



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Διερεύνηση της συχνότητας παρουσίας και της αντιμικροβιακής ευαισθησίας
της *Escherichia coli* στο νοπό αγελαδινό γάλα»**

Καρασμάνογλου Ε. Σοφία

Τεχνολόγος Τροφίμων ΑΤΕΙΘ

ΛΑΡΙΣΑ 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
(ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ)**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Διερεύνηση της συχνότητας παρουσίας και της αντιμικροβιακής ευαισθησίας
της *Escherichia coli* στο νοπό αγελαδινό γάλα»**

Καρασμάνογλου Ε. Σοφία

Τεχνολόγος Τροφίμων ΑΤΕΙΘ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων

- **Σεργκελίδης Δανιήλ**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.

Μέλη

- **Γιαδίνης Νεκτάριος**, Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.
- **Σολωμάκος Νικόλαος**, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής Π.Θ.

*Στους γονείς μου
& στον Αλέξη
για την αγάπη και τη μακροθυμία τους.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δανιήλ Σεργκελίδη για την πολύτιμη υποστήριξη του και τις παραγωγικές υποδείξεις του. Πάντα με ευγένεια και διάθεση συνεργασίας με βοήθησε ουσιαστικά στην κατάρτιση της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επίκουρο καθηγητή και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Νικόλαο Σολωμάκο για την υποστήριξη και καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειραματικού μέρους, καταφέροντας πάντα να βρίσκει λύσεις σε κάθε πρόβλημα που παρουσιαζόταν. Ακόμη, θα ήθελα αν ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Νεκτάριο Γιαδίνη, όπου χάρη στην οργάνωση και τις συντονισμένες ενέργειες του κατορθώθηκε να συλλεχθεί ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων γάλακτος, προσδίδοντας με αυτό τον τρόπο σημαντικότητα και αξιοπιστία στα εξαγόμενα συμπεράσματα αυτής της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κτηνίατρο κ. Ματίνα Ευαγγελοπούλου και το εργαστήριο κτηνιατρικής της 1^{ης} Στρατιάς Λάρισας για τις πολύτιμες συμβουλές και κατευθύνσεις κατά την διεξαγωγή του πειράματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρεία Rontis για την παραχώρηση εξοπλισμού, απαραίτητου για την αποπεράτωση του πειράματος, όπως επίσης και τη συμφοιτήτρια μου γεωπόνο Αφροδίτη Γραμμένου για τη βοήθεια της στη συλλογή των δειγμάτων.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους όσους με στήριξαν ηθικά και πρακτικά με στόχο την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις αποτελούν σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας τόσο στον αναπτυσσόμενο κόσμο όσο και στον ανεπτυγμένο. Το περιβάλλον των αγελαδοτροφικών μονάδων αλλά και τα ζώα εκμετάλλευσης μπορούν δυνητικά να αποτελέσουν δεξαμενή παθογόνων βακτηρίων. Ένα από τα βασικότερα παθογόνα βακτήρια που απαντώνται στο νωπό αγελαδινό γάλα είναι η *Escherichia coli*. Το νωπό γάλα μπορεί να μολυνθεί εύκολα ερχόμενο σε επαφή με μολυσμένες πηγές ή κατά την απέκκριση του από το μαστό μολυσμένου ζώου. Τα τελευταία χρόνια, συχνό αντικείμενο μελέτης αποτελεί η απομόνωση παθογόνων στελεχών από τρόφιμα και ο έλεγχος αντοχής τους στα αντιβιοτικά. Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη του προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής απομονωμένων στελεχών *E. coli* από νωπό αγελαδινό γάλα, με τη χρήση της μεθόδου διάχυσης δίσκων κατά Kirby-Bauer. Η μελέτη διεξήχθη τον Ιούνιο του 2019 σε 101 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος από αγελαδοτροφικές μονάδες τις κεντρικής Μακεδονίας. Από τα 101 δείγματα απομονώθηκαν 75 στελέχη *E. coli* από ισάριθμα δείγματα (74,3%). Το μεγαλύτερο ποσοστό αντοχής παρουσιάστηκε έναντι της αμπικιλίνης (28,0%), ακολούθησε η αντοχή στην αμοξυκιλίνη/κλαβουλανικό οξύ (20,0%), στη σουλφαμεθοξαζόλη /τριμεθοπρίμη (12%), στην κεφτριαξόνη (6,7%), στην κεφοταξίμη (5,3%), στην αζτρεονάμη (4,0%) και τέλος στη κεφκινόμη (2,7%). Συμπερασματικά, από αυτή τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι το νωπό αγελαδινό γάλα μπορεί να θεωρηθεί κρίσιμη πηγή βακτηρίων *E. coli*. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ανάγκη αυστηρής παρακολούθησης και εφαρμογής αποτελεσματικών μέτρων υγιεινής και βιοασφάλειας σε όλα τα στάδια παραγωγής και επεξεργασίας γάλακτος.

Λέξεις κλειδιά : Νωπό Αγελαδινό Γάλα, *E. coli*, Αντιμικροβιακή Ευαισθησία, , Kirby-Bauer

ABSTRACT

Foodborne illnesses represent a public health problem in the developed as well as in the developing countries. The farm environment and the farm animals can potentially become a reservoir of pathogenic bacteria. One of the major pathogenic bacteria found in raw cow's milk is *Escherichia coli*. Raw milk can be easily contaminated by contacting infected sources or by excreting it from the breast of an infected animal. In recent years, the study of the isolation of foodborne pathogens and their resistance to antibiotics has been quite common. The aim of this research was to study the antimicrobial resistance profile of isolated *E. coli* strains of raw cow's milk using the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. The study was performed during June 2019 on 101 samples of raw cow's bulk tank milk from farms in central Macedonia. Of the 101 samples, 75 *E. coli* strains (74.3%) were isolated from equal number of samples. The highest resistance was observed to ampicillin (28.0%), followed by amoxicillin / clavulanic acid (20.0%), sulfamethoxazole / trimethoprim (12%), ceftriaxone (6.7%) and cefotaxime (3.0%), aztreonam (4.0%) and finally to cefquinome (2.7%). In conclusion, this study found that raw cow's milk can be considered a critical source of *E. coli* bacteria. This demonstrates the need for rigorous monitoring and implementation of effective hygiene and biosecurity measures at all stages of milk production and processing.

Keywords: Raw cow's milk, *E. coli*, Antimicrobial susceptibility, Kirby-Bauer

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: <i>E. coli</i>	2
Εικόνα 2: <i>E. coli</i> – Επιφανειακά αντιγόνα.	4
Εικόνα 3: Χαρακτηριστικές αποικίες της <i>E. coli</i> σε MacConkey Agar	9
Εικόνα 4: Χαρακτηριστικές αποικίες <i>E. coli</i> σε Eosin Methylene Blue Agar	10
Εικόνα 5: Χαρακτηριστικές αποικίες <i>E. coli</i> σε Tryptone Bile Agar	10
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση διαφορών ανθεκτικών και μη ανθεκτικών βακτηρίων.	13
Εικόνα 7: Ο κύκλος των τροφιμογενών και κτηνιατρικών παθογόνων στο περιβάλλον των γαλακτοκομικών εκμεταλλεύσεων και η μεταφορά τους στο γάλα.	22
Εικόνα 8: Τρυβλίο TBX μετά την επώαση, και παρουσία χαρακτηριστικών αποικιών <i>E. coli</i>	30
Εικόνα 9: Δοκιμή ινδόλης	31
Εικόνα 10: Τρυβλίο Mueller-Hinton μετά την επώαση (μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιμικροβιακών φαρμάκων σε άγαρ κατά Kirby-Bauer)	32

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Τροφιμογενής προέλευση της <i>E. coli</i>	6
Πίνακας 2: Κλινικά σύνδρομα προκαλούμενα από την <i>E. coli</i>	8
Πίνακας 3: Κυριότερες βιοχημικές ιδιότητες της <i>E. coli</i>	11
Πίνακας 4: Όρια ελέγχων νοπού αγελαδινού γάλακτος (Κανονισμός ΕΚ 853/2004)	21
Πίνακας 5: Μηχανισμός δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων της μελέτης	33
Πίνακας 6: Όρια ζωνών αναστολής μεθόδου διάχυσης δίσκων (EUCAST και CLSI)	34
Πίνακας 7: Αντιμικροβιακή ευαισθησία, ενδιάμεση αντοχή και αντοχή στελεχών <i>E. coli</i> στα 7 αντιμικροβιακά φάρμακα	36
Πίνακας 8: Παρουσίαση αποτελεσμάτων ανθεκτικών στελεχών	37
Πίνακας 9: Ποσοστιαία παρουσίαση προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής ανθεκτικών στελεχών	38
Πίνακας 10: Ποσοστό ευαισθησίας & αντοχής στελεχών <i>E. coli</i> σε ένα ή και περισσότερα αντιμικροβιακά φάρμακα	39
Πίνακας 11: Αντιμικροβιακή αντοχή στελεχών <i>E. coli</i> ανά κλάση αντιβιοτικών	40
Πίνακας 12: Αντιμικροβιακή αντοχή στελεχών <i>E. coli</i> σε όλες τις κλάσεις αντιβιοτικών	41
Πίνακας 13: Πολυανθεκτικά στελέχη <i>E. coli</i> ανα κλάση αντιβιοτικών	41

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Χρήση αντιβιοτικών σε ευρωπαϊκές χώρες το 2009 (ESAC)	16
Διάγραμμα 2: Γραφική απεικόνιση προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής ανθεκτικών στελεχών	39

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	2
1 <i>Escherichia coli</i>	2
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΟ – ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	2
1.2 ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	3
1.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ <i>E. coli</i>	4
1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ	5
1.5 <i>E. coli</i> ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ	6
1.6 ΤΡΟΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ <i>E. coli</i>	8
1.6.1 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ <i>E.coli</i> O157:H7	11
1.6.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ <i>E.coli</i> O157:H7	11
2 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ	12
2.1 ΟΡΙΣΜΟΙ	12
2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	13
2.3 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ... 14	
2.4 ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ 15	
2.5 <i>E. coli</i> ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	16
2.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ .. 17	
2.1.1 ΑΖΤΡΕΟΝΑΜΗ (AZTREONAM).....	17
2.1.2 ΚΕΦΟΤΑΞΙΜΗ (CEFOTAXIME).....	18
2.1.3 ΚΕΦΤΡΙΑΞΟΝΗ (CEFTRIAXONE)	18
2.1.4 ΑΜΟΞΙΚΙΛΛΙΝΗ/ ΚΛΑΒΟΥΛΑΝΙΚΟ ΟΞΥ (AMOXICILLIN/ CLAVULANIC ACID)	18
2.1.5 ΚΕΦΚΙΝΟΜΗ (CEFQUINOME)	19
2.1.6 ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ (AMPICILLIN)	19
2.1.7 ΣΟΥΛΦΑΜΕΘΟΞΑΖΟΛΗ / ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ (SULFAMETHOXAZOLE / TRIMETHOPRIM)	20
3 ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ.....	20
3.1 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΝΩΠΙΟ ΓΑΛΑ.....	20
3.2 ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	22
3.3 ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ <i>E. coli</i> ΜΕ ΤΟ ΓΑΛΑ	24
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	25
4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	25

4.1	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	25
4.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
4.2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ	25
4.3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	28
4.3.1	ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	29
4.3.2	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ <i>E. coli</i>	29
4.3.3	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ..	30
4.3.4	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ <i>E. coli</i> ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	31
4.3.5	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ	31
4.3.6	ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΤΗΣ ΖΩΝΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	32
4.3.7	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	33
5	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
5.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ <i>E. coli</i> ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	35
5.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ <i>E. coli</i> ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	35
6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
7	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	45
8	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ.....	46
9	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Escherichia coli* είναι ένα gram-αρνητικό βακτήριο και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου ανθρώπων και ζώων. Τα στελέχη της *E. coli* τυπικά δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Πολλά στελέχη όμως της *E. coli* εξελίχθηκαν ως ευκαιριακά και τυπικά παθογόνα (Groisman & Ochman, 1996). Τα στελέχη αυτά διαθέτουν την ικανότητα να προκαλούν ένα ευρύ φάσμα νόσων προσβάλλοντας κυρίως το ουροποιητικό και το πεπτικό σύστημα, καθώς και το κεντρικό νευρικό σύστημα του ανθρώπου (Nataro & Kaper, 1998). Πέραν των ανωτέρω, τις τελευταίες δεκαετίες, αρκετά βακτηριακά στελέχη έχουν προοδευτικά καταστεί ανθεκτικά σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (Guilfoile & Alcamo, 2007). Πολλοί διεθνείς οργανισμοί υγείας, όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και το Ινστιτούτο Ιατρικής των Ηνωμένων Πολιτειών, έχουν επίσημα εκφράσει την ανησυχία τους για τους περιβαλλοντικούς και υγειονομικούς κινδύνους των ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά βακτηριδίων που εκτός των άλλων μπορούν να επιφέρουν και σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις (Meyer et al., 2010, Wise et al., 1998).

Τα στελέχη της *E. coli* που είναι ανθεκτικά σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα είναι ιδιαίτερα ανησυχητικά για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως δεδομένου ότι είναι τα πλέον συχνά εμπλεκόμενα βακτήρια σε λοιμώξεις του εντέρου και του ουροποιητικού συστήματος. Μεταξύ των άλλων πηγών, το απαστερίωτο γάλα θεωρείται μια από τις κυριότερες πηγές πολυανθεκτικής σε αντιβιοτικά *E. coli*. Έχει επιβεβαιωθεί ότι περίπου το 7% των *E. coli* που απομονώνονται από το νωπό γάλα έχουν χαρακτηριστεί ως πολυανθεκτικά (Rasheed et al., 2014). Στις Ηνωμένες πολιτείες διεξήχθη μια αναδρομική μελέτη που περιελάμβανε περισσότερα από 8.900 απομονωθέντα βακτήρια από το γάλα, όπου κατέδειξε έναν αυξημένο επιπολασμό των ανθεκτικών στελεχών της *E. coli* στις πενικιλίνες (αμπικιλίνη 21,9%, κεφαλοθίνη 27,9%, κλοξακιλλίνη 99,4%, ερυθρομυκίνη 99,2%) (Makovec and Ruegg, 2003).

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 *Escherichia coli*

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΟ – ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η *E. coli* είναι ένα αρνητικό κατά Gram, βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο, του γένους *Escherichia*, της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών (Enterobacteriaceae), και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου των θηλαστικών (Samanta & Bandyopadhyay 2020). Το γένος *Escherichia* έχει πάρει το όνομά του από τον Theodor Escherich, ο οποίος ήταν ο πρώτος που απομόνωσε τον οργανισμό από δείγμα κοπράνων το 1885. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι περίτριχος και στην πλειοψηφία του κινητός. Το μήκος του κυμαίνεται περί τα 2,0 μm και η διάμετρος του κυμαίνεται μεταξύ 0,25 και 1,0 μm. Ο κυτταρικός του όγκος κυμαίνεται μεταξύ 0,6 και 0,7 μm³, και όπως και άλλα Εντεροβακτηρίδια έχει την ικανότητα παραγωγής προσκολλητινών και συζευκτικών ινιδίων (Tourret, et al, 2016). Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων συμπληρώνεται με την παραγωγή ενός λεπτού ελύτρου στα κινητά στελέχη, που στα ακίνητα διαφοροποιείται σε παχύτερη κάψα (Tourret, et al, 2016).



Εικόνα 1: *E. coli* (Wikipedia)

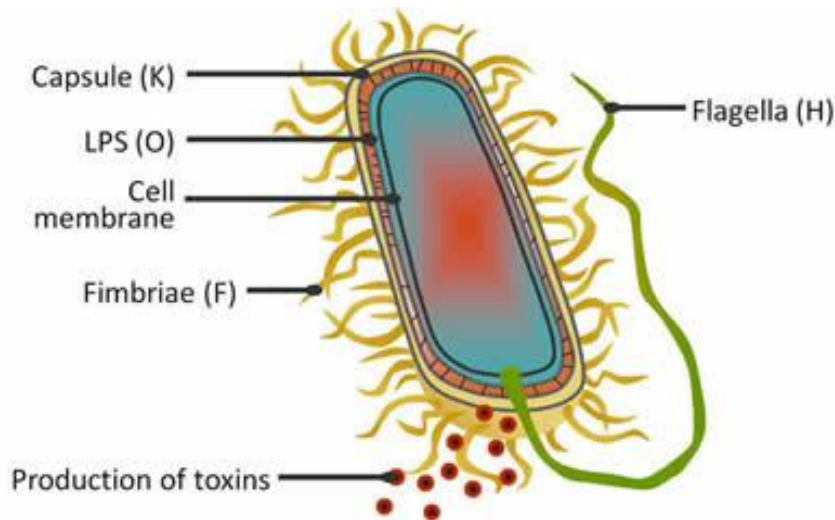
Όπως προαναφέρθηκε, τα περισσότερα στελέχη της *E. coli* είναι δυνητικά ή ευκαιριακά παθογόνοι μικροοργανισμοί, αλλά ορισμένοι ορότυποι μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς παράγοντες λοιμογονικότητας προκαλώντας εντερικές ή εξωεντερικές λοιμώξεις (σηψαιμία, μηνιγγίτιδες, ουρολοιμώξεις κλπ). Τα μη παθογόνα στελέχη, αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου και μπορούν να ωφελήσουν τους ξενιστές τους ενισχύοντας την πέψη στο έντερο με την παραγωγή βιταμίνης Κ προλαμβάνοντας τον αποικισμό του εντέρου από παθογόνα βακτήρια, δημιουργώντας έτσι μια συμβιωτική σχέση (Tourret, et al, 2016, Desmarchelier, & Fegan, 2016). Κύρια οδός μετάδοσης της *E. coli* αποτελεί η εντεροστοματική οδός. Η ανθεκτικότητα και σταθερότητα τους κατά την παραμονή τους στο περιβάλλον, ακόμα και για μεγάλες χρονικές περιόδους, έχουν καταστήσει την *E. coli* δείκτη αναφοράς κοπρανώδους μόλυνσης στο περιβάλλον και τα τρόφιμα (Payne, et al, 2016).

1.2 ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα στελέχη της *E. coli* διαφοροποιούνται ορολογικά σύμφωνα με τρία βασικά αντιγόνα επιφανείας,:

- αντιγόνα Ο-σωματικά
- αντιγόνα Η-βλεφαριδικά
- αντιγόνα Κ-ελύτρου ή κάψας

Μέχρι στιγμής, είναι γνωστοί περίπου 190 ορότυποι (Deatherage, et al, 2017). Η λοίμωξη την οποία προκαλούν πολλά από αυτά τα στελέχη, έχει σα βασική κλινική εικόνα συμπτώματα διάρροιας. Σε υγιείς ενήλικες αυτά τα συμπτώματα υποχωρούν μόνα τους. Για τα παιδιά του αναπτυσσόμενου κόσμου όμως συχνά μια τέτοια λοίμωξη μπορεί να οδηγήσει και στο θάνατο. Οι πλέον λοιμογόνοι ορότυποι, όπως η *E.coli* O157: H7, προκαλούν σοβαρή νόσο ή ακόμη και θάνατο στους ηλικιωμένους, τα νεογνά και γενικά σε ανοσοκατασταλμένα άτομα (Potrykus & Cashel, 2016).



Εικόνα 2: *E. coli* – Επιφανειακά αντιγόνα. (<http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/index.asp>)

1.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ *E. coli*

Τα παθογόνα στελέχη της *E. coli* ταξινομούνται με βάση τη λοιμογονικότητά ως εξής: (Rogers, L et al., 2016):

- **Εντεροπαθογόνος (Enteropathogenic *E. coli* - EPEC):** Τα στελέχη EPEC προκαλούν γαστρεντερίτιδα και έχουν ενοχοποιηθεί για χιλιάδες κρούσματα παιδικής διάρροιας σε χώρες με πολύ κακές συνθήκες υγιεινής. Συχνά αναφέρεται ως «διαρροϊκή *E. coli*» (diarrheagenic *E. coli*).
- **Εντεροτοξινογόνος (Enterotoxigenic *E. coli* - ETEC):** Τα στελέχη της ομάδας της εντεροτοξινογόνου *E. coli* προκαλούν τη λεγόμενη διάρροια των ταξιδιωτών (traveler's diarrhea). Όπως υποδεικνύει και το όνομα της ομάδας αυτής το παθογόνο αίτιο της διάρροιας είναι τοξίνη ή τοξίνες.
- **Εντεροδιδεισδυτική (Enteroinvasive *E. coli* - EIEC):** Τα στελέχη της εντεροδιδεισδυτικής *E. coli* προκαλούν δυσεντερία (dysentery) παρόμοια με αυτή της σιγκέλωσης. Τα βακτήρια της ομάδας αυτής ονομάζονται έτσι διότι έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν στα κύτταρα του επιθηλιακού ιστού.
- **Εντεροδιαχεόμενη (Diffuse - Adhering *E. coli* – DAEC):** Η DAEC προκαλεί διάρροια σε νεαρά άτομα ηλικίας 1-5 χρονών. Ο λόγος που τα άτομα της ηλικίας αυτής είναι ευπρόσβλητα δεν είναι γνωστός.

- **Εντεροσυσσωρευόμενη (Enteroaggregative *E. coli* - EAEC):** Τα στελέχη αυτής της ομάδας προκαλούν συνήθως διάρροια κυρίως σε βρέφη και παιδιά.
- **Εντεροαιμοραγική (Enterohemorrhagic *E. coli* - EHEC):** Ο ορότυπος O157:H7 προκαλεί γαστρεντερίτιδα μέσω τοξινών που παράγει και καλούνται «βεροτοξίνες» (verotoxin – VTI) ή τοξίνες του τύπου «Shiga» (Shiga-like toxins, SLT), διότι μοιάζουν με τις τοξίνες που παράγει το βακτήριο *Shigella dysenteriae*. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο ορότυπος αυτός μπορεί να προκαλέσει νοσηρές καταστάσεις ακόμα και σε πολύ μικρούς αριθμούς 1-15 cfu/g ή ml τροφίμου.

1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η γενετική και φαινοτυπική ποικιλομορφία, αποτελεί χαρακτηριστικό των στελεχών της *E.coli*. Κατά καιρούς η αλληλούχιση του γονιδιώματος απομονωθέντων στελεχών της *E. coli* έχει απασχολήσει τους επιστήμονες καθώς μόνο το 20% των γονιδίων ενός τυπικού γονιδιώματος της *E. coli* ομοιάζει με εκείνο των υπολοίπων στελεχών (Norville, et al, 2016).

Οι διαφοροποιήσεις αυτές τις περισσότερες φορές μπορούν να ανιχνευτούν μόνο σε μοριακό επίπεδο, κάποιες φορές όμως μπορεί να παρουσιάζονται σαν αλλαγές στη φυσιολογία ή στον κύκλο ζωής του μικροοργανισμού. Κάποιο στέλεχος, για παράδειγμα, μπορεί να αναπτύξει την ικανότητα να χρησιμοποιεί μια και μόνο πηγή άνθρακα, να εμφανίζει αντίσταση σε αντιμικροβιακούς παράγοντες ή ακόμα να έχει την ικανότητα να καταλαμβάνει μια συγκεκριμένη οικολογική θέση (McGann, et al, 2016). Όπως προκύπτει από τη χρήση αλληλουχιών ολόκληρου γονιδιώματος, βάσει της οποίας έχουν ταυτοποιηθεί πέντε υποείδη της *E. coli*, η σχέση μεταξύ της φυλογενετικής συγγένειας και της παθογόνου δράσης κάθε οροτύπου είναι δυσδιάκριτη (Potrykus & Cashel, 2016). Το 1997 δημοσιεύθηκε η πρώτη πλήρης αλληλουχία DNA ενός γονιδιώματος *E. coli*. Έκτοτε εκατοντάδες πλήρεις αλληλουχίες γονιδιώματος της *E. coli* είναι διαθέσιμες. Κάθε μεμονωμένο γονιδίωμα περιέχει περίπου 4.000 με 5.500 γονίδια, όμως ο συνολικός αριθμός διαφορετικών γονιδίων μεταξύ όλων των στελεχών της αλληλουχίας της *E. coli* υπερβαίνει τα 16.000 γονίδια. Αυτή η πολύ μεγάλη γονιδιακή ποικιλότητα ερμηνεύει ότι τα δύο τρίτα του γονιδιώματος της *E.coli* προέρχεται από άλλα είδη που προέκυψαν μέσω της διαδικασίας οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (Schmidt, et al, 2016).

1.5 *E. coli* ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Η *E. coli* αποτελεί μέλος και αποικιστή της φυσιολογικής χλωρίδας και κοιλοτήτων του ανθρώπινου σώματος καθώς και των ζώων, ενώ βρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον και στην τροφική αλυσίδα.

Πίνακας 1: Τροφιμογενής προέλευση *E. coli* (Παπαδοπούλου, 2014)

Παθογενετική Ομάδα	Ύποπτα Τρόφιμα
<i>ETEC</i>	<ul style="list-style-type: none">• Τυριά (τύπου Camambert)• Γιαούρτια• Κρέατα και κρεατοσκευάσματα• Νερά
<i>EPEC</i>	<ul style="list-style-type: none">• Βρεφικό γάλα από σκόνη γάλακτος (ανάμιξη με μολυσμένο νερό)• Μαλακά τυριά• Βούτυρο από απαστερίωτο γάλα• Κρύο χοιρινό κρέας• Κρεατόπιτες• Πόσιμο νερό (ατελής χλωρίωση)
<i>EIEC</i>	<ul style="list-style-type: none">• Μαλακά τυριά
<i>VTEC</i>	<ul style="list-style-type: none">• Ωμά κρέατα (μοσχαρίσιο, χοιρινό, αρνίσιο)• Μπιφτέκι (hamburgers), μοσχαρίσιο πατέ• Κρύα προψημένα κρέατα• Φιλέτο γαλοπούλας

Η *E.coli* μπορεί να παραμείνει σταθερή στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα (ακόμη και περισσότερο από 10 εβδομάδες). Η μεταφορά μολυσμένης κοπριάς για λίπανση σε αγροτικές εκτάσεις μπορεί να επιμολύνει το έδαφος καθώς και τα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα (EcL, Reference Laboratory for *E. coli*, <http://www.ec1-lab.ca/en/ecoli/index.asp>).

Η *E. coli* μπορεί να μεταδοθεί σε ζώα μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων ζωοτροφών ή μολυσμένου πόσιμου νερού όπως επίσης και από χειριστή/εργαζόμενο που φέρει το βακτήριο, ακόμη και από μολυσμένα φορτηγά μεταφορών που ενδεχομένως να επισκεφθούν την κτηνοτροφική εκμετάλλευση. (Oliver, 2005, EcL, <http://www.ec1-lab.ca/en/ecoli/index.asp>).

Ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί άμεσα από την επαφή του με το μολυσμένο ζώο είτε από τη στοματική οδό είτε από εισπνοή μολυσμένης σκόνης. Αλλά και έμμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων ή νερού.

Εντερικές λοιμώξεις λόγω ETEC και οίδημα STEC σε χοίρους είναι συχνά μεταδοτικές. Το ίδιο στέλεχος βρίσκεται σε μεγάλους αριθμούς και σε αρκετούς άρρωστους χοίρους και μπορεί να ανιχνευτεί σε διαδοχικές παραγωγές προϊόντων. Αυτά τα στελέχη συνήθως επιβιώνουν μόνο για μερικές ημέρες μετά τη μόλυνση, πιθανώς λόγω της ανάπτυξης ανοσίας. Η μικροχλωρίδα των κοπράνων είναι δεξαμενή για εξωγενείς λοιμώξεις όπως μαστίτιδα και λοίμωξη του ουρογεννητικού συστήματος του ζώου. Τέλος, το στέλεχος EPEC βρίσκεται συνήθως στα έντερα και στα κόπρανα των φυσιολογικών ζώων, αλλά μπορεί να προκαλέσει ασθένεια σε ανοσοκατασταλμένα ζώα (EcL, <http://www.ec1-lab.ca/en/ecoli/index.asp>).

Η πηγή της λοίμωξης μπορεί να είναι ενδογενής (εντερική χλωρίδα, αποικισμός) ή εξωγενής (πάσχων φορέας, τροφιμογενής ή υδατογενής λοίμωξη) (Eden, 2014).

Τα κοινά σημεία και συμπτώματα των λοιμώξεων του γαστρεντερικού περιλαμβάνουν πυρετό, κοιλιακό άλγος, διάρροιες, εμέτους και σε σπανιότερες περιπτώσεις νέκρωση και διάτρηση του εντέρου, περιτονίτιδα και σηψαιμία. Αν και η μεγαλύτερη επίπτωση αφορά στις ακραίες ηλικίες και σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, υγιείς όλων των ηλικιακών ομάδων διατρέχουν κίνδυνο λοίμωξης ποικίλης προέλευσης (Πίνακας 2) (McGann, et al, 2016).

Πίνακας 2: Κλινικά σύνδρομα από *E. coli* (Αρσένη, 1994)

Εντόπιση Λοίμωξης	Κλινικό Σύνδρομο
ΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	<i>Γαστρεντερίτιδα βρεφών (EPEC), Χολεροειδής εντερίτιδα (ETEC), Νόσος ταξιδιωτών (ETEC), Δυσεντεροειδές σύνδρομο (EIEC), Αιμορραγική κολίτιδα (VTEC), Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (VTEC)</i>
ΕΞΩΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	<i>Ουρολοίμωξη, Ευκαιριακές λοιμώξεις, Λοιμώξεις ΚΝΣ, Σηψαιμία, Ενδοτοξική καταπληξία, Πυώδεις φλεγμονές, Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο</i>

Ορισμένα στελέχη της *E. coli* ευθύνονται για σοβαρές λοιμώξεις, όπως για παράδειγμα το O157:H7 που προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Hemolytic - Uremic Syndrome, HUS) ως συνέπεια της δράσης της παραγόμενης Vero-τοξίνης (VT) ή τοξίνης τύπου Shiga (SLT). Οι λοιμώξεις αυτές εμφανίζονται είτε ως σποραδικά κρούσματα είτε σπανιότερα ως περιορισμένες ή εκτεταμένες επιδημίες. Σε αντίθεση με τα περισσότερα στελέχη της *E. coli* που αποτελούν τμήμα της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, η VT προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση στα κύτταρα-στόχους του εντέρου και τελικά οξεία νεφρική ανεπάρκεια, θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία. Σε ποσοστό 25% των ασθενών με HUS, εμφανίζονται επιπλοκές στο ΚΝΣ (Watson, et al, 2016).

1.6 ΤΡΟΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ *E. coli*

Η *E. coli* απομονώνεται τόσο από κλινικά δείγματα όσο και από τρόφιμα και ύδατα. Όπως όλα τα εντεροβακτηριοειδή, η *E. coli* καλλιεργείται εύκολα στο εργαστήριο γι' αυτό και αποτελεί έναν από τους πιο συχνά μελετώμενους μικροοργανισμούς με εφαρμογές στους τομείς της βιοτεχνολογίας και της εφαρμοσμένης μικροβιολογίας, καθώς και σε ερευνητικές μελέτες με ανασυνδυασμένο DNA (Eden, 2014).

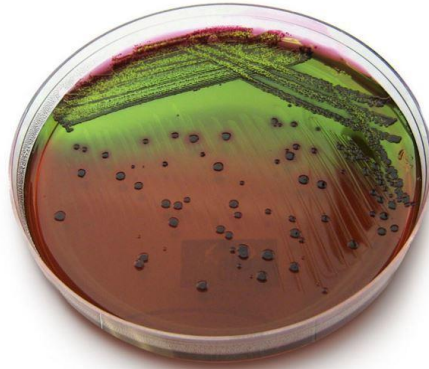
Βέλτιστη ανάπτυξη της *E. coli* παρατηρείται σε θερμοκρασία 37°C, αλλά πολλά στελέχη μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε υψηλές θερμοκρασίες έως 49°C (Bell & Kyriakides, 2009). Αναπτύσσεται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υποστρώματα και σε αρκετά εκλεκτικά, βασικά συστατικά των οποίων αποτελούν μια ποικιλία θρεπτικών συστατικών. Στο MacConkey Agar που περιέχει πεπτόνη, λακτόζη, χολικά άλατα,

χλωριούχο νάτριο, ουδέτερο ερυθρό και κρυσταλλικό ιώδες, σχηματίζει ερυθρές αποικίες από τη ζύμωση της λακτόζης με ταυτόχρονη αλλαγή του χρώματος του δείκτη (ουδέτερου ερυθρού) (Chaudhary, 2014; Yang & Wang, 2014). Άλλα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια της είναι το Levine's Eosin-Methylene Blue Agar το οποίο περιέχει πεπτόνη, λακτόζη, άγαρ, κυανό του μεθυλενίου, φωσφορικό κάλιο και ηωσίνη, όπου η *E. coli* σχηματίζει πρασινόμαυρες αποικίες με χαρακτηριστικό μαύρο κέντρο. Ακόμη, ένα συχνά χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα είναι το Tryptone Bile Agar το οποίο περιέχει τρυπτόνη, χολικά άλατα, άγαρ και X-γλουκουρονίδιο όπου εξαιτίας αυτού του χρωμογόνου παράγοντα έχουμε την παρουσία χαρακτηριστικών μπλε/πράσινων αποικιών της *E. coli*. (Hansen and Yourassowsky, 1984).

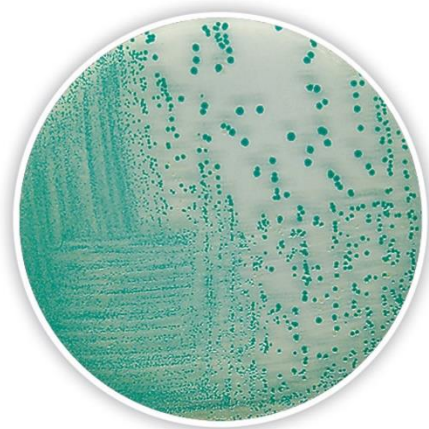
Συχνά, πριν από την εφαρμογή των μεθόδων απομόνωσης μπορεί να μεσολαβεί και κάποιο στάδιο προεμπλουτισμού με σκοπό την επούλωση και ενδυνάμωση των τυχόν τραυματισμένων κυττάρων, και την αύξηση του πληθυσμού τους, ώστε να τον καταστήσει ανιχνεύσιμο. Για την απομόνωση της *E.coli* τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα προεμπλουτιστικά μέσα είναι το Tryptone Soy Broth και το MacConkey Broth. Το μέσο Tryptone Soy Broth έχει την ικανότητα να αναπτύσσει ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων. Για να αυξηθεί η εκλεκτικότητα του μέσου αυτού, υπάρχει η δυνατότητα τροποποίησής του με προσθήκη ανασταλτικών παραγόντων. Το MacConkey Broth από την άλλη αποτελεί εκλεκτικό μέσο ανίχνευσης των εντεροβακτηριδίων. Ο χρωμογόνος παράγοντας μώβ βρωμοκρεσόλη που περιέχει έχει την ικανότητα να αλλάζει χρώμα στο μέσο (από μωβ σε κίτρινο) όταν αναπτυχθεί σε αυτό κάποιο στέλεχος της *E. coli*.



Εικόνα 3: Χαρακτηριστικές αποικίες της *E. coli* σε MacConkey Agar
(<http://universe84a.com/enterobacteriaceae/>)



Εικόνα 4: Χαρακτηριστικές αποικίες *E. coli* σε Eosin Methylene Blue Agar (<https://microbeonline.com>)



Εικόνα 5: Χαρακτηριστικές αποικίες *E. coli* σε Tryptone Bile Agar (<https://www.carlroth.com>)

Επιπλέον ο ορότυπος *E.coli* O157:H7, αναπτύσσεται σε MacConkey Agar με σορβιτόλη, δίνοντας άχρωμες σορβιτόλη-αρνητικές αποικίες, αφού σε αντίθεση με τους υπόλοιπους ορότυπους δεν ζυμώνει τη σορβιτόλη. Η ανάπτυξη της *E.coli* επιτυγχάνεται τόσο αεροβίως, όσο και αναεροβίως, γεγονός που επιτρέπει την επιβίωσή της σε περιβάλλοντα με χαμηλή περιεκτικότητα έως και απουσία οξυγόνου (π.χ. υδάτινα οικοσυστήματα) (Kamartharu, et al., 2016). Επίσης μια σειρά βιοχημικών δοκιμασιών καθιστούν δυνατή τη διάκριση του είδους από άλλα εντεροβακτηριοειδή, καθώς και βιότυπους του ίδιου είδους (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Κυριότερες βιοχημικές ιδιότητες *E. coli* (De Boer,1999).

Κύριες Βιοχημικές Ιδιότητες <i>E.coli</i>	Αντίδραση
ΙΝΔΟΛΗ	ΘΕΤΙΚΗ
ΚΑΤΑΛΑΣΗ	ΘΕΤΙΚΗ
ΓΛΥΚΟΖΗ/ ΑΕΡΙΟ	ΘΕΤΙΚΗ
ΛΑΚΤΟΖΗ	ΘΕΤΙΚΗ
METHYL RED	ΘΕΤΙΚΗ
VOGES PROSKAUER	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
INORGANIC PYROPHOSPHATASE (PPA)	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
ΛΥΣΙΝΗ	ΘΕΤΙΚΗ
ΚΙΤΡΙΚΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
O-NITROPHENOL-β-GALACTOSIDASE (ONPG)	ΘΕΤΙΚΗ

1.6.1 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ *E.coli* O157:H7

Οι μέθοδοι που προτείνονται είναι μέθοδοι ELISA και στοχεύουν στην ανίχνευση των shiga τοξινών Stx1 και Stx2, και των αντιγόνων O157 που βρίσκονται στο στρώμα των λιποπολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος του παθογόνου. Οι μέθοδοι αυτοί είναι πιο σύντομες, αλλά δεν επιτρέπουν την απομόνωση του παθογόνου και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του (Bell & Kyriakides, 2009).

1.6.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ *E.coli* O157:H7

Οι μέθοδοι αυτοί στηρίζονται στην χρήση PCR για την ενίσχυση και ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων του παθογόνου, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη σύνθεση των τοξινών Shiga. Επίσης άλλες μέθοδοι προτείνουν την ταυτόχρονη ενίσχυση και ανίχνευση περισσότερων γονιδίων με τη βοήθεια περισσότερων ζευγών εκκινητών (multiplex-PCR). Με την τελευταία μεθοδολογία γίνεται συνδυασμός των

θετικών σημάτων και πιθανή ανίχνευση στελεχών που παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες, όπως παράγωγά τοξίνης αλλά διαφορετικών αντιγονικών τύπων (Louie, et al., 2000). Συχνά στις μεθόδους αυτές για να αυξηθεί η ευαισθησία τους, προτείνεται και κάποιο στάδιο εμπλουτισμού πριν από την απομόνωση του DNA από το δείγμα.

2 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ

Η εμφάνιση των αντιμικροβιακών φαρμάκων έφερε επανάσταση στον κλάδο της ιατρικής, βελτιώνοντας τη ζωή τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων δίνοντας λύση στη θεραπεία των λοιμωδών νοσημάτων. Η προσαρμοστικότητα όμως των μικροοργανισμών και οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που προέβαλαν έναντι των αντιμικροβιακών φαρμάκων σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μετά τη χρήση τους, έφερε στην επιφάνεια ένα άλλο μείζον πρόβλημα για τη δημόσια υγεία και την υγεία των ζώων, το φαινόμενο της αντιμικροβιακής αντοχής. Το φαινόμενο αυτό, αν και δεν είναι πρόσφατο, παρουσιάζει ραγδαία εξέλιξη τις τελευταίες δεκαετίες και προκαλεί ανησυχία σε όλο τον κόσμο καθώς καθιστά αναποτελεσματικές τις θεραπευτικές αγωγές σε λοιμώξεις που προέρχονται από ανθεκτικά βακτήρια (Economou et. al, 2019).

2.1 ΟΡΙΣΜΟΙ

Αντιμικροβιακή αντοχή ορίζεται ως η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να πολλαπλασιάζεται, ενώ θα έπρεπε να αναστέλλεται η ανάπτυξη και η δράση του κατά την παρουσία ενός αντιμικροβιακού παράγοντα. Η προσαρμοστικότητα αυτή των μικροοργανισμών αποτελεί την ασπίδα επιβίωσης τους έναντι ανταγωνιστικών μικροβίων ή ξενιστών.

Ενδογενής αντοχή ορίζεται η εγγενής αντοχή που κωδικοποιείται και εκφράζεται από την πλειοψηφία των στελεχών ενός συγκεκριμένου βακτηριακού είδους.

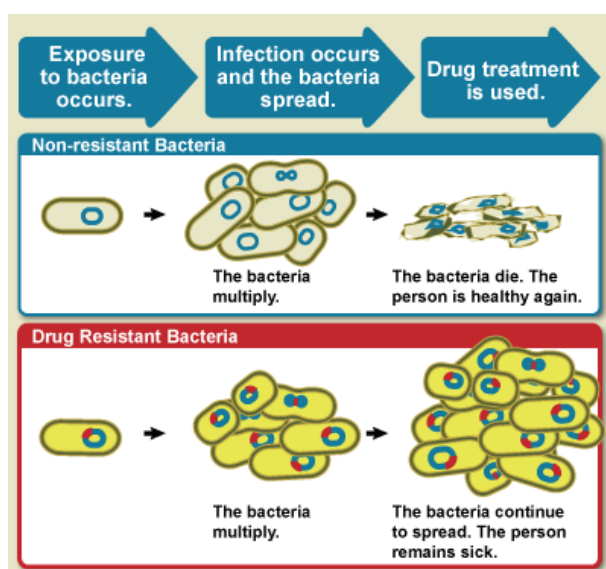
Επίκτητη αντοχή ορίζεται η εμφάνιση αλλαγών στο γενετικό υλικό του βακτηρίου είτε μέσω γονιδιακής μετάλλαξης που προϋπάρχει, είτε μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Με αυτό το μηχανισμό μπορεί να εμφανιστούν αλλαγές της έκφρασης των πρωτεϊνών που μπορεί να σημάνουν δομικές και λειτουργικές αλλαγές στο συγκεκριμένο βακτήριο, καθιστώντας το ανθεκτικό σε κάποιον αντιμικροβιακό

παράγοντα. Αυτές οι αλλαγές αφορούν μόνο επιλεγμένα στελέχη και όχι όλο το είδος του μικροοργανισμού (Χατζηδημητρίου, 2006).

2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

Μερικοί από τους κυριότερους μηχανισμούς αντοχής ενός μικροοργανισμού έναντι ενός αντιμικροβιακού παράγοντα είναι οι εξής:

1. Αναστολή δράσης με παραγωγή αδρανοποιητικών ενζύμων (πχ. Υδρολυτική εξουδετέρωση από τις β-λακταμάσες, του β-λακταμικού δακτυλίου των κεφαλοσπορινών και των πενικιλινών).
2. Τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιμικροβιακού στον μικροοργανισμό.
3. Αποτυχία του αντιμικροβιακού να φτάσει στο στόχο του. Αυτό επιτυγχάνεται είτε λόγω της μειωμένης πρόσληψης του αντιμικροβιακού είτε λόγω της μείωσης της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης.
4. Ενεργοποίηση της αντλίας εξώθησης του αντιμικροβιακού με αντλίες εκροής (efflux pump) (Walsh & Wencewicz, 2016).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση διαφόρων ανθεκτικών και μη ανθεκτικών βακτηρίων. (www.niaid.nih.gov)

Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται σχηματικά η διαφορά μεταξύ ανθεκτικών και μη ανθεκτικών βακτηρίων στη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων. Τα μη ανθεκτικά βακτήρια πολλαπλασιάζονται και αφού έρθουν σε επαφή με το αντιμικροβιακό παράγοντα τα βακτήρια πεθαίνουν. Τα ανθεκτικά βακτήρια πολλαπλασιάζονται και εκείνα, αλλά μετά την επαφή τους με το αντιμικροβιακό παράγοντα, συνεχίζουν να εξαπλώνονται.

2.3 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ

Η αλόγιστη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων τόσο στον τομέα της ιατρικής όσο και της κτηνιατρικής, έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην συνεχή αύξηση του αριθμού των ανθεκτικών στελεχών. Ειδικά στον τομέα της κτηνιατρικής, η ανάδυση του προβλήματος της αντοχής έναντι των αντιμικροβιακών φαρμάκων μπορεί εν δυνάμει να επιφέρει μεγαλύτερους κινδύνους και για τη δημόσια υγεία καθώς η ανθεκτικότητα των εντερικών παθογόνων, των οποίων ο ζωικός πληθυσμός αποτελεί δεξαμενή, ολοένα και αυξάνεται (Economou et. al, 2019). Σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) και τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) των Η.Π.Α., η μη ορθολογική χρήση αντιμικροβιακών στην κτηνοτροφία ευθύνεται για την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών των κυριότερων παθογόνων βακτηρίων όπως οι σαλμονέλες, τα καμπυλοβακτηρίδια, η λιστέρια και η *E. coli*. (FDA, 2009).

Στην εποχή μας η διαφύλαξη της αποτελεσματικότητας των αντιμικροβιακών αποτελεί άμεση και αδήριτη ανάγκη, αλλά και χρέος μας για τις επόμενες γενιές. Στα πλαίσια της αναγκαιότητας διατήρησης της αποτελεσματικότητας κάποιων αντιμικροβιακών φαρμάκων ιδιαίτερης σημασίας στην ιατρική πράξη, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) έχει κατατάξει τα αντιβιοτικά με βάση τη σπουδαιότητά τους στις παρακάτω κατηγορίες:

- Κρίσιμης σημασίας, για ανθρώπινη χρήση
- Εξαιρετικής σημασίας για τον άνθρωπο
- Σημαντικά για τους ανθρώπους

Προσπάθεια κατεύθυνσης των κτηνιάτρων για ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών έκανε και η EMA (European Medicines Agency). Η ειδική ομάδα εμπειρογνομόνων συμβούλων για την αντιμικροβιακή αντοχή (Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert

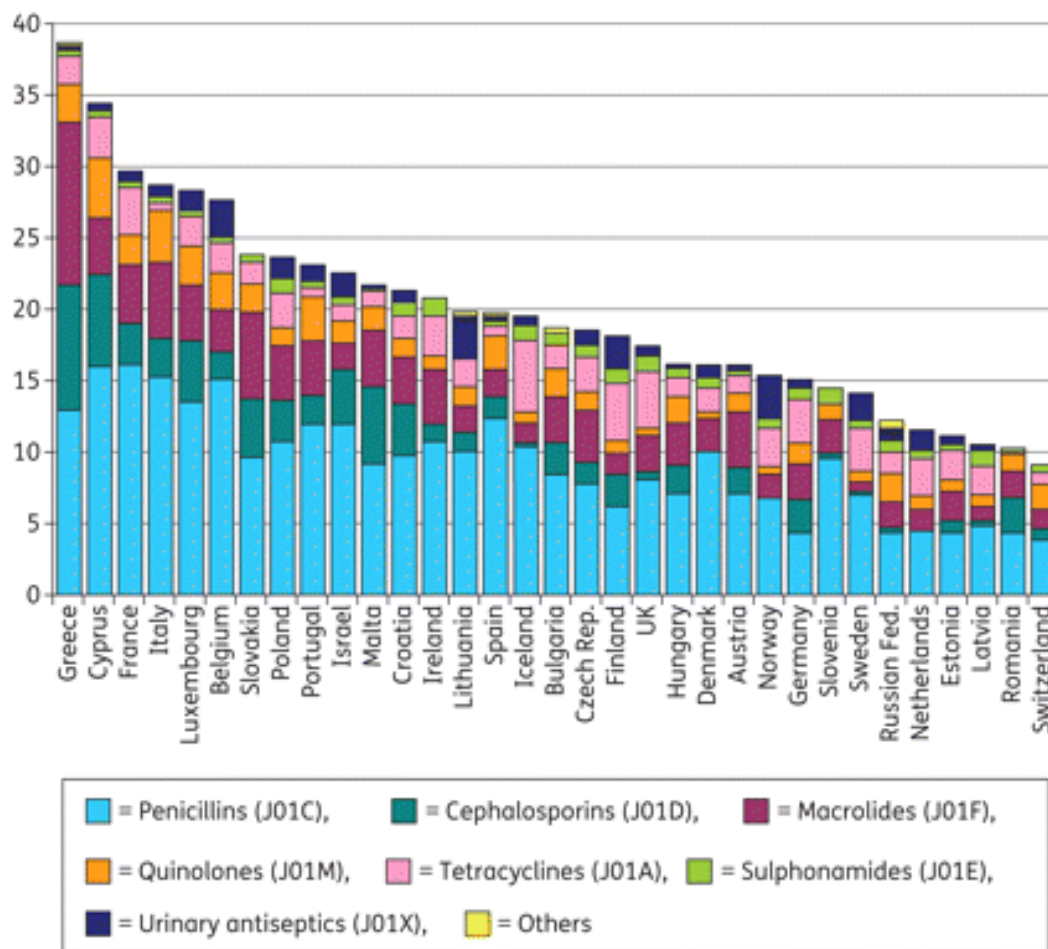
Group, AMEG) έχει κατηγοριοποιήσει τα αντιβιοτικά με βάση τις πιθανές συνέπειες για τη δημόσια υγεία λόγω της αυξανόμενης αντιμικροβιακής αντοχής όταν χρησιμοποιούνται σε ζώα και της ανάγκης χρήσης τους στην κτηνιατρική. Η κατηγοριοποίηση φιλοδοξεί να γίνει εργαλείο υποστήριξης της λήψης αποφάσεων, από τους κτηνιάτρους οι οποίοι θα αποφασίσουν για την επιλογή του κατάλληλου αντιβιοτικού. Ο πίνακας με την κατηγοριοποίηση των αντιμικροβιακών φαρμάκων παρατίθεται στο Παράρτημα 1 και η επεξήγηση των κατηγοριών στο Παράρτημα 2.

2.4 ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Στη χώρα μας η εξάπλωση πολυανθεκτικών οργανισμών αποτελεί ένα μείζον πρόβλημα. Το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης της Κατανάλωσης Αντιμικροβιακών (European Surveillance of Antimicrobial Consumption, ESAC) κατατάσσει την Ελλάδα στις πρώτες θέσεις στην ανάπτυξη αντίστασης στα αντιβιοτικά (<https://doi.org/10.1093/jac/dkr453>).

Η χώρα μας έχει υψηλά ποσοστά μικροβιακής αντοχής κυρίως λόγω των παρακάτω:

- Στα νοσοκομεία, δεν εφαρμόζεται η επιτήρηση της χρήσης των αντιμικροβιακών (antibiotic stewardship) γεγονός που προκαλεί μεγάλα προβλήματα εντείνοντας το φαινόμενο της αντοχής. Η προληπτική χορήγηση αντιμικροβιακών από τους γιατρούς σε ασθενείς χωρίς να συντρέχει κάποιος ουσιαστικός λόγος, έχει οδηγήσει σε υπερβολική και μη απαραίτητη χρήση τους. Ακόμη, στην Ελλάδα πολλοί είναι οι ασθενείς που καταναλώνουν άκριτα αντιμικροβιακά θεωρώντας ότι αποτελούν πανάκεια για μεγάλο εύρος παθήσεων όπως η γρίπη και το κρυολόγημα. Αυτή η νοοτροπία σε συνδυασμό με τη μη τήρηση του θεραπευτικού κύκλου της αντιμικροβιακής θεραπείας είναι παράγοντες που οδηγούν στην μικροβιακή αντίσταση. (Ελεσνίτσαλης, 2019)
- Ανεπαρκείς διαδικασίες ελέγχου λοιμώξεων στα νοσοκομεία. Περιορισμένο φαίνεται να είναι στα νοσοκομεία, το απαραίτητο προσωπικό όπως π.χ. λοιμωξιολόγοι ή νοσηλευτές ελέγχου λοιμώξεων. Επίσης, μεγάλη σημασία θα πρέπει να δοθεί στα μέτρα προφύλαξης επαφής, όπως ποδιές γάντια και απολύμανση.



Διάγραμμα 1: Χρήση αντιβιοτικών σε ευρωπαϊκές χώρες το 2009 (ESAC)

2.5 *E. coli* ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Τα τελευταία χρόνια τα ποσοστά αντοχής της *E. coli* έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων ολοένα αυξάνονται, ειδικά σε ότι αφορά τα β-λακταμικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πλειοψηφία των ανθεκτικών στελεχών προέρχεται κυρίως από την κοινότητα και σε ένα μικρό ποσοστό από το νοσοκομειακό περιβάλλον. Από στοιχεία που ελήφθησαν από το ΚΕΕΛΠΝΟ (2017) φαίνεται ότι το 41,5% των κολοβακτηριδίων που απομονώνονται από ασθενείς της κοινότητας εμφανίζουν αντοχή στην αμπικιλλίνη, το 22,7% στην κοτριμοξαζόλη, το 12,6% στις κινολόνες, ενώ το 7,5% παράγει εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum Beta-Lactamases, ESBL) προσδίδοντας αντοχή σχεδόν σε όλες τις κεφαλοσπορίνες.

Το πρόβλημα της αντοχής στα αντιμικροβιακά φάρμακα φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο τις αναπτυσσόμενες χώρες αλλά παράλληλα εξακολουθεί να αποτελεί μείζον πρόβλημα και για τις αναπτυγμένες χώρες. Σε μεγάλο αριθμό κοτόπουλων που εκτρέφονται στις Ηνωμένες Πολιτείες και στον Καναδά χορηγούνται κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς. Όταν ο Food & Drug Administration (FDA) προσπάθησε να περιορίσει τη χρήση των κεφαλοσπορινών στα πουλερικά, αντιμετώπισε δυσανασχέτηση από κλάδους τόσο της γεωργίας όσο και της φαρμακοβιομηχανίας οδηγώντας σε προσωρινή ματαίωση της απόφασης αυτής (Schmidt, et al, 2016). Οι φθοριοκινολόνες σταμάτησαν να εφαρμόζονται στα πουλερικά στις ΗΠΑ χωρίς σημαντικό αντίκτυπο στην παραγωγή. Παράλληλα, το ποσοστό αντοχής των στελεχών της *E. coli* που απομονώνονται από τρόφιμα ζωικής προέλευσης στις φθοριοκινολόνες είναι σχεδόν μηδενικό, ενώ το αντίστοιχο κλινικών στελεχών δεν υπερβαίνει το 5%, παρά τη χρήση τους τόσο σε ασθενείς όσο και σε κατοικίδια ζώα για τουλάχιστον δύο δεκαετίες, καταδεικνύοντας τη δυναμική μετάδοσης της αντιμικροβιακής αντοχής μέσω της τροφικής αλυσίδας (McGann, et al, 2016).

Αντίθετα, στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου οι πόροι, οι έλεγχοι και η επιτήρηση είναι κατά κύριο λόγο ανεπαρκείς, παρατηρείται ταχεία αύξηση των ανθεκτικών στελεχών στις κινολόνες και των ESBL *E. coli* (Deatherage, et al, 2017).

Στελέχη ανθεκτικών εντεροβακτηριοειδών έχουν απομονωθεί από ανθρώπους και παραγωγικά ζώα, αλλά η δυνατότητα μετάδοσης αυτών των στελεχών και / ή των γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ ζώων, ανθρώπων και περιβάλλοντος δεν έχει διευκρινισθεί (Deatherage, et al, 2017).

2.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

2.1.1 ΑΖΤΡΕΟΝΑΜΗ (AZTREONAM)

Η αζτρεονάμη ανήκει στην κατηγορία των μονοβακταμών. Παρουσιάζει δραστηριότητα κυρίως κατά των gram αρνητικών βακτηρίων που είναι ανθεκτικά σε αντιμικροβιακά που υδρολύονται από βήτα-λακταμάσες με ισχυρή και ειδική δραστηριότητα κατά της *Pseudomonas aeruginosa*. Δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη δραστηριότητα κατά των gram θετικών βακτηρίων. Είναι δραστικό έναντι πολλών στελεχών που είναι πολλαπλά ανθεκτικά σε άλλα αντιμικροβιακά, όπως ορισμένες κεφαλοσπορίνες, πενικιλίνη και αμινογλυκοσίδες. Η αζτρεονάμη διατηρεί την αντιμικροβιακή δραστηριότητα της σε εύρος pH από 6 έως 8 in vitro, καθώς και υπό

αναερόβιες συνθήκες (www.drugbank.ca). Στον πίνακα της EMA κατατάσσεται στην κατηγορία Α (Παράρτημα 1).

2.1.2 ΚΕΦΟΤΑΞΙΜΗ (CEFOTAXIME)

Η κεφοταξίμη είναι ένα αντιβιοτικό που ανήκει στην κατηγορία των κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς. Έχει δραστικότητα σε ευρύ φάσμα gram αρνητικών βακτηρίων κυρίως, όπως τα εντεροβακτηριοειδή, καθώς και gram αρνητικών βακτηριδίων ανθεκτικών στις κεφαλοσπορίνες α' και β' γενεάς. Η κεφοταξίμη δρα αναστέλλοντας τη βιοσύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Ένα θετικό χαρακτηριστικό της κεφοταξίμης είναι ότι εμφανίζει ανθεκτικότητα έναντι των πενικιλινασών και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων από μικροοργανισμούς ανθεκτικούς στα παράγωγα της πενικιλίνης (www.drugbank.ca).

2.1.3 ΚΕΦΤΡΙΑΞΟΝΗ (CEFTRIAXONE)

Η κεφτριαξόνη είναι ένα αντιβιοτικό β-λακτάμης και ανήκει στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς που χρησιμοποιείται στη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων που προκαλούνται συνήθως από gram θετικούς οργανισμούς. Η κεφτριαξόνη έχει in vitro δραστικότητα έναντι των θετικών κατά gram και αρνητικών κατά gram αερόβιων και αναερόβιων βακτηριδίων. Η βακτηριοκτόνος δράση της κεφτριαξόνης προκύπτει από την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (www.drugbank.ca).

2.1.4 ΑΜΟΞΙΚΙΛΛΙΝΗ/ ΚΛΑΒΟΥΛΑΝΙΚΟ ΟΞΥ (AMOXICILLIN/ CLAVULANIC ACID)

Η αμοξικιλίνη ανήκει στην κατηγορία των αντιβιοτικών β-λακτάμης. Έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι περιορισμένης γκάμας αρνητικών κατά gram βακτηρίων, ενώ παρουσιάζει μέτρια δραστικότητα έναντι ευρείας γκάμας gram

θετικών βακτηρίων. Η συχνή χρήση της αμοξικιλίνης μπορεί να αποδοθεί στην πολύ καλή της απορρόφηση κατά την χορήγησή της από το στόμα.

Η συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών οργανισμών παραγωγής β-λακταμάσης, συμπεριλαμβανομένης της *E.coli*, φαίνεται να αυξάνεται. Η αμοξικιλίνη συνδυάζεται ενίοτε με κλαβουλανικό οξύ, έναν αναστολέα β-λακταμάσης, για την αύξηση του φάσματος δράσης κατά gram αρνητικών οργανισμών και για την αντιμετώπιση της βακτηριακής αντίστασης στα αντιβιοτικά που προκαλείται από την παραγωγή β-λακταμάσης. Το κλαβουλανικό οξύ απενεργοποιεί ορισμένα ένζυμα βήτα-λακταμάσης που παράγονται από τα βακτήρια, αποτρέποντας έτσι την ενζυματική καταστροφή της αμοξικιλίνης. Η προσθήκη κλαβουλανικού οξέος βοηθά στη θεραπεία ποικιλίας βακτηριακών λοιμώξεων που διαφορετικά θα ήταν ανθεκτικές στα αντιβιοτικά (www.drugbank.ca). Στον πίνακα της EMA κατατάσσεται στην κατηγορία C (Παράρτημα 1).

2.1.5 ΚΕΦΚΙΝΟΜΗ (CEFQUINOME)

Το κεφκινόμη είναι μια κεφαλοσπορίνη τέταρτης γενιάς με φαρμακολογικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες που είναι πολύτιμες για τη θεραπεία της μαστίτιδας που προκαλούν τα κολοβακτηρίδια και άλλων μολύνσεων. Χρησιμοποιείται μόνο σε κτηνιατρικές εφαρμογές. (www.drugbank.ca). Στον πίνακα της EMA κατατάσσεται στην κατηγορία B (Παράρτημα 1).

2.1.6 ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ (AMPICILLIN)

Η αμπικιλίνη είναι αντιβιοτικό βήτα-λακτάμης και ανήκει στην οικογένεια των πενικιλινών. Έχει in vitro δραστικότητα έναντι των θετικών κατά gram και αρνητικών κατά gram αερόβιων και αναερόβιων βακτηριδίων. Η βακτηριοκτόνος δράση της προκύπτει από την αναστολή της σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος. Η αμπικιλίνη είναι σταθερή κατά της υδρόλυσης από μια ποικιλία βήτα-λακταμασών, συμπεριλαμβανομένων των πενικιλινασών, των κεφαλοσποριναςών και των βήτα-λακταμασών εκτεταμένου φάσματος (www.drugbank.ca). Στον πίνακα της EMA κατατάσσεται στην κατηγορία D (Παράρτημα 1).

2.1.7 ΣΟΥΛΦΑΜΕΘΟΞΑΖΟΛΗ / ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ (SULFAMETHOXAZOLE / TRIMETHOPRIM)

Η σουλφαμεθοξαζόλη είναι ένα φάρμακο σουλφοναμίδης που αναστέλλει τη βακτηριακή σύνθεση του διυδροφυλλικού οξέος διότι ανταγωνίζεται το παρααμινοβενζοϊκό οξύ (PABA), προκαλώντας βακτηριόσταση.

Η αναστολή της σύνθεσης του διυδροφυλλικού οξέος μειώνει τη σύνθεση των βακτηριακών νουκλεοτιδίων και του DNA. Η σουλφαμεθοξαζόλη χορηγείται κανονικά σε συνδυασμό με την τριμεθοπρίμη, έναν αναστολέα της διυδροφυλλικής αναγωγής, που αναστέλλει τη μείωση του διυδροφυλλικού οξέος σε τετραυδροφυλλικό οξύ. Μελέτες έχουν δείξει ότι η βακτηριακή αντίσταση αναπτύσσεται πιο αργά με το συνδυασμό των δύο φαρμάκων παρά με την τριμεθοπρίμη ή τη σουλφαμεθοξαζόλη ξεχωριστά (www.drugbank.ca). Στον πίνακα της EMA κατατάσσεται στην κατηγορία D (Παράρτημα 1).

3 ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Το γάλα κατέχει ξεχωριστή θέση τόσο ανάμεσα στα υπόλοιπα ζωικά τρόφιμα όσο και στα φυτικά, αφού αποτελεί την αποκλειστική τροφή για τον άνθρωπο και για πολλά άλλα θηλαστικά ζώα κατά το πρώτο στάδιο της ζωής τους. Από αυτό συμπεραίνεται ότι το γάλα περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται ένας νέος οργανισμός για να αναπτυχθεί ή να μειώσει τους κινδύνους πολλών θρεπτικών ανεπαρειών (Kalkwarf et al., 2003, Marshall κ.ά., 2003).

3.1 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΝΩΠΟ ΓΑΛΑ

Τα κριτήρια του Κανονισμού 853/2004 για το νωπό γάλα εφαρμόζονται στο πλαίσιο ειδικότερης νομοθεσίας σχετικά με την ποιότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Θα πρέπει να εξετάζεται αντιπροσωπευτικός αριθμός δειγμάτων νωπού γάλακτος που λαμβάνονται με τυχαία δειγματοληψία από γάλα το οποίο συλλέγεται από εγκαταστάσεις γαλακτοπαραγωγής. Οι έλεγχοι μπορούν να γίνονται από ή για λογαριασμό:

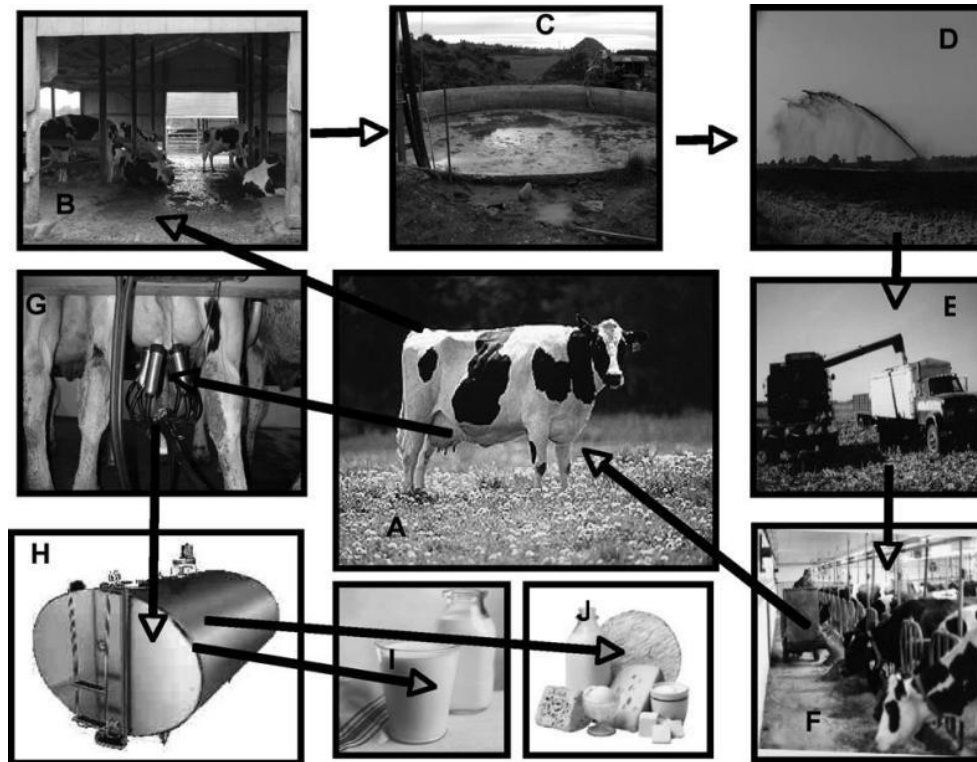
1. Του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων, η οποία παράγει το γάλα
2. Του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων, η οποία συλλέγει ή μεταποιεί το γάλα

3. Μιας ομάδας υπευθύνων επιχειρήσεων τροφίμων
4. Στο πλαίσιο εθνικού ή περιφερειακού προγράμματος ελέγχου

Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να εφαρμόζουν διαδικασίες, ώστε το νωπό γάλα να ανταποκρίνεται στα κριτήρια του Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Όρια ελέγχων νωπού αγελαδινού γάλακτος (Κανονισμός ΕΚ 853/2004)

Είδος Εξέτασης	Συχνότητα	Όρια
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)	Δύο φορές το μήνα	≤ 100.000 cfu/ml γάλακτος
Αντιμικροβιακοί Παράγοντες	Μία φορά το μήνα	Απουσία
Σωματικά κύτταρα	Μία φορά το μήνα	≤ 400.000 κύτταρα/ml γάλακτος



Εικόνα 7: Ο κύκλος των τροφιμογενών και κτηνιατρικών παθογόνων στο περιβάλλον των γαλακτοκομικών εκμεταλλεύσεων και η μεταφορά τους στο γάλα. (Α) Ανάπτυξη του παθογόνου παράγοντα στην αγελάδα. (Β) Διάδοση στο άμεσο περιβάλλον της αγελάδας μέσω κοπράνων, (C) Συσώρευση περιττωμάτων, (D) Διανομή κοπριάς αγελάδων σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις, (E) Οι καλλιεργείες μολύνονται με παθογόνα, (F) Μολυσμένες ζωοτροφές που καταναλώνονται από αγελάδες, (G) Το γάλα μπορεί να μολυνθεί από παθογόνα κατά την διάρκεια της άμελξης, (H) Τα παθογόνα εισέρχονται σε γάλα δεξαμενής χύδην, (I, J) Μη παστεριωμένο γάλα, τυρί και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται από μη παστεριωμένο γάλα και καταναλώνεται από τον άνθρωπο (Oliver, 2005).

3.2 ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ

Το γάλα συντίθεται σε εξειδικευμένα κύτταρα του μαστικού αδένου και είναι σχεδόν αποστειρωμένο όταν εκκρίνεται στις κυψελίδες του μαστού (Tolle A., 1980). Τρεις είναι οι κυριότερες πηγές μικροβιακής μόλυνσης του γάλακτος :

1. Ο μαστός
2. Η εξωτερική επιφάνεια του μαστού
3. Ο εξοπλισμός άμελξης, αποθήκευσης και μεταφοράς του γάλακτος

Η τήρηση των καλών πρακτικών υγιεινής σε όλα τα στάδια επεξεργασίας του γάλακτος είναι επιβεβλημένη (De Silva, et.al, 2016). Μερικοί από τους βασικότερους κανόνες καλής πρακτικής αναφέρονται παρακάτω:

- Διατήρηση καθαρού και υγιούς ζώου
- Διατήρηση καθαρού περιβάλλοντος κατά την άμελξη (περιβάλλον απαλλαγμένο από σκόνη και λάσπη)
- Αποφυγή της άμελξης εάν ο χειριστής πάσχει από μεταδοτικές ασθένειες (πχ διάρροια)
- Αποφυγή ανάμιξης πρωτογάλατος με το υπόλοιπο γάλα
- Πλύση του μαστού με ζεστό νερό και στέγνωμα του μαστού με στεγνό και καθαρό πανί πριν από την άμελξη
- Χρήση καθαρού δοχείου αποθήκευσης γάλακτος
- Τα ζώα που πάσχουν από μαστίτιδα θα πρέπει να αρμέγονται τελευταία και το γάλα τους θα πρέπει να απορρίπτεται
- Οι θηλές του άρρωστου ζώου πρέπει να εμβαπτίζονται σε αντισηπτικό διάλυμα (ενέργεια που θα συμβάλει περαιτέρω στη μείωση της μόλυνσης του νωπού γάλακτος)

Η χρήση μολυσμένου νωπού γάλακτος, η ατελής παστερίωση, η έλλειψη ελέγχου κρίσιμων σημείων και η μόλυνση μετά την παστερίωση είναι μερικοί από τους συχνότερους παράγοντες που συντελούν στην εκδήλωση *E. coli* νοσημάτων από γαλακτοκομικά προϊόντα (Desmarchelier & Fegan, 2016). Η εφαρμογή συστημάτων ποιότητας, η παρακολούθηση των κρίσιμων σημείων ελέγχου μαζί με την αυστηρή εφαρμογή ορθών πρακτικών παρασκευής και ορθών πρακτικών υγιεινής (Good Hygiene Practices, GHP) αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις για την παραγωγή υγιεινού και ασφαλούς γάλακτος στις περισσότερες χώρες.

Ένα ικανοποιητικό αποχετευτικό σύστημα, ο καθαρισμός και η εξυγίανση του εξοπλισμού σε όλα τα στάδια επεξεργασίας και η σχολαστική προσωπική υγιεινή των χειριστών τροφίμων είναι ουσιώδους σημασίας, είτε στο αγρόκτημα, κατά τη μεταφορά, είτε στα εργοστάσια, στο λιανικό εμπόριο και στις λοιπές υπηρεσίες στον κλάδο των τροφίμων. Η υγιεινή του εξοπλισμού είναι σημαντική, καθώς οποιαδήποτε υπολείμματα προϊόντος σε εξοπλισμό ή μηχανήματα μπορούν να επιτρέψουν την ανάπτυξη μολυσματικών παραγόντων όπως η *E.coli* σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα την πιθανή μόλυνση του προϊόντος. Σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας αλλά και στις διαδικασίες καθαρισμού, πρέπει να γίνεται χρήση πόσιμου νερού καθώς το αντίθετο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση εστιών *E. coli* ή/και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (Zeinhom & Abdel-Latef, 2014).

Η αποτελεσματική παρακολούθηση των κρίσιμων σημείων ελέγχου και οι διορθωτικές ενέργειες σε περίπτωση απόκλισης από τα κρίσιμα όρια είναι επιβεβλημένες για τη διασφάλιση της υγιεινής. Τα εργοστάσια επεξεργασίας

γάλακτος θα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ότι η μόλυνση δεν μεταφέρεται από τα ακατέργαστα στα επεξεργασμένα-τελικά προϊόντα (Desmarchelier & Fegan, 2016).

3.3 ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ *E. coli* ΜΕ ΤΟ ΓΑΛΑ

Το ακατέργαστο γάλα έχει αποτελέσει αρκετές φορές το μέσο πρόκλησης σποραδικών κρουσμάτων και επιδημιών που σχετίζονται με την EHEC. Φαίνεται ότι ο αριθμός των σποραδικών περιστατικών είναι μεγαλύτερος από τις μαζικές εξάρσεις και ότι τα παιδιά είναι πιο ευάλωτα στον κίνδυνο μόλυνσης απ' ό,τι οι ενήλικες (Desmarchelier & Fegan, 2016). Το μη παστεριωμένο γάλα είναι το συχνότερο αίτιο πρόκλησης λοιμώξεων. Από το 2007 έως το 2012 στις ΗΠΑ, η STEC ήταν η αιτία για 13 (17%) από τα 81 κρούσματα που προήλθαν από την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος, ενώ και στην Ευρωπαϊκή Ένωση μεταξύ 2007 και 2012, η STEC προκάλεσε 2 (7,4%) από τα 27 κρούσματα που αποδίδονται στην κατανάλωση νωπού γάλακτος (Desmarchelier & Fegan, 2016). Εκτός του νωπού αγελαδινού γάλακτος, που είναι η πιο συνηθισμένη πηγή μόλυνσης, περιστατικά μόλυνσης STEC έχουν καταγραφεί και από νωπό βουβαλίσιο και αιγοπρόβειο γάλα. Σε ένα ξέσπασμα της λοίμωξης STEC, όπου εννέα παιδιά ανέπτυξαν HUS στο Ηνωμένο Βασίλειο, το βακτήριο *E. coli* O157 βρέθηκε σε σωληνώσεις και σε ελαστικό παρέμβυσμα μηχανήματος εμφιάλωσης γάλακτος, γεγονός που υποδηλώνει μόλυνση μετά την παστερίωση. Η μόλυνση μετά την παστερίωση θεωρήθηκε επίσης ότι προκάλεσε ξέσπασμα λοίμωξης του *E. coli* O104: H21 που συνδέθηκε με παστεριωμένο γάλα στις Ηνωμένες Πολιτείες (2007-2012) (Desmarchelier & Fegan, 2016).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

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

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση της παρουσίας στελεχών της *E. coli* και η διερεύνηση της ευαισθησίας τους έναντι αντιμικροβιακών φαρμάκων, σε δείγματα νοπού αγελαδινού γάλακτος που συλλέχθηκαν από τις δεξαμενές αποθήκευσης υπό ψύξη αγελαδοτροφικών μονάδων της Κεντρικής Μακεδονίας τον Ιούνιο του 2019.

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

4.2.1.1 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την απομόνωση και ταυτοποίηση της *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υποστρώματα και αντιδραστήρια:

- Το εκλεκτικό υπόστρωμα Tryptone Bile Glucuronic Agar (TBX Agar) (OXOID)

Συστατικά	g/l
Τρυπτόνη	20,0
Bile Salts No. 3	1,5
Αγαρ	15,0
X-glucuronide	0,075

pH 7.2 ± 0.2 @ 25°C

Οδηγίες παρασκευής: Διάλυση 36,6 g σκόνης του TBX σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού και ανάδευση υπό θέρμανση μέχρι βρασμού. Αποστείρωση σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121 °C για 15 min. Μετά την ψύξη του υποστρώματος στους 50 °C σε υδατόλουτρο, ακολουθούσε μεταφορά 15 ml περίπου σε αποστειρωμένα τρυβλία.

- Θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA) (LAB M)

Συστατικά	g/l
Τρυπτόνη	15.0
Πεπτόνη Σόγιας	5.0
Άγαρ No. 2	12.0
Χλωριούχο Νάτριο	5.0

pH 7.3 ± 0.2 @ 25°C

Οδηγίες παρασκευής: Διάλυση 40 g σκόνης του TSA σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού με συνεχή ανάδευση και θέρμανση μέχρι βρασμού. Αποστείρωση σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121 °C για 15 min. Ψύξη του υποστρώματος σε υδατόλουτρο στους 50 °C και μεταφορά άσηπτα 15 ml περίπου το σε αποστειρωμένα τρυβλία.

- Αντιδραστήριο Kovac's (Kovac's reagent, OXOID) για τη δοκιμή παραγωγής ινδόλης από τα απομονωθέντα στο TBX μικροβιακά στελέχη και την ταυτοποίησή τους ως *E.coli*.

Συστατικά Πεπτονόχου ζωμού	g/l
Τρυπτόνη	10.0
Χλωριούχο Νάτριο	5.0

pH 7,2 ± 0,1 @ 25°C

Οδηγίες παρασκευής: Διάλυση 10 g τρυπτόνης και 5 g χλωριούχου νατρίου σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού υπό θέρμανση και συνεχή ανάδευση μέχρι βρασμού. Μεταφορά ποσότητας 5 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστείρωση τους σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121 °C για 15 min.

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών της *E. coli* με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών στο άγαρ (μέθοδος Kirby – Bauer) χρησιμοποιήθηκαν:

- Θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton (MHA) (OXOID)

Συστατικά	g/l
Dehydrated infusion from Beef	300,0
Υδρόλυμα Καζεΐνης	17,5
Άγαρ	17,0
Άμυλο	5,0

pH 7.3 ± 0.2 @ 25°C

Οδηγίες παρασκευής: Διάλυση 38 g σκόνης MHA σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού και ανάδευση υπό θέρμανση μέχρι βρασμού. Αποστείρωση του υποστρώματος σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121 °C για 15 min. Ψύξη του υποστρώματος στους 50 °C σε υδατόλουτρο και κατόπιν άσηπτη μεταφορά 15 ml περίπου υποστρώματος σε αποστειρωμένα τρυβλία.

4.2.1.2 ΔΙΣΚΟΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

- Aztreonam 30 µg (ATM) BIOLAB
- Cefotaxime 30 µg (CTX) OXOID
- Ceftriaxone 30 µg (CRO) OXOID
- Amoxicillin/Clavulanic acid 20 µg/10 µg (AMC) BIOLAB
- Cefquinome 30 µg (CEQ) BIOLAB
- Ampicillin 10 µg (AMP) OXOID
- Sulfamethoxazole/trimethoprim 23,75/1,25 µg (SXT) OXOID

4.2.1.3 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

- Αποστειρωμένοι περιέκτες δειγματοληψίας
- Αποστειρωμένος δειγματολήπτης
- Παγοκύστες/ ισοθερμικός περιέκτης μεταφοράς
- Αυτόματη πιπέτα με αποστειρωμένα τιπς
- Αποστειρωμένα τρυβλία petri
- Αποστειρωμένες κεκαμμένες ράβδοι επιφανειακής εξάπλωσης (spreaders)
- Αποστειρωμένοι κρίκοι ενοφθαλμισμού
- Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Αποστειρωμένες λαβίδες
- Αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί (swabs)
- Στείρο αλατούχο διάλυμα / φυσιολογικός ορός
- Κιτ μέτρησης οπτικής πυκνότητας της κλίμακας McFarland
- Κυκλομίκτης (Vortex)
- Βαθμονομημένος χάρακας
- Ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός
- Επωαστικοί κλίβανοι 30 °C, 37 °C και 44 °C
- Κλίβανος αποστείρωσης (autoclave)
- Λύχνος Bunsen

4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

4.3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Για την εκπλήρωση του σκοπού της έρευνας εξετάστηκαν 101 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος που συλλέχθηκαν από τις δεξαμενές ψύξης γάλακτος ισάριθμων αγελαδοτροφικών μονάδων της Κεντρικής Μακεδονίας.

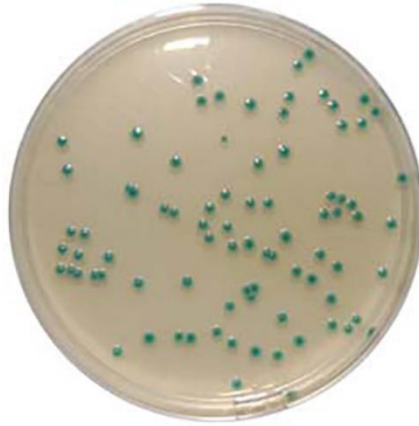
Με τη χρήση αποστειρωμένων αναδευτήρων, ανακινήθηκε το γάλα εντός των δεξαμενών ψύξης και με τη χρήση αποστειρωμένου δειγματολήπτη μεταφέρθηκε άσηπτα ποσότητα γάλακτος περίπου 100 ml, σε αποστειρωμένα φιαλίδια. Τα φιαλίδια μεταφέρθηκαν υπό ψύξη (4 °C) εντός ισοθερμικών κιβωτίων στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για τη διενέργεια των εργαστηριακών εξετάσεων.

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο.

4.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ *E. coli*

Για την απομόνωση και ταυτοποίηση των *E. coli* μεταφέρθηκαν άσηπτα με αυτόματη πιπέτα 0,1 ml δείγματος γάλακτος πάνω στην επιφάνεια του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος Tryptone Bile Glucuronic Agar (TBX Agar) και με τη βοήθεια στείρου διανεμητή (spreader) κατανεμήθηκε ομοιόμορφα η ποσότητα σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 4h και κατόπιν στους 44 °C επί 18-24h υπό αερόβιες συνθήκες.

Το TBX είναι ένα εκλεκτικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που ανιχνεύει με ταχύτητα και αξιοπιστία την *E. coli*. Η παρουσία του χρωμογόνου παράγοντα - X-γλυκουρονιδίου (X-GLUC, 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-glucuronide), ο οποίος ανιχνεύει τη δράση της γλυκουρονιδάσης, καθιστά το TBX ιδιαίτερα εξειδικευμένο για την ανίχνευση της *E.coli*. Η όλη διεργασία προσδίδει ένα χαρακτηριστικό μπλε / πράσινο χρώμα στις αποικίες της *E. coli* (Εικόνα 8).



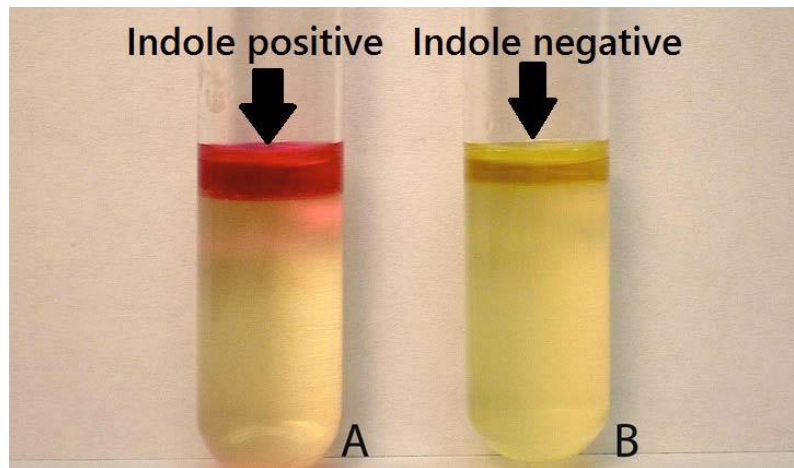
Εικόνα 8: Τρυβλίο TBX μετά την επώαση και παρουσία χαρακτηριστικών αποικιών *E. coli* (<http://www.eolabs.com/product/pp1134-tbx-agar/>)

4.3.3 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Μετά το πέρας της επώασης τρεις χαρακτηριστικές πράσινες αποικίες, ενδεικτικές της παρουσίας *E.coli* στο TBX Agar μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο ενοφθαλμισμού σε τρυβλία με Tryprone Soy Agar (TSA). Ακολούθησε επώαση στους 37 °C σε επωαστικό κλίβανο για 24h.

Μετά την επώαση των ύποπτων για *E. coli* αποικιών ακολουθούσε η δοκιμή της ινδόλης για την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης τους. Για το σκοπό αυτό από τα τρυβλία TSA κάθε ύποπτης αποικίας μεταφέρθηκε με αποστειρωμένο κρίκο ποσότητα καλλιέργειας σε σωλήνα με πεπτονούχο ζωμό. Ακολουθούσε επώαση στους 37 °C για 24-28 h και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη 0,5 ml αντιδραστηρίου Kovacs's στην επιφάνεια του ζωμού. Θετική θεωρούνταν η δοκιμή όταν μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου σχηματίζονταν ερυθρός δακτύλιος στην επιφάνεια του ζωμού (Εικόνα 9).

Ως θετικό δείγμα γάλακτος στην παρουσία της *E. coli* θεωρούνταν το δείγμα από το οποίο έδωσε θετική αντίδραση τουλάχιστον μια από τις ελεγχθείσες ύποπτες αποικίες από το TBX άγαρ. Ακολούθως μία θετική αποικία από κάθε θετικό δείγμα υποβαλλόταν σε έλεγχο αντοχής έναντι των επιλεγμένων αντιμικροβιακών φαρμάκων.



Εικόνα 9: Δοκιμή ινδόλης (<https://microbiologyinfo.com>)

4.3.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ *E. coli* ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

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

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα που επιλέχθηκαν ανήκουν στα ευρέως χρησιμοποιούμενα τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική πράξη (Πίνακας 5). Επίσης η χρήση τους έναντι των εντεροβακτηριακών θεωρείται ενδεδειγμένη για το καλύτερο δυνατό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Τα επιλεγμένα αντιμικροβιακά φάρμακα είναι αντιπροσωπευτικά ορισμένων από τις κυριότερες κατηγορίες των αντιμικροβιακών ουσιών.

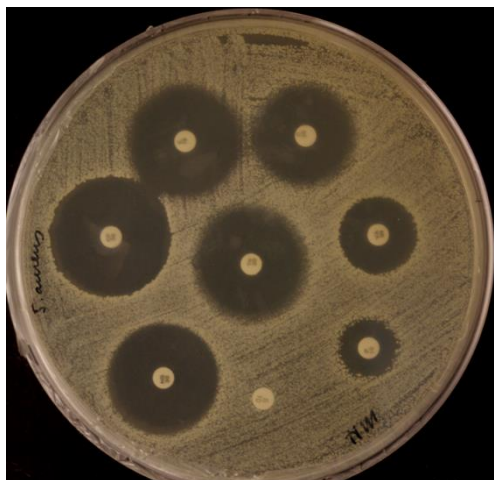
4.3.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ

Για την προετοιμασία του εναιωρήματος που θα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αντοχής στα αντιμικροβιακά φάρμακα των στελεχών της *E.coli* που απομονώθηκαν, μεταφέρονταν με αποστειρωμένο κρίκο ενοφθαλμισμού μερικές αποικίες από την καλλιέργεια του κάθε στελέχους σε TSA άγαρ, σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 4 ml στείρο αλατούχο διάλυμα. Στη συνέχεια, ακολούθησε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του εναιωρήματος κατά κλίμακα McFarland

συγκρίνοντας οπτικά τη θολερότητα του διαλύματος με εκείνη του πρότυπου διαλύματος 0,50 McF. Με την προσθήκη αλατούχου διαλύματος ή στελέχους επιτυγχάνονταν η επιθυμητή συγκέντρωση στα εναιωρήματα. Μετά από έντονη ανάδευση του διαλύματος σε κυκλομίκτη, εμβαπτιζόνταν στο διάλυμα αποστειρωμένος βαμβακοφόρος στυλεός και άμεσα με κατάλληλες περιστροφικές και ζικ-ζακ κινήσεις γινόταν ομοιόμορφη σπορά σε όλη η επιφάνεια των τρυβλίων με Mueller-Hinton άγαρ. Για κάθε στέλεχος (δείγμα) επιστρώθηκαν δύο τρυβλία Mueller-Hinton για να τοποθετηθούν οι δίσκοι των αντιμικροβιακών φαρμάκων που εξετάστηκαν με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας. Ακολούθως τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C σε επωαστικό κλίβανο για 24h.

4.3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΤΗΣ ΖΩΝΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Μετά το πέρας της επώασης μετρήθηκαν οι ζώνες αναστολής με τη χρήση βαθμονομημένου χάρακα, με τα τρυβλία σε ανεστραμμένη θέση και σκουρόχρωμο υπόβαθρο. Οι ειδικές οδηγίες ανάγνωσης δίνονται στο εγχειρίδιο δοκιμής διάχυσης δίσκων EUCAST (Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories) και στον οδηγό ανάγνωσης EUCAST (EUCAST reading guide version 2). Οι διάμετροι ζώνης ερμηνεύθηκαν και κατηγοριοποιήθηκαν ως ευαίσθητες, ενδιάμεσες ή ανθεκτικές σύμφωνα με τους πίνακες της EUCAST Redefining susceptibility testing categories S, I and R.) & CLSI (CLSI document M100-S23 (M02-A11), 2013) (Πίνακας 6).



Εικόνα 10: Τρυβλίο Mueller-Hinton μετά την επώαση (μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιμικροβιακών φαρμάκων σε άγαρ κατά Kirby-Bauer) (Wikipedia)

4.3.7 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε για τους εξής λόγους:

1. Αποτελεί απλή τεχνική και είναι εύκολα εφαρμόσιμη
2. Είναι οικονομική
3. Δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό
4. Δίνει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα
5. Έχει καλή αναπαραγωγιμότητα και μεγάλη επαναληψιμότητα
6. Δίνει τη δυνατότητα επιλογής αντιβιοτικών

Οι μόνοι περιορισμοί εφαρμογής της μεθόδου είναι η αυστηρή τήρηση των οδηγιών εφαρμογής της.

Πίνακας 5: Μηχανισμός δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων της μελέτης (<https://www.drugbank.ca/>)

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ
Μονοβακτήμη	Aztreonam	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
Κεφαλοσπορίνη	Cefotaxime	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
Κεφαλοσπορίνη	Ceftriaxone	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
Πενικιλίνη	Amoxicillin/Clavulanic acid	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
Κεφαλοσπορίνη	Cefquinome	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
Πενικιλίνη	Ampicillin	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
Συνδυασμός συνθετικού παράγοντα διαμινοπυριμιδίνης και παράγοντα σουλφοναμίδης.	Sulphamethoxazole/trimethoprim	Η τριμεθοπρίμη αναστέλλει τη βακτηριακή διϋδροφιλική αναγωγή (DHFR). Η σουλφαμεθοξαζόλη είναι ένας ανταγωνιστικός αναστολέας της διϋδροπτεροτενσυνθετάσης, που ανταγωνίζεται το παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ. Έτσι, οι δύο παράγοντες αναστέλλουν διαφορετικά στάδια στη σύνθεση τετραϋδροφολικού οξέος και η διαδοχική αναστολή είναι η βάση της συνεργιστικής δράσης.

Πίνακας 6: Όρια ζωνών αναστολής μεθόδου διάχυσης δίσκων (EUCAST και CLSI)

Αντιμικροβιακό Φάρμακο	Aztreonam 30μg ATM	Cefotaxime 30μg CTX	Cefquinome 30μg CEQ	Ceftriaxone 30μg CRO	Amoxicillin /Clavulanic acid 20μg/10μg AMC	Ampicillin 10μg AMP	Sulfamethoxazole/ trimethoprim 23,75/1,25 μg SXT
Όρια Διαμέτρων Αναστολής	$S \geq 26, I 22-25, R \leq 21$ (mm)	$S \geq 20, I 17-19, R < 17$ (mm)	$S \geq 21, I 18-20, R \leq 17$ (mm)	$S \geq 25, I 22-24, R < 22$ (mm)	$S \geq 19, I 19-20, R < 19$ (mm)	$S \geq 14, R < 14$ (mm)	$S \geq 16, I 11-15, R \leq 10$ (mm)

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ *E. coli* ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Από τα 101 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος που ελέγχθηκαν από ισάριθμες κτηνοτροφικές μονάδες της Κεντρικής Μακεδονίας, η *E. coli* απομονώθηκε σε 75 από αυτά (74,3 %).

5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ *E. coli* ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η αντοχή σε επτά αντιμικροβικά φάρμακα των στελεχών της *E. coli* που απομονώθηκαν από νωπό αγελαδινό γάλα. Τα εξετασθέντα στελέχη εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αντοχή, με ποσοστό 28,0% έναντι της αμπικιλίνης (AMP), ακολούθησε η αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ (AMC) με 20,0% και η σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (SXT) με 12%. Χαμηλότερα μονοψήφια ποσοστά αντοχής παρουσίασαν έναντι των αντιμικροβιακών κεφτριαξόνη (CRO) με ποσοστό 6,7%, κεφοταξίμη (CTX) με ποσοστό αντοχής 5,3% και ενδιάμεση αντοχή 1,3%, αζτρεονάμη (ATM) με ποσοστό 4,0% και ενδιάμεση αντοχή 2,7% και τέλος το χαμηλότερο ποσοστό αντοχής παρουσιάστηκε έναντι της κεφκινόμης (CEQ) 2.7% ενώ το ποσοστό της ενδιάμεσης αντοχής της ανήλθε στο 4,0%.

Ακόμη, από τον Πίνακα 7 μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες σχετικά με τα ποσοστά αντιμικροβιακής ευαισθησίας των στελεχών στην παρουσία των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στα αντιβιοτικά αζτρεονάμη (ATM), κεφκινόμη (CEQ), κεφοταξίμη (CTX) και κεφτριαξόνη (CRO) ισόποσα με ποσοστό 93,3%. Ακολούθησε με ποσοστό 88,0% η σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (SXT), ενώ χαμηλότερο ήταν το ποσοστό ευαισθησίας για τις πενικιλίνες αμπικιλίνη (AMP) και αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ (AMC) με 72,0% και 80,0% αντίστοιχα.

Πίνακας 7: Αντιμικροβιακή ευαισθησία, ενδιάμεση αντοχή και αντοχή στελεχών *E. coli* στα 7 αντιμικροβιακά φάρμακα.

	Ευαισθησία (S)		Ενδιάμεση αντοχή (I)		Αντοχή (R)	
	n	%	n	%	n	%
ATM 30	70	93,3	2	2,7	3	4,0
CTX 30	70	93,3	1	1,3	4	5,3
CRO 30	70	93,3	0	0,0	5	6,7
AMC 20/10	60	80,0	0	0,0	15	20,0
AMP 10	54	72,0	0	0,0	21	28,0
SXT 25	66	88,0	0	0,0	9	12,0
CEQ 30	70	93,3	3	4,0	2	2,7

Το ποσοστό στελεχών που παρουσίασαν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό είναι 40,0% (30/75). Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ανθεκτικών στελεχών παραθέτοντας το αντιμικροβιακό προφίλ τους.

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η συχνότητα εμφάνισης των αντιμικροβιακών προφίλ που παρατηρήθηκαν στα ανθεκτικά στελέχη αυτής της εργασίας. Τα πιο συχνά απαντώμενα αντιμικροβιακά προφίλ ήταν εκείνα της αμπικιλίνης (AMP) & αμοξυκιλλίνης/κλαβουλανικού οξέος (AMC) με ποσοστό 20,0% και της αμπικιλίνης (AMP) & σουλφαμεθοξαζόλης/τριμεθοπρίμης (SXT) με ποσοστό πάλι 20,0%. Ακολούθησε με ποσοστό 16,7% η αντοχή μόνο στην αμπικιλίνη (AMP) και η αντοχή μόνο στην αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (AMC) πάλι με ίσο ποσοστό 16,7%. Τα υπόλοιπα αντιμικροβιακά προφίλ του Πίνακα 9 παρουσιάστηκαν σε μόνο ένα στέλεχος (3,3% για το καθένα).

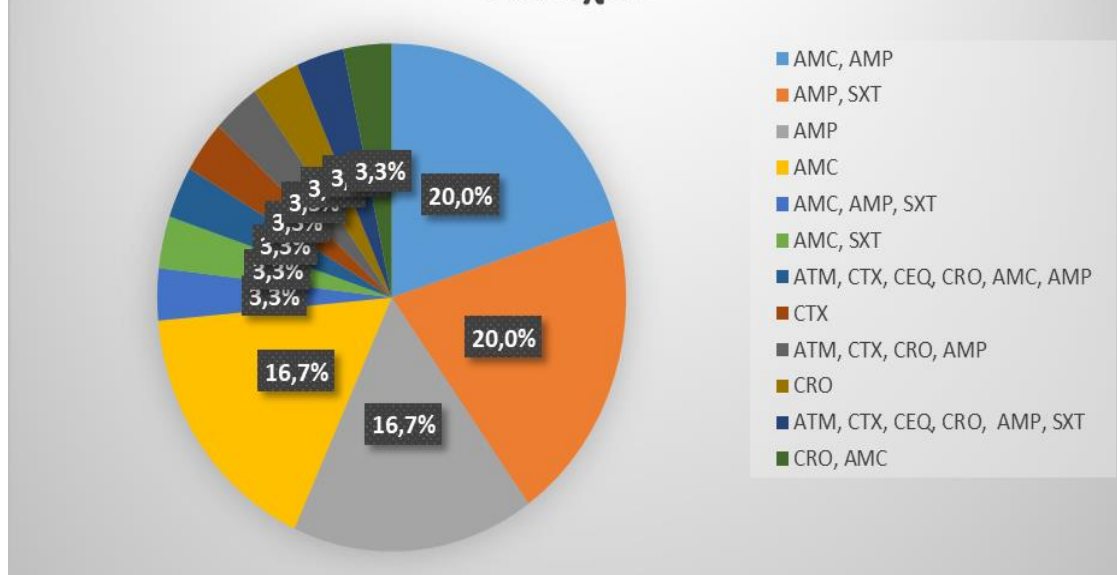
Πίνακας 8: Παρουσίαση αποτελεσμάτων ανθεκτικών στελεχών.

A/A Δειγμάτων (N=30, 40%)	Προφίλ Αντιμικροβιακής Αντοχής
6	CRO, AMC
7	AMC, AMP
10	AMP
14	AMP, SXT
15	AMC, AMP
16	AMC, AMP
17	AMP, SXT
18	AMC
22	AMC
28	AMP, SXT
29	AMC, AMP
30	AMP, SXT
34	AMC, AMP, SXT
35	AMC
36	AMP
39	AMC
43	AMP
44	AMC, AMP
45	AMP, SXT
48	AMC, SXT
52	AMC, AMP
53	ATM, CTX, CEQ, CRO, AMC, AMP
56	CTX
57	AMC
59	ATM, CTX, CRO, AMP
60	CRO
63	AMP, SXT
66	ATM, CTX, CEQ, CRO, AMP, SXT
67	AMP
73	AMP

Πίνακας 9: Ποσοστιαία παρουσίαση προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής ανθεκτικών στελεχών.

ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	n	%
AMC, AMP	6/30	20,0
AMP, SXT	6/30	20,0
AMP	5/30	16,7
AMC	5/30	16,7
AMC, SXT	1/30	3,3
CTX	1/30	3,3
CRO	1/30	3,3
CRO, AMC	1/30	3,3
AMC, AMP, SXT	1/30	3,3
ATM, CTX, CEQ, CRO, AMC, AMP	1/30	3,3
ATM, CTX, CRO, AMP	1/30	3,3
ATM, CTX, CEQ, CRO, AMP, SXT	1/30	3,3

Προφίλ Αντιμικροβιακής Αντοχής ανθεκτικών στελεχών



Διάγραμμα 2: Γραφική απεικόνιση προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής ανθεκτικών στελεχών.

Το μεγαλύτερο μέρος των στελεχών παρουσίασε ευαισθησία σε όλα τα αντιμικροβιακά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη με ποσοστό 58,7%. Αξίζει να σημειωθεί ότι κανένα στέλεχος δεν παρουσίασε αντοχή και στα επτά αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Ποσοστό ευαισθησίας και αντοχής στελεχών *E. coli* σε ένα ή και περισσότερα αντιμικροβιακά φάρμακα.

	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ 1 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΤΟΥΛΑΧΙΣΤΟΝ 1 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ 2 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΤΟΥΛΑΧΙΣΤΟΝ 3 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ (n)	44	12	30	14	4	0
ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΠΙ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (%)	58,7	16,0	40,0	18,7	5,3	0,0

Ακόμη, στον Πίνακα 11 που ακολουθεί παρουσιάζεται η αντοχή, η ενδιάμεση αντοχή και η ευαισθησία των απομονωθέντων στελεχών *E.coli* στις τέσσερις κατηγορίες κλάσεων αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Οι κατηγορίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: μονοβακτάμες (ATM), κεφαλοσπορίνες (CTX, CRO, CEQ), πενικιλίνες (AMP, AMC) και σουλφοναμίδες/ αντιπρωτοζωικοί παράγοντες (SXT).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αντοχή των στελεχών στις πενικιλίνες εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα αντιβιοτικά σε ποσοστό 37,3%, και ακολουθούν σουλφοναμίδες/ αντιπρωτοζωικοί παράγοντες με 12,0%, κεφαλοσπορίνες με 8,0% και τέλος μονοβακτάμες με ποσοστό 4,0%.

Πίνακας 11: Αντιμικροβιακή αντοχή στελεχών *E. coli* ανά κλάση αντιβιοτικών.

	Ευαισθησία (S)		Ενδιάμεση αντοχή (I)		Αντοχή (R)	
	n	%	n	%	n	%
ATM 30 (ΜΟΝΟΒΑΚΤΑΜΕΣ)	70	93,3	2	2,7	3	4,0
CTX 30, CRO 30, CEQ 30(ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ)	68	90,7	4	5,3	6	8,0
AMP 10, AMC 20/10 (ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΕΣ)	47	62,7	0	0,0	28	37,3
SXT 25 (ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ/ΑΝΤΙΠΡΩΤΟΖΩΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ)	66	88,0	0	0,0	9	12,0

Τέλος, ανθεκτικότητα σε περισσότερες από τρεις κλάσεις αντιμικροβιακών φαρμάκων παρουσίασε το 4,0% των στελεχών, ενώ αντοχή σε όλες τις κλάσεις παρατηρήθηκε μόνο σε ένα απομονωμένο στέλεχος *E. coli* (1,3%).

Πίνακας 12: Αντιμικροβιακή αντοχή στελεχών *E. coli* σε όλες τις κλάσεις αντιβιοτικών.

	n	%
ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΚΛΑΣΕΙΣ	1	1,3

Πίνακας 13: Πολυανθεκτικά στελέχη *E. coli* ανά κλάση αντιβιοτικών.

	n	%
ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (ΑΝΤΟΧΗ >3 ΚΛΑΣΕΙΣ)	3	4,0

6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα στελέχη της *E. coli* είναι τα πιο συχνά απαντώμενα βακτήρια στον γαστρεντερικό σωλήνα τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων και αποτελούν το συνηθέστερο παθογόνο παράγοντα της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*. Η παρουσία τους στο γάλα είναι ενδεικτική της υγιεινής του κατάστασης, καθώς η παρουσία στελεχών της *E. coli* αποτελεί δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης (Soomro et al., 2002, Benkerroum et al., 2004).

Τα τελευταία χρόνια γίνονται όλο και περισσότερες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την εμφάνιση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών που απομονώνονται από τα τρόφιμα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντοχή βακτηρίων *E. coli* που απομονώθηκαν από νωπό αγελαδινό γάλα, σε κοινώς χρησιμοποιούμενα αντιμικροβιακά φάρμακα.

Από τα 101 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος που συλλέχθηκαν, τα 75 ήταν θετικά στην παρουσία της *E.coli* (74,3%). Σε αντίστοιχες μελέτες τα ποσοστά απομόνωσης της *E. coli* παρουσίασαν τα ακόλουθα ποσοστά: Τάνγκα Τανζανία 100%, Αρούσα Τανζανία 90,67%, Νταρ ες Σαλάμ Τανζανία 83,0% Τάντο Τζάμ Πακιστάν 51,66% και 58,0% Αιθιοπία (Tadesse et al. 2018). Η ποικιλία στα ποσοστά απομόνωσης της *E. coli* από νωπό αγελαδινό γάλα οφείλεται κατά κύριο λόγο στις επικρατούσες συνθήκες υγιεινής. Το γάλα παρά, τον άσηπτο τρόπο δειγματοληψίας του, μπορεί να μολυνθεί είτε κατά την άμελη του λόγω κακής υγιεινής του μαστού του ζώου, είτε λόγω κακών περιβαλλοντικών συνθηκών υγιεινής είτε λόγω εφαρμογής κακών πρακτικών υγιεινής από τους χειριστές των εγκαταστάσεων.

Σε αυτή την έρευνα το μεγαλύτερο ποσοστό αντοχής βρέθηκε έναντι της αμπικιλίνης (28,0%), ακολούθησε η αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (20,0%), η σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (12,0%), η κεφτριαξόνη (6,7%), η κεφοταξίμη (5,3%), η αζτρεονάμη (4,0%) και τέλος η κεφκινόμη (2,7%) (Πίνακας 7).

Η υψηλή αντοχή στις πενικιλίνες και πιο συγκεκριμένα στην αμπικιλίνη, είναι φαινόμενο συχνά απαντώμενο στη διεθνή βιβλιογραφία. Σε μελέτη των Skockova et. al. (2015) στην Τσεχία, το 92,4% των δειγμάτων νωπού αγελαδινού γάλακτος που συλλέχθηκαν ήταν θετικά στην παρουσία της *E. coli*. Το 30,4% παρουσίασε ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, ποσοστό πολύ κοντινό με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης (28,0%). Στην ίδια μελέτη πολύ χαμηλό ήταν και το ποσοστό αντοχής στη κεφοταξίμη (0,7%), ενώ χαμηλή καταγράφηκε και η αντοχή στην σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη (3,3%) και την αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (0,4%) σε αντίθεση με τα ποσοστά της δικής μας μελέτης που ήταν υψηλότερα (12% και 20% αντίστοιχα).

Σε αντίστοιχη έρευνα που διεξήχθη στην Ελλάδα από την Γούσια (2008) παρατηρήθηκε υψηλή ανθεκτικότητα στελεχών *E. coli* στην αμπικιλίνη σε ποσοστό 44,7%, στην αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ σε ποσοστό 31,9%, ενώ χαμηλό καταγράφηκε το ποσοστό αντοχής στην κεφτριαξόνη 6,4%. Οι τιμές αυτές είναι

αρκετά κοντά με τις τιμές της δικής μας εργασίας (αμπικιλίνη 28,0%, αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ 20,0% και κεφτριαζόνη 6,7%) εκτός από την αμπικιλίνη που στη δική μας εργασία παρουσίασε συγκριτικά μικρότερο ποσοστό αντοχής. Ακόμη, στην ίδια μελέτη καταγράφηκε υψηλό ποσοστό πολυανθεκτικότητας (και στα 15 αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη) της τάξης των 27,7%. Υψηλές ήταν και οι αντίστοιχες τιμές στη μελέτη του Tadesse et al. (2018) που πραγματοποιήθηκε στην Αιθιοπία, με το ποσοστό ανθεκτικότητας σε όλα τα αντιβιοτικά (13 αντιβιοτικά) να φτάνει το 25%. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της δικιάς μας μελέτης, στην οποία δεν παρατηρήθηκε κανένα στέλεχος ανθεκτικό σε όλα τα αντιβιοτικά (7 αντιβιοτικά).

Σε μελέτη των Ngaywa et al. (2019) στην Βόρεια Κένυα, το 95% των *E. coli* που απομονώθηκαν παρουσίασαν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την έρευνα, εκ των οποίων το 48% παρουσίασε αντοχή στην αμπικιλίνη, το 19% στην αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ και το 14% στη κεφοταξίμη. Τα ποσοστά των πενικιλινών (αμπικιλίνη και αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ) είναι συγκρίσιμα με τα ποσοστά της δικής μας μελέτης ενώ τα αποτελέσματα της κεφοταξίμης εμφανίζονται αρκετά υψηλότερα σε σχέση με τη δική μας μελέτη.

Σε μελέτη που έλαβε χώρα στην Τανζανία από τους Martha, et al.(2016) καταγράφηκε υψηλή αντοχή 43,8% στη σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη και 100% στην πενικιλίνη και την αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ. Υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στην αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ αναφέρουν και οι μελέτες των Idriss et al. (2014) στην Σλοβακία με ποσοστό 96% και των Cizek et al. (2008) στην Τσεχία με 23%, ποσοστό χαμηλότερο της πρώτης έρευνας, που προσεγγίζει όμως τα αποτελέσματα της δικής μας εργασίας. Η υψηλή αντοχή στην πενικιλίνη επιβεβαιώνεται και από έρευνα που διεξήχθη από τους Balayneh et al. (2014) στην Αιθιοπία με ποσοστό αντοχής 65%.

Η αύξηση των πολυανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο καθώς οδηγεί σε αναποτελεσματική αντιμετώπιση τυχόν λοιμώξεων (Levy & Marshall, 2004, Magiorakos et al., 2012). Κατά τους Rasheed et. al. (2014) το 7% των *E. coli* που απομονώνονται από το νωπό γάλα έχουν χαρακτηριστεί ως πολυανθεκτικά. Στη δική μας μελέτη το ποσοστό των πολυανθεκτικών στελεχών δεν ξεπέρασε το 5,3% (Πίνακας 10) ενώ σε αντίστοιχη μελέτη των Martha. et al., (2016) καταγράφηκε υψηλό ποσοστό πολυανθεκτικών στελεχών 87,5%. Τέλος, η έρευνα των Martha, et al.(2016) κατέληξε ότι τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό σε ποσοστό 100% ενώ το αντίστοιχο ποσοστό της δικής μας έρευνας κυμάνθηκε στο 40%.

Η υψηλή αντιμικροβιακή αντοχή που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη στην κλάση των πενικιλινών (αμπικιλίνη (28,0%) και αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (20,0%) ενδεχομένως να οφείλετε στην αυξημένη χορήγηση των συγκεκριμένων αντιβιοτικών στα ζώα εκμετάλλευσης. Οι πενικιλίνες, και ειδικά η αμπικιλίνη, αποτελούν αντιβιοτικά πρώτης γραμμής (European Medicines Agency EMA, Categorisation of antibiotics for use in animals for prudent and responsible use) και χρησιμοποιούνται ευρέως από τους κτηνοτρόφους, συχνά ακόμη και χωρίς συνταγογράφηση από κτηνιάτρους (Γούσια Π. 2008). Στην αυξημένη αντοχή, ίσως

να συμβάλλει και το γεγονός ότι η *E. coli* παρουσιάζει μια ενδογενή αντοχή στις πενικιλίνες λόγω δυσχερούς διάχυσης του αντιβιοτικού μέσω της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου (Χριστοπούλου, 2012).

Αντιβιοτικό πρώτης γραμμής θεωρείται και η σουλφαμεθοξαζόλη/τριμεθοπρίμη, (European Medicines Agency EMA, Categorisation of antibiotics for use in animals for prudent and responsible use). Η συνεχής εξάπλωση του φαινομένου της αντιμικροβιακής αντοχής οδήγησε στην εντατικοποίηση της χρήσης της σουλφαμεθοξαζόλης/τριμεθοπρίμης (Falagas et al., 2008). Ίσως σε αυτή του την ιδιότητά να οφείλεται και το τρίτο κατά σειρά υψηλότερο ποσοστό αντοχής στην *E. coli*.

Το χαμηλό ποσοστό αντοχής στην κεφτριαξόνη μπορεί να αποδοθεί στη μη συχνή χορήγηση της για την αντιμετώπιση εντεροβακτηριακών μολύνσεων αλλά και λόγω του το αντιβιοτικό αυτό δεν χορηγείται σε παραγωγικά ζώα, πιο συγκεκριμένα ενδείκνυται μόνο για χρήση σε ιπποειδή και ζώα συντροφιάς (Κτηνιατρικό συνταγολόγιο, 2001). Όπως και το μονοψήφιο ποσοστό αντοχής της κεφοταξίμης ενδεχομένως να οφείλεται στη μη χορήγηση της σε μεγάλα παραγωγικά ζώα (Papich, 2016). Η αζτρεονάμη και η κεφκινόμη κατατάσσονται στον πίνακα της EMA στην κατηγορία A και B αντίστοιχα (Παράρτημα 1). Τα αντιβιοτικά της κατηγορίας A απαγορεύεται να χρησιμοποιηθούν στην κτηνιατρική και τα αντιβιοτικά της κατηγορίας B είναι ζωτικής σημασίας για την ιατρική και η χρήση τους στα ζώα θα πρέπει να περιορίζεται για τον περιορισμό του κινδύνου για τη δημόσια υγεία αντίστοιχα. Αυτοί οι περιορισμοί φαίνεται ότι εφαρμόζονται από τις συγκεκριμένες γαλακτοκομικές μονάδες απ' όπου και έγιναν οι λήψεις των δειγμάτων γάλακτος, γι' αυτό και τα ποσοστά ευαισθησίας στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά ήταν εξαιρετικά υψηλά.

7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα προκύπτει από την αλόγιστη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα. Αυτή η κακή πρακτική έχει ως συνέπεια την μεταφορά ανθεκτικών βακτηρίων μεταξύ ζώων, ανθρώπων, ζωικών προϊόντων και περιβάλλοντος, καθώς και τη διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας (Tadesse, et al., 2018).

Από τα 101 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος που συλλέχθηκαν για τη διενέργεια αυτής της μελέτης, τα 75 δείγματα ήταν θετικά στην παρουσία *E. coli* (74,3%). Ο υψηλός επιπολασμός της *E. coli* στα δείγματα είναι ενδεικτικός της μη πλήρους συμμόρφωσης των αγελαδοτροφικών μονάδων με τις κείμενες υγειονομικές απαιτήσεις. Αποτελεί επιτακτική ανάγκη η αυστηρή παρακολούθηση και εφαρμογή αποτελεσματικών μέτρων υγιεινής και βιοασφάλειας σε όλα τα στάδια παραγωγής και επεξεργασίας του γάλακτος.

Το μεγαλύτερο ποσοστό αντοχής βρέθηκε έναντι της αμπικιλίνης (28,0%), ακολούθησε η αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (20,0%), η σουλφαμεθοξαζόλη / τριμεθοπρίμη (12,0%), η κεφτριαξόνη (6,7%), η κεφοταξίμη (5,3%), η αζτρεονάμη (4,0%) και τέλος η κεφκινόμη (2,7%) (Πίνακας 7).

Δεν παρατηρήθηκε καμία ασυνήθιστη ή σπάνια αντιβιοαντοχή στα εξεταζόμενα αντιμικροβιακά φάρμακα.

8 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

- Μελέτη παραγόντων εκτροφής που μπορεί να σχετίζονται με την παρουσία ανθεκτικών στελεχών *E. coli* στο γάλα.
- Διερεύνηση ύπαρξης υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων σε δείγματα γάλακτος.

9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

- **Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Kadaikunnan, S., Alobaidi, A. S., Sharafaddin, A. H., Alyahya, S. A., & Shehu, M. R.** (2018). “*Prevalence of Escherichia coli strains resistance to antibiotics in wound infections and raw milk*”. **Saudi Journal of Biological Sciences**.
- **Belayneh R, Belihu K & Tesfaye A.** (2014). “*Microbiological study on bacterial causes of bovine mastitis and its antibiotics susceptibilty patterns in East Showa Zone, Akaki district, Ethiopia*”. **J. Vet. Med. Anim. Health**, 6, 4, 116-122
- **Benkerroum N., Bouhal Y., EI-Attar A.& Marhaben A.** (2004) “*Occurrence of Shiga toxin producing E. coli O157:H7 in selected diary and meat products marketed in the city of Rabat*”, **Morocco J Food Prot**, 67, 1234-1237
- **Bell, C., & Kyriakides, A.** (2009). “*Pathogenic Escherichia coli*”. **Foodborne Pathogens**, 581–626
- **Čížek A, Dolejská M, Novotná R, Haas D & Vyskočil M** (2008). “*Survey of Shiga toxigenic Escherichia coli O157 and drug-resistant coliform bacteria from in-line milk filters on dairy farms in the Czech Republic*”. **J. Appl. Microbiol.** 104, 3, 852-860
- **Chakraborty A., Saralaya V., Adhikari P.& Shenoy S.** (2017), “*Virulence property, phylogenetic background, and resistance pattern of Escherichia coli isolates from wound infections*” **CHRISMED J. Health Res.**, 4, 248
- **Chaudhary S., Khurana S.K. and Mane B.G.** (2014). “*Escherichia coli: Animal Foods and Public Health-Review*”. **Journal Of Microbiology, Immunology And Biotechnology**
- **Desmarchelier, P., & Fegan, N.** (2016). “*Pathogens in Milk: Escherichia coli*”. **Reference Module in Food Science**.
- **Deatherage, D. E., Kepner, J. L., Bennett, A. F., Lenski, R. E. & Barrick, J. E.**(2017). “*Specificity of genome evolution in experimental populations of Escherichia coli evolved at different temperatures*”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114, 10, 1904-1912

- **De Boer, E.** “*Enterobacteriaceae, Coliforms And E. Coli, Classical and Modern Methods for Detection/Enumeration*”. **Encyclopedia of Food Microbiology**, 610–617, (1999).
- **De Silva, S. A. S. D., Kanugala, K. A. N. P., & Weerakkody, N. S.** (2016). “*Microbiological Quality of Raw Milk and Effect on Quality by Implementing Good Management Practices*”. **Procedia Food Science**, 6, 92–96.
- **Economou, V., Gousia, P., Sakkas, H., & Papadopoulou, C.** (2019). “*Environmental Reservoirs of Antimicrobial Resistance of Foodborne Pathogens*”. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**.
- **Eden, R.** “*Enterobacteriaceae, Coliforms And E. Coli Classical and Modern Methods for Detection and Enumeration*”. **Encyclopedia of Food Microbiology**, 667–673. (2014)
- **Falagas M.E., Grammatikos A.P. & Michalopoulos A.** (2008). “*Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics*”. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 6, 5, 593–600
- **Groisman E.A., Ochman H.** “*Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps Cell*”, 87, 791-794, (1996)
- **Godziszewska, J., Pogorzelska-Nowicka, E., Brodowska, M., Jagura-Burdzy, G., & Wierzbicka, A.** (2018). “*Detection in raw cow’s milk of coliform bacteria - reservoir of antibiotic resistance*”. **LWT**, 93, 634–640.
- **Guilfoile P. & Alcamo I.E.,** “*Antibiotic-resistant bacteria*”. **Infobase Publishing** (2007)
- **Hansen W. & Yourassowsky E.** (1984). “*Detection of beta-glucuronidase in lactose-fermenting members of the family Enterobacteriaceae and its presence in bacterial urine cultures*”. **J. Clin. Microbiol.** 20. 1177-1179.
- **Idriss S, Foltys V, Tančin V, Kirchnerová K, Tančinová D & Zaujec K** (2014). “*Mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Nitra Slovakia*”. **Slov. J. Anim. Sci.** 47, 1, 33-38
- **Isha M., Michel N., Obed N. & Philip, KC.** (2006). “*Hygienic milk production A training guide for farm-level workers and milk handlers in EasternAfrica*”. **Module 1. Kenya**, 13-18
- **Kalkwarf, H. J., Khoury, J. C., & Lanphear, B. P.** (2003). “*Milk intake during childhood and adolescence, adult bone density, and osteoporotic fractures in US women*”. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 77, 1, 257–265.

- **Kamarthapu, V., Epshtein, V., Benjamin, B., Proshkin, S., Mironov, A., Cashel, M. & Nudler, E.** (2016). “*ppGpp couples transcription to DNA repair in E.coli*”. **Science**, 352, 6288, 993-996
- **Levy B. & Marshall B.** (2004). “*Antibacterial resistance worldwide: Causes challenges and responses*”, **Nat. Med**, 10, 122-129
- **Louie M., Read S., Simor A., Holland J., Ziebell K., Brunton J. & Hii J.** (1998). “*Application of multiplex-PCR for detection of non O157 verotoxin producing Escherichia coli in blood stools: identification of serogroups O26 and O111*”. **Journal of Clinical Microbiology**, 36, 3375-3377
- **Magiorakos P, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, Harbarth S, Hindler J, Kahlmeter G & Olsson-liljequist B.** (2012). “*Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: International expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*”. **Clin. Microb. Infect.** 18, 3, 268-281
- **Martha, M. S., Adelard, B. M., Lughano, J. K., & Neema, K.** (2016). “*Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Escherichia coli and Salmonella spp. isolated from milk of zero grazed cows in Arusha City*”. **African Journal of Microbiology Research**, 10, 46, 1944–1951
- **Makovec, J. A., & Ruegg, D. P. L.** (2003). “*Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001)*”. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 222, 11, 1582–1589
- **Marshall T.A., Levy S.M., Broffitt B., Warren J.J., Eichenberger-Glimore J.M., Bruns T.L & Stumbo P.J.** (2003). “*Dental caries and beverage consumption in young children*” **Pediatrics**, 112, 3, e184-e191
- **McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E. & Schaecher, K.E.** (2016) “*Escherichia coli harboring mcr-1 and blaCTX-M on a novel IncF plasmid: first report of mcr-1 in the United States*”. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 60, 7, 4420-4421
- **Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM & Tauxe R.** (1999). “*Food-Related Illness and Death in the United States*”. **Emerging Infectious Diseases**, 5, 5, 607-625
- **Moet G.J., Jones R.N., Biedenbach D.J., Stilwell M.G. & Fritsche T.R.** “*Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004)*” **Diagn Microbiol Infect Dis**, 57, 7-13, (2007)

- Meyer E., Schwab F., Schroeren-Boersch B. & Gastmeier P. “Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008”. **Crit. care**, 14. R113, (2010)
- Nataro J.P. & Kaper J.B. *Diarrheagenic Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11, 142-201, (1998)
- Ngaywa, C., Aboge, G. O., Obiero, G., Omwenga, I., Ngwili, N., Wamwere, G. & Bett, B. (2019). “Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates detected in raw milk of livestock in pastoral areas of northern Kenya”. **Food Control**.102,173-178
- Norville, J.E., Gardner, C.L., Aponte, E., Camplisson, C.K., Gonzales, A.,Barclay, D.K., Turner, K., Longe, V., Mincheva, M., Teramoto, J., Tominaga,K., Sugimoto, R., DiCarlo, J., Guell, M., Hysolli, E., Aach, J., Gregg, C.,Wanner, B. & Church, G. (2016). “Assembly of Radically Recoded *E. coli*Genome Segments”. **Bio Rxiv**
- Oliver S.P., Jayarao B.M.& Almeida R.A. (2005). “Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications”. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2, 2, 115-29
- Ombarak, R. A., Hinenoya, A., Awasthi, S. P., Iguchi, A., Shima, A., Elbagory, A.-R. M., & Yamasaki, S. (2016). “Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt”. **International Journal of Food Microbiology**, 221, 69–76
- On behalf of the ESAC Project Group (2011). “European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe (1997–2009)”. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 66, 1_6, vi3–vi12
- Papich, M. G. “*Cefotaxime Sodium*”. **Saunders Handbook of Veterinary Drugs**, Fourth Edition, 124–126, (2016)
- Payne, M., Croxen, M. A., Lee, T. D., Mayson, B., Champagne, S., Leung, V.,Bariso, S., Hoang, L. Lowe, C.(2016) “mcr-1–Positive Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Traveler Returning to Canada from China”. **Emerging infectious diseases**, 22, 9, 1673
- Petkovšek Ž., Eleršič K., Gubina M., Žgur-Bertok D., & Erjavec M.S. (2009), “Virulence potential of *Escherichia coli* isolates from skin and soft tissue infections”. **J. Clin. Microbiol.**, 47, 1811-1817
- Potrykus, K. & Cashel, M. (2016). “Preferential cellular accumulation of ppGppor pppGpp in *Escherichia coli*.In *Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria*”, **Wiley & Sons**, 1, 479-488.

- **Rasheed M.U., Thajuddin N., Ahamed P., Teklemariam Z. & Jamil K.** “Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources”. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 56 341-346, (2014)
- **Rogers, L., Power, K., Gaora, P. Ó., & Fanning, S.** “*Escherichia coli* and Other Enterobacteriaceae: Occurrence and Detection”. **Encyclopedia of Food and Health**, 545–551(2016)
- **Samanta, I., & Bandyopadhyay, S.** “*Escherichia coli*”. **Antimicrobial Resistance in Agriculture**, 171–193, (2020).
- **Skočková, A., Bogdanovičová, K., Koláčková, I. & Karpíšková, R.** (2015). “Antimicrobial-Resistant and Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Raw Cow’s Milk”. **Journal of Food Protection**, 78, 1, 72–77
- **Soomro A.H., Arain M.A., Khaskheli M.& Bhutto B.** (2002).“Isolation of *Escherichia coli* from raw milk and milk products in relation to public health sold under market conditions at Tandojam”, **Pakistan Journal of Nutrition**, 1, 151-152
- **Stein, R. A., & Chirilă, M.** “Characteristics of Foodborne Hazard and Diseases: Drug Resistant Pathogens”. **Encyclopedia of Food Safety**, 196–207, (2014).
- **Tadesse, H. A., Gidey, N. B., Workelule, K., Hailu, H., Gidey, S., Bsrat, A., & Taddele, H.** (2018). “Antimicrobial Resistance Profile of *E. coli* Isolated from Raw Cow Milk and Fresh Fruit Juice in Mekelle, Tigray, Ethiopia”. **Veterinary Medicine International**, 1–7
- **Touret, J., Willing, B.P., Croxen, M.A., Dufour, N., Dion, S., Wachtel, S., Denamour, E. & Finlay, B.B.** (2016). “Small intestine early innate immunity response during intestinal colonization by *Escherichia coli* depends on its extra-intestinal virulence status”. **.PloS ONE**, 11, 4
- **Tolle A.** “The microflora of the udder. In: Factors influencing the bacteriological quality of raw milk”. **International Dairy Federation Bulletin**, 120, 4, (1980)
- **Watson, M.R., Lin, Y.F., Hollwey, E., Dodds, R.E., Meyer, P. & McDowall, K.J.** (2016). “An improved binary vector and *Escherichia coli* strain for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation”. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, 6, 7, 2195-2201
- **Walsh, C., Wencewicz, T.** (2016). “Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities”. **American Society for Microbiology (ASM)**, 1

- **Welch R.A.** “Uropathogenic *Escherichia coli*-associated exotoxins *Microbiology spectrum*”, 4 (2016)
- **Wise R., Hart T., Cars O., Streulens M., Helmuth R., Huovinen P. & Sprenger M.** “Antimicrobial Resistance”. **British Medical Journal Publishing Group** (1998)
- **Yang, X., & Wang, H.** “*Escherichia Coli, Pathogenic E. coli (Introduction)*”. **Encyclopedia of Food Microbiology**, 695–701. (2014).
- **Zeinhom, M. M. A., & Abdel-Latef, G. K.** (2014). “Public health risk of some milk borne pathogens”. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, 3, 3, 209–215

Ελληνική Βιβλιογραφία

- **Αρσένη Α.** “Κλινική Μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων”. **ZHTA**, 4, (1994)
- **Γούσια Π.** (2008). “Απομόνωση παθογόνων βακτηρίων από τρόφιμα ζωικής προέλευσης, έλεγχος της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά και αξιολόγηση του κινδύνου για την δημόσια υγεία”. Διατριβή, **Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**
- **Ελεσνίτσας Γ. & Βεκύλη Ι.** (2019) “Η κατάχρηση αντιβιοτικών και η ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής”. **Περιοδικό Νοσηλευτικής Επιστήμης** 12, 3, 31-43
- **Καζατζή Ι.** (2018) “Αντοχή στα αντιβιοτικά στελεχών *Escherichia coli* που απομονώνονται από πόσιμο νερό”. Διπλωματική εργασία, **Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**
- **Κανονισμός (Εκ) Αριθ. 853/2004** Του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου (2004)
- **Κτηνιατρικό συνταγολόγιο**, Εθνικός οργανισμός φαρμάκων, Αθήνα (2001)
- **Χατζηδημητρίου Μ.** (2006). “Διερεύνηση Μηχανισμών Αντοχής εντεροβακτηριακών στην τριμεθοπρίμη”. Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Μικροβιολογίας Π.Γ.Ν.Θ ΑΧΕΠΑ. **Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ**

Ηλεκτρονικές Πηγές

- http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Publications/Disk_diffusion_paper_printed_version_March_2014.pdf [accessed 15/09/2019]
- http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Reading_guide_v_2.0_EUCAST_Disk_Test.pdf [accessed 15/09/2019]
- [www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2018/EUCAST - Intermediate category - information for all.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2018/EUCAST_-_Intermediate_category_-_information_for_all.pdf) [accessed 15/09/2019]
- <https://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-M100S23-susceptibility-testing-2013-no-protection.pdf> [accessed 15/09/2019]
- https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use_en.pdf [accessed 05/01/2020]
- <https://www.fda.gov/> [accessed 10/01/2020]
- <https://www.cdc.gov/ecoli/> [accessed 10/01/2020]
- <https://www.who.int/> [accessed 10/01/2020]
- <https://www.drugbank.ca/> [accessed 05/01/2020]
- www.niaid.nih.gov [accessed 10/02/2020]
- <http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/index.asp> [accessed 15/12/2019]

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1: Κατηγοριοποίηση αντιβιοτικών για κτηνιατρική χρήση (με παραδείγματα ουσιών που επιτρέπονται για ανθρώπινη ή κτηνιατρική χρήση στην ΕΕ)(www.ema.europa.eu)

Categorisation of antibiotic classes for veterinary use (with examples of substances authorised for human or veterinary use in the EU)				
A	Aminopenicillins mecillinam pivmecillinam	Carbapenems meropenem doripenem	Drugs used solely to treat tuberculosis or other mycobacterial diseases isoniazid ethambutol pyrazinamide ethionamide	Glycopeptides vancomycin
	Ketolides telithromycin	Lipopeptides daptomycin		Glycylcyclines tigecycline
	Monobactams aztreonam	Oxazolidinones linezolid		Phosphonic acid derivatives fosfomicin
	Rifamycins (except rifaximin) rifampicin	Riminoferazines clofazimine	Other cephalosporins and penems (ATC code J01DI), including combinations of 3rd-generation cephalosporins with beta lactamase inhibitors ceftibiprole ceftaroline ceftolozane-tazobactam faropenem	Pseudomonic acids mupirocin
	Carboxypenicillin and ureidopenicillin, including combinations with beta lactamase inhibitors piperacillin-tazobactam	Sulfones dapsona		Substances newly authorised in human medicine following publication of the AMEG categorisation to be determined
	Streptogramins pristinamycin virginiamycin			
B	Cephalosporins, 3rd- and 4th-generation, with the exception of combinations with β-lactamase inhibitors cefoperazone cefovecin cefquinome ceftiofur	Polymyxins colistin polymyxin B	Quinolones: fluoroquinolones and other quinolones cinoxacin danofloxacin difloxacin enrofloxacin flumequine ibafloxacin	marbofloxacin norfloxacin orbifloxacin oxolinic acid pradofloxacin

AVOID

RESTRICT

C	Aminoglycosides (except spectinomycin) amikacin apramycin dihydrostreptomycin framycetin gentamicin kanamycin neomycin paromomycin streptomycin tobramycin	Aminopenicillins, in combination with beta lactamase inhibitors amoxicillin + clavulanic acid ampicillin + sulbactam	Amphenicols chloramphenicol florfenicol thiamphenicol	Macrolides erythromycin gamithromycin oleandomycin spiramycin tildipirosin tilmicosin tulathromycin tylosin tylvalosin	CAUTION
		Cephalosporins, 1st- and 2nd-generation, and cephamycins cefacetrile cefadroxil cefalexin cefalonium cefalotin cefapirin cefazolin	Lincosamides clindamycin lincomycin pirlimycin		
			Pleuromutilins tiamulin valnemulin	Rifamycins: rifaximin only rifaximin	
D	Aminopenicillins, without beta-lactamase inhibitors amoxicillin ampicillin metampicillin	Aminoglycosides: spectinomycin only spectinomycin	Sulfonamides, dihydrofolate reductase inhibitors and combinations formosulfathiazole phthalylsulfathiazole sulfacetamide sulfachlorpyridazine sulfadiazine sulfadiazine sulfadimethoxine sulfadimidine sulfadoxine sulfafurazole sulfaguanidine sulfalene sulfamerazine sulfamethizole sulfamethoxazole sulfamethoxy-pyridazine sulfamonomethoxine sulfanilamide sulfapyridine sulfaquinoxaline sulfathiazole trimethoprim		PRUDENCE
	Tetracyclines chlortetracycline doxycycline oxytetracycline tetracycline	Anti-staphylococcal penicillins (beta-lactamase-resistant penicillins) cloxacillin dicloxacillin nafcillin oxacillin			
	Natural, narrow-spectrum penicillins (beta lactamase-sensitive penicillins) benzathine benzylpenicillin benzathine phenoxymethylpenicillin benzylpenicillin penethamate hydriodide	pheneticillin phenoxymethylpenicillin procaine benzylpenicillin	Cyclic polypeptides bacitracin	Nitroimidazoles metronidazole	
			Steroid antibacterials fusidic acid	Nitrofurans derivatives furaltidone furazolidone	

Παράρτημα 2: Κατηγοριοποίηση αντιβιοτικών για κτηνιατρική χρήση – επεξήγηση κατηγοριών (με παραδείγματα ουσιών που επιτρέπονται για ανθρώπινη ή κτηνιατρική χρήση στην ΕΕ)(www.ema.europa.eu)

<p>Category A Avoid</p> <ul style="list-style-type: none">• antibiotics in this category are not authorised as veterinary medicines in the EU• should not be used in food-producing animals• may be given to companion animals under exceptional circumstances	<p>Category B Restrict</p> <ul style="list-style-type: none">• antibiotics in this category are critically important in human medicine and use in animals should be restricted to mitigate the risk to public health• should be considered only when there are no antibiotics in Categories C or D that could be clinically effective• use should be based on antimicrobial susceptibility testing, wherever possible
<p>Category C Caution</p> <ul style="list-style-type: none">• for antibiotics in this category there are alternatives in human medicine• for some veterinary indications, there are no alternatives belonging to Category D• should be considered only when there are no antibiotics in Category D that could be clinically effective	<p>Category D Prudence</p> <ul style="list-style-type: none">• should be used as first line treatments, whenever possible• as always, should be used prudently, only when medically needed