Whichard JM. 2011. Characterization of bla(CMY)-encoding plasmids among *Salmonella* isolated in the United States in 2007. Foodborne Pathogens and Diseases 8, 1289–1294.

54) Frances CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S. 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. Nature 364, 639-642.

55) Friesema IH, de Jong AE, Fitz James IA, Heck ME, van den Kerkhof JH, Notermans DW, van Pelt W, Hofhuis A. 2012. Outbreak of *Salmonella* Thompson in the Netherlands since July 2012. Eurosurveillance 17(43), 20303.

56) Friesema I, de Jong A, Hofhuis A, Heck M, van den Kerkhof H, de Jonge R, Hameryck D, Nagel K, van Vilsteren G, van Beek P, Notermans D, van Pelt W. 2014. Large outbreak of *Salmonella* Thompson related to smoked salmon in the Netherlands, August to December 2012. Eurosurveillance 19(39), 20918.

57) Frye JG and Jackson CR. 2013. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enteroccocus* spp. isolated from U.S. food animals. Frontiers in Microbiology 4, 135.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

58) Frye JG, Lindsey RL, Meinersmann RJ, Berrang ME, Jackson CR, Englen MD, Turpin JB, Fedorka-Cray PJ. 2011. Related antimicrobial resistance genes detected in different bacterial species co-isolated from swine fecal samples. Foodborne Pathogens and Diseases 8(6),663-679.

59) Galan JE. 2001. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. Annual Review of Cell and Developmental Biology 17, 53-86.

60) Giammanco GM, Pignato S, Mammina C, Grimont F, Grimont PA, Nastasi A, Giammanco G. 2002. Persistent endemicity of *Salmonella* bongori 48:z(35):--in Southern Italy: molecular characterization of human, animal, and environmental isolates. Journal of Clinical Microbiology 40(9), 3502-3505.

61) Giannella RA, Broitman SA, Zamcheck N. 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. Gut 13, 251-256.

62) Ginocchio C, Pace J, Galán JE. 1992. Identification and molecular characterization of a *Salmonella* typhimurium gene involved in triggering the internalization of *salmonellae* into cultured epithelial cells. Proceedings of National Academy of Science U S A. 89(13), 5976-5980.

63) Glenn LM, Lindsey RL, Frank JF, Meinersmann RJ, Englen MD, Fedorka-Cray PJ, Frye JG. 2011. Analysis of antimicrobial resistance genes detected in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from food animals. Microbial Drug Resistance 17(3), 407-418.

64) Goosney DL, Knoechel DG, Finlay BB. 1999. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*. Masters of host cell cytoskeletal exploitation. Emerging Infectious Diseases 5, 216-223.

65) Greene CE. 2006. Salmonellosis. In: Infectious Diseases of the dog and cat. Saunders Elsevier (ed.) 3rd Ed. P. 703-715.

66) Groisman EA and Ochman H. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell 87, 791-794.

67) Groisman EA and Ochman H. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. Trends in Microbiology 5(9), 343-349.

68) Gyles CL. 2004. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ames, Iowa: Blackwell Pub, 3.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

69) Hackett T and Lappin MR. 2003. Prevalence of enteric pathogens in dogs of northcentral Colorado. Journal of the American Animal Hospital Association 39(1), 52-56.

70) Hammerum AM, Heuer OE, Emborg HD, Bagger-Skjøt L, Jensen VF, Rogues AM, Skov RL, Agersø Y, Brandt CT, Seyfarth AM, Muller A, Hovgaard K, Ajufo J, Bager F, Aarestrup FM, Frimodt-Møller N, Wegener HC, Monnet DL. 2007. Danish integrated antimicrobial resistance monitoring and research program. Emerging Infectious Diseases 13, 1632–1639.

71) Helms M, Simonsen J, Molbak K. 2004. Quinolone resistance is associated with increased risk of invasive illness or death during infection with *Salmonella* serotype Typhimurium. Journal of Infectious Diseases 190(9), 1652-1654.

72) Hensel M, Shea JE, Bäumler AJ, Gleeson C, Blattner F, Holden DW. 1997. Analysis of the boundaries of *Salmonella pathogenicity island 2* and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology 179(4), 1105-1111.

73) Hentges DJ and Maier BR. 1970. Inhibition of *Shigella felxneri* by the normal intestinal flora. III. Interactions with *Bacteroides fragilis* strains in vitro. Infection and Immunity 2, 364-370.

74) Hill SL, Cheney JM, Taton-Allen GF, Reif JS, Bruns C, Lappin MR. 2009. Prevalence of enteric zoonotic organisms in cats. Journal of Amimal Veterinary Medical Association 216(5), 687-692.

75) Hjartardottir S, Gunnarsson E, Sigvaldadottir J. 2002. *Salmonella* in sheep in Iceland. Acta Veterinaria Scandinavia 43(1), 43-48.

76) Hoelzer K, Moreno Switt AI, Wiedmann M. 2011. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. Veterinary Research 14 42, 34.

77) Hohmann AW, Schmidt G, Rowley D. 1978. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. Infection and Immunity 22, 763-770.

78) Hohmann EL. 2001. Nontyphoidal salmonellosis. Clinical Infectious Diseases 32, 263–269.

79) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition, Williams and Wilkins, ISBN 0-68300-6032, Baltimore, Maryland, USA.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

80) Holt KE, Thomson NR, Wain J, Langridge GC, Hasan R, Bhutta ZA, Quail MA, Norbertczak H, Walker D, Simmonds M, White B, Bason N, Mungall K,Dougan G, Parkhill J. 2009. Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. BMC Genomics 10, 36.

81) Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. International Journal of Antimicrobial Agents 25(5), 358-73.

82) Hugas M and Beloeil PA. 2014. Controlling *Salmonella* along the food chain in the European Union- Progress over the last ten years. Eurosurveillance 19(19), 20804.

83) Hunter AG, Mathieson AO, Scott JA, Corrigall W. 1976. An outbreak of *S.* Typhimurium in sheep and its consequences. Veterinary Record 98(7), 126-130.

84) Hurd HS, McKean JD, Griffith RW, Wesley IV, Rostagno MH. 2002. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. Applied Environmental Microbiology 68(5), 2376-2381.

85) Imanishi M, Rotstein DS, Reimschuessel R, Schwensohn CA, Woody DH Jr, Davis SW, Hunt AD, Arends KD, Achen M, Cui J, Zhang Y, Denny LF, Phan QN, Joseph LA, Tuite CC, Tataryn JR, Behravesh CB. 2014. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis infection in humans linked to dry dog food in the United States and Canada, 2012. Journal of American Veterinary Medical Association 244(5), 545-553.

86) Ivanek R, Grohn YT, Tauer LW, Wiedmann M.2004. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44(7-8), 513-523.

87) Joffe DJ, Schlesinger DP. 2002. Preliminary assessment of the risk of *Salmonella* infection in dogs fed raw chicken diets. Canadian Veterinary Journal 43(6), 441-442.

88) Johnson TJ, Shepard SM, Rivet B, Danzeisen JL, Carattoli, A. 2011. Comparative genomics and phylogeny of the IncI1 plasmids: a common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. Plasmid 66, 144–151.

89) Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: scientific assessment. Geneva World Health

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

Organization, 2003. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/. Accessed 16 Apr 2015.

90) Jones FT and Ricke SC. 2003. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. Poultry Science 82, 613–617.

91) Kinross P, van Alphen L, Martinez Urtaza J, Struelens M, Takkinen J, Coulombier D, Makela P, Bertrand S, Mattheus W, Schmid D, Kanitz E, Rucker V, Krisztalovics K, Paszti J, Szogyenyi Z, Lancz Z, Rabsch W, Pfefferkorn B, Hiller P, Mooijman K, Gossner C. 2014. Multidisciplinary investigation of a multicountry outbreak of *Salmonella* Stanley infections associated with turkey meat in the European Union, August 2011 to January 2013. Eurosurveillance 19(19), 20801.

92) Kuban M, Królikowski J, Nowicki M. 2016. Dog ownership status and self-assessed health, life-style and habitual physical activity in chronic hemodialysis patients. Hemodialysis International doi: 10.1111/hdi.12398. Epub ahead of print.

93) Kwaga JK, Adesiyun AA, Abdullahi SU, Bello CS 1989. Prevalence of *salmonellae*, *shigellae* and *Plesiomonas shigelloides* in dogs in Zaria, Nigeria. British Veterinary Journal 145(2), 174-177.

94) Lanzieri G. 2007. Population in Europe 2007: first results. Eurostat Statistics in focus 2008, 81.

95) Lee KE and Lee Y. 2007. Isolation of multidrug-resistant *Salmonella* typhimurium DT104 from swine in Korea. The Journal of Microbiology 45(6), 590-592.

96) Linton AH. 1977. Antibiotic resistance: the present situation reviewed. Veterinary Record 100(17), 354-60.

97) Macnab RM. 1996. Flagella and motility. In: F.C. Neidhardt (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: Cellular and Molecular Biology 2, 123-145.

98) Macpherson CN. 2005. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. International Journal for Parasitology 35(11-12), 1319-1331.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

99) Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clinical Infectious Diseases 50(6), 882-889.

100) Martel, JL, Tardy F, Brisabois A, Lailler R, Coudert M, Chaslus-Dancla E. 2000. The French antibiotic resistance monitoring programs. International Journal of Antimicrobial Agents 14, 275–283.

101) Martin LJ, Fyfe M, Doré K, Buxton JA, Pollari F, Henry B, Middleton D, Ahmed R, Jamieson F, Ciebin B, McEwen SA, Wilson JB: Multi-Provincial *Salmonella* Typhimurium Case-Control Study Steering Committee. 2004. Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium infections. The Journal of Infectious Diseases 189(3):377-384.

102) Matayoshi M, Kitano T, Sasaki T, Nakamura M. 2015. Resistance phenotypes and genotypes among multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis strains isolated between 2008 and 2012 from slaughter pigs in Okinawa Prefecture, Japan. The Journal of Veterinary Medical Science 77(6), 705-710.

103) Matchock RL. 2015. Pet ownership and physical health. Current Opinion in Psychiatry 28(5), 386-392.

104) Mathers JJ, Flick SC, Cox LA Jr. 2011. Longer duration uses of tetracyclines and penicillins in U.S. food producing animals: Indications and microbiologic effects. Environment International 37(5):991-1004.

105) Mathew AG, Cissell R, Liamthong S. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. Foodborne Pathogens and Diseases 4(2), 115-133.

106) Matthews TD, Edwards R, Maloy S. 2010. Chromosomal rearrangements formed by rrn recombination do not improve replichore balance in host-specific *Salmonella enterica* serovars. PLoS One 5(10).

107) Maurelli AT. 2007. Black holes, antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens. FEMS Microbiology Letters 267(1), 1-8.

108) McDermott PF, Walker RD, White DG. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. International Journal of Toxicology 22(2), 135-143.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

109) Michael GB, Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S. 2006. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. Microbes and Infection 8(7), 1898-1914.

110) Miller SI and Mekalanos JJ. 1990. Constitutive expression of the phoP regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. Journal of Bacteriology 172 (5), 2485-2490.

111) Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. Molecular Microbiology 15(4), 749-759.

112) Molbak K, Baggesen DL, Aarestrup FM, Ebbesen JM, Engberg J, Frydendahl K, Gerner-Smidt P, Petersen AM, Wegener HC. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. The New England Journal of Medicine 341(19), 1420-1425.

113) Li J, Ochman H, Groisman EA, Boyd EF, Solomon F, Nelson K, Selander RK. Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*. Proceedings of National Academies of Science U.S.A. 92 (16), 7252-7256.

114) Nelson JM, Chiller TM, Powers JH, Angulo FJ. (2007). Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. Clinical Infectious Diseases 44, 977–980.

115) Nilsson O. 2015. Hygiene quality and presence of ESBL-producing *Escherichia coli* in raw food diets for dogs. Infection Ecology and Epidemiology 5, 28758.

116) Ochman H, Groisman EA. 1996. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. Infection and Immunity 64(12), 5410-5412.

117) Overgaauw PA, van Zutphen L, Hoek D, Yaya FO, Roelfsema J, Pinelli E, van Knapen F, Kortbeek LM. 2009. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. Veterinary Parasitology 163(1-2), 115-22.

118) Papadopoulos T, Petridou E, Zdragas A, Mandilara G, Nair S, Peters T, Chattaway M, de Pinna E, Passiotou M, Vatopoulos A. 2016. Comparative

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

study of all *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains isolated from food and food animals in Greece from 2008 to 2010 with clinical isolates. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 35(5), 741-746.

119) Parija SC. 2012. *Salmonella*. In: Textbook of Microbiology and Immunology. Elsevier (ed) 2nd Ed. P. 269-290.

120) Popoff MY, Bockemühl J, McWhorter-Murlin A. 1993. Supplement 1992 (no. 36) to the Kauffmann-White scheme. Research in Microbiology 144(6), 495-498.

121) Popoff MY, Bockemühl J, Ghessling LL. 2004. Supplement 2002 (no46) to the Kauffmann-White shceme. Research in Microbiology 155, 568-570.

122) Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. 2004. *Salmonella*. In: Enterobacteriaceae, Clinical Veterinary Microbiology, Elsevier (ed) 6th Ed. P. 226-234.

123) Raetz CR and Whitfieid C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review of Biochemistry 71, 635-700.

124) Reche MP, García de los Ríos JE, Jiménez PA, Rojas AM, Rotger R. 2002. gyrA Mutations associated with nalidixic acid-resistant *salmonellae* from wild birds. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(9):3108-3109.

125) Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ 3rd. 1989. Clonal nature of *Salmonella t*yphi and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella* bongori comb. nov. Journal of Clinical Microbiology 2, 313-320.

126) Riley PY and Chomel BB. 2005. Hedgehog zoonoses. Emerging Infectious Diseases 11(1), 1-5.

127) Roberts MC. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiology Reviews 19, 1–24.

128) Rychlik I and Barrow PA. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behavior during intestinal colonization and infection. FEMS Microbiology Reviews 29, 1021-1040.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

129) Schotte U, Borchers D, Wulff C, Geue L. 2007. *Salmonella* Montevideo outbreak in military kennel dogs caused by contaminated commercial feed, which was only recognized through monitoring. Veterinary Microbiology 119(2-4), 316-323.

130) Selander RK, Smith NH, Li J, Beltran P, Ferris KE, Kopecko DJ, Rubin FA. 1992 Molecular evolutionary genetics of the cattle-adapted serovar *Salmonella* Dublin. Journal of Bacteriology 174(11), 3587–3592.

131) Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR. 2004. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. Applied Environmental Microbiology 70(5), 2959-2965.

132) Shryock TR and Richwine A. 2010. The interface between veterinary and human antibiotic use. Annals of the New York Academy of Science 1213, 92-105.

133) Silverman M, Zieg J, Simon M. 1979. Flagellar-phase variation: isolation of the rh1 gene. Journal of Bacteriology 137, 517-523.

134) Smith BP, Timm K, Jahn S, Reina-Guerra M. 1980. Salmonellosis in a group of ponies: failure to identify a chronic active carrier. Journal of American Veterinary Medicine Association 176(3), 215-216.

135) Smith T. 1894. The hog-cholera group of bacteria. U.S. Bur Anim India Bull 6, 6-40.

136) Sommer MO and Dantas G. 2011. Antibiotics and the resistant microbiome. Current Opinion in Microbiology 14(5), 556-563.

137) Spain CV, Scarlett JM, Wade SE, McDonough P. 2001. Prevalence of enteric zoonotic agents in cats less than 1 year old in central New York State. Journal of Veterinary Internal Medicine 15(1), 33-38.

138) Steinmuller N, Demma L, Bender JB, Eidson M, Angulo FJ. 2006. Outbreaks of enteric disease associated with animal contact: not just a foodborne problem anymore. Clinical Infectious Diseases 43(12), 1596-1602.

139) Thai TH, Hirai T, Lan NT, Shimada A, Ngoc PT, Yamaguchi R. 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from beef at retail markets in the North Vietnam. The Journal of Veterinary Medical Science 74(9), 1163-1169.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

140) Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. 2010. The tetracycline resistome. Cellular and Molecular Life Sciences 67(3), 419-431.

141) Tollefson L, Angulo FJ, Fedorka-Cray PJ. 1998. National surveillance for antibiotic resistance in zoonotic enteric pathogens. Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice 14(1), 141-150.

142) Uzzau S, Leori GS, Petruzzi V, Watson PR, Schianchi G, Bacciu D, Mazzarello V, Wallis TS, Rubino S. 2001. *Salmonella enterica* serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. Infection and Immunity 69(5), 3092-30993.

143) van Duijkeren E, Wannet WJ, Heck ME, van Pelt W, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Smit JA, Houwers DJ. Sero types, phage types and antibiotic susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from horses in The Netherlands from 1993 to 2000. 2002. Veterinary Microbiology 86(3):203-212.

144) Vargas-Galindo Á. 2007. Probabilistic inversion in priority setting of food borne pathogens. MSc thesis, Delft University of Technology, Department of Applied Mathematics and Risk Analysis.

145) Varma JK, Molbak K, Barrett TJ, Beebe JL, Jones TF, Rabatsky-Ehr T, Smith KE, Vugia DJ, Chang HG, Angulo FJ. Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. Journal of Infectious Diseases 191(4), 554-561.

146) Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, Cieslak PR, Deneen VC, Tauxe RV, Emerging Infections Program FoodNet Working Group. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. Clinical Infectious Diseases 38 Suppl 3:S127-34.

147) Wallis TS, Barrow PA. 2005. *Salmonella* pathogenesis and epidemiology in food producing animals. EcoSal Plus (2).

148) Weber A, Wachowitz R, Weigl U, Schafer-Schmidt R. 1995. Occurrence of *Salmonella* in fecal samples of dogs and cats in northern Bavaria from 1975 to 1994Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 108(11), 401-404.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79

149) Wells EV, Boulton M, Hall W, Bidol SA. 2004. Reptile-associated salmonellosis in preschool-aged children in Michigan, January 2001-June 2003. Clinical Infectious Diseases 39 (5), 687-691.

150) White B. 1926. Further studies on the *Salmonella* group. Medical Research Council Special Report 103, 3-160.

151) WHO. 2011. 3rd Revision. WHO list of Critically Important Antimicrobials (CIA).

152) WHOCC- Salm. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th revision World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Pasteur Institute.

153) Witte W. 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. International Journal of Antimicrobial Agents 16 (Suppl. 1), S19–S24.

154) Wiuff C, Madsen M, Baggesen DL, Aarestrup FM. 2000. Quinolone resistance among *Salmonella enterica* from cattle, broilers, and swine in Denmark. Microbial Drug Resistance 6(1):11-17.

155) Woodward DL, Khakhria R, Johnson WM. 1997. Human salmonellosis associated with exotic pets. Journal of Clinical Microbiology 35(11), 2786-2790.

156) Wright JG, Tengelsen LA, Smith KE, Bender JB, Frank RK, Grendon JH, Rice DH, Thiessen AM, Gilbertson CJ, Sivapalasingam S, Barrett TJ, Besser TE, Hancock DD, Angulo FJ. 2005. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium in four animal facilities. Emerging Infectious Diseases 11(8), 1235-1241.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
12/06/2024 17:42:18 EEST - 18.219.57.79