



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ
ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΑΠΟ ΠΡΟΒΑΤΑ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ
ΑΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Γ. ΦΩΤΟΥ, ΤΕΧΝ. ΓΕΩΠΟΝΟΣ MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ
ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΑΠΟ ΠΡΟΒΑΤΑ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ
ΑΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Γ. ΦΩΤΟΥ, ΤΕΧΝ. ΓΕΩΠΟΝΟΣ MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

«Η έγκριση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως (Ν. 5343/1932. Άρθρο 202, παρ.2)»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 807/14-01-2011 και αντικατάσταση μέλους της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 924^Α/26-2-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Κωνσταντούλα Ακρίδα – Δεμερτζή

Μέλη:

Παναγιώτης Δεμερτζής

Ευγενία Μπεζιρτζόγλου

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 815/15-04-2011

Θέμα: «Διερεύνηση φαινοτύπων μικροβιακής αντοχής νωπού γάλακτος από πρόβατα πριν και μετά από θεραπεία με αντιμικροβιακούς παράγοντες»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 961/22- 12 -2017

1. Κωνσταντούλα Ακρίδα – Δεμερτζή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Παναγιώτης Δεμερτζής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Ευγενία Μπεζιρτζόγλου, Καθηγήτρια Δημοκρίτειου Παν/μίου Θράκης
4. Ιωάννης Σαββαΐδης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Γεώργιος Μάνος, Καθηγητής Α.Τ.Ε.Ι. Ηπείρου
6. Σωτήριος Κανδρέλης, Ομότιμος Καθηγητής Α.Τ.Ε.Ι. Ηπείρου
7. Ευάγγελος Ψωμάς, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα (10)» στις 8 - 01 - 2018

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Η Γραμματέας του Τμήματος

Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια

Ζωή - Βαλεντίνα Βαμβέτσου

*Στους γιούς μου
Φώτη και Γιώργο*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Την εποπτεία και καθοδήγηση της διατριβής είχε η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ακρίδα – Δεμερτζή Κωνσταντούλα, προς την οποία θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες, για την πολύτιμη βοήθειά της στην προετοιμασία και οργάνωση της διατριβής, την ακούραστη παρακολούθησή της, τη διαρκή υποστήριξη και την πρόθυμη και υπομονετική καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής μου. Θέλω να αναφερθώ στην Καθηγήτρια κ. Μπεζιρτζόγλου Ευγενία, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας – Βιοτεχνολογίας και Υγιεινής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την οποία ευχαριστώ θερμά για τις εύστοχες υποδείξεις της και την αρμονική συνεργασία μας.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Δεμερτζή Παναγιώτη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την άψογη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την κ Τζώρα Αθηνά, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας – Ανοσολογίας ΑΤΕΙ Ηπείρου για την επιστημονική υποστήριξή της, τις πολύτιμες συμβουλές της, την καθοδήγηση και την ηθική συμπαράσταση.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την κ. Βοΐδαρου Χρυσούλα, Διευθύντρια της Διεύθυνσης Δημόσιας Υγείας και Κοινωνικής Μέριμνας της Περιφερειακής Ενότητας Άρτας, για την συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης και συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Τέλος ευχαριστώ τα άτομα που στάθηκαν και στέκονται δίπλα μου συνεχώς σε κάθε βήμα της ζωής μου με αγάπη και υπομονή με στηρίζουν στις αποφάσεις μου, ο λόγος βέβαια για την οικογένειά μου, την οποία ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	6
2.1. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	6
2.1.1. Η Ιστορία της ανάπτυξης των αντιμικροβιακών παραγόντων	6
2.1.2. Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων	8
α) Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων βάση των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων	8
β) Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων βάση του μηχανισμού δράσης τους	9
1) Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος	10
2) Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης	10
3) Αναστολή της σύνθεσης πυρηνικών οξέων	11
4) Αναστολή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης	12
γ) Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων βάση του φάσματος δράσης τους	13
δ) Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων βάση κριτηρίων που σχετίζονται με την μικροβιακή αντοχή	14
2.1.3 Η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνιατρική	16
2.1.3.1 Χρήση αντιβιοτικών στη θεραπεία και πρόληψη λοιμώξεων των ζώων	17
Παραγωγικά ζώα	18
Βοοειδή κρεοπαραγωγής και γαλακτοπαραγωγής	18
Χοίροι	19
Μικρά μηρυκαστικά (αγοπρόβατα)	19
Πτηνά	20
Ζώα συντροφιάς – μικρά κατοικίδια	20

Ιχθύες	20
2.1.3.2. Χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες	27
2.1.3.3. Επιτήρηση της χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνιατρική	29
2.2. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	30
2.2.1. Το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής – Γενική θεώρηση	30
2.2.2. Ορισμοί και μορφές μικροβιακής αντοχής	31
2.2.2.1. Ενδογενής μικροβιακή αντοχή	33
2.2.2.2. Επίκτητη μικροβιακή αντοχή	34
1) Μεταλλάξεις (mutations) (κάθετη μεταβίβαση)	34
2) Απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού - Μεταβίβαση γονιδίων (Οριζόντια μεταβίβαση γονιδίων αντοχής)	35
α) Μεταμόρφωση (transformation)	35
β) Σύζευξη (conjugation)	35
Μεταθετά γενετικά στοιχεία	36
1. Πλασμίδια	36
2. Τρανσποζόνια	37
3. Ιντεγκρόνια	37
γ) Μεταγωγή (transduction)	37
2. 2.3. Βιοχημικοί μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής	38
α) Τροποποίηση – αδρανοποίηση του αντιμικροβιακού φαρμάκου με τη δράση ενζύμων (Enzymatic drug inactivation)	38
β) Τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού (Target modification)	39
γ) Παρεμπόδιση της πρόσδεσης του αντιμικροβιακού φαρμάκου στο στόχο (προστασία στόχου) (Target protection)	39
δ) Διαταραχές στη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (Reduced permeability)	39
ε) Ενεργή εκροή (Active efflux) αντιμικροβιακών φαρμάκων	40

2.2.4. Αντοχή βακτηρίων στα αντιβιοτικά	41
2.2.4.1. Αντοχή των σταφυλοκόκκων στα αντιβιοτικά	41
2.2.4.2. Αντοχή της <i>E.coli</i> στα αντιβιοτικά	44
2.3. ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ	46
α) Μετάδοση βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης γάλακτος	47
1. <i>Staphylococcus aureus</i> , συμπεριλαμβανομένου του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	48
2. Shigatoxin-producing <i>E. coli</i> (STEC)	49
3. Βακτήρια που μεταφέρουν γονίδια μικροβιακής αντοχής στις ευρέως φάσματος βήτα λακταμάσες (ESBL) / AmpC	49
4. <i>Salmonella spp</i>	49
5. <i>Campylobacter spp</i>	51
6. <i>Listeria monocytogenes</i>	52
β) Μετάδοση μικροβιακής αντοχής στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης προϊόντων κρέατος	53
γ) Μετάδοση μικροβιακής αντοχής στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης ιχθύων	53
δ) Μετάδοση μικροβιακής αντοχής στον άνθρωπο μέσω των παραγωγικών ζώων και του περιβάλλοντος των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων	54
2.4. ΓΑΛΑ – ΜΑΣΤΙΤΙΔΕΣ - ANTIBIOTIKA	56
2. 4.1. Γενικά για το γάλα	56
2.4.1.1. Χημική σύσταση γάλακτος	58
2.4.1.1.1. Χημική σύσταση του γάλακτος αγελάδας	58
α) Λίπος	58
β) Πρωτεΐνες	58
γ) Υδατάνθρακες - Λακτόζη	58
δ) Ένζυμα	58

ε) Ανόργανα συστατικά και τέφρα	59
στ) Βιταμίνες	59
2.4.1.1.2. Χημική σύσταση γάλακτος προβάτου	59
2.4.2. Το γάλα ως τρόφιμο	60
2.4.3. Η προέλευση των μικροοργανισμών που απαντούν στο γάλα	61
2.4.4. Μαστίτιδες – Αντιβιοτικά	65
2.4.4.1. Κλινική εκδήλωση μαστίτιδας	66
2.4.4.2. Μέθοδοι διαπίστωσης των μαστίτιδων	67
2.4.4.3. Αντιμετώπιση μαστίτιδων - αντιβιοτικά	68
Επιλογή του κατάλληλου αντιμικροβιακού φαρμάκου	69
Ενδομαστική έγχυση αντιμικροβιακού φαρμάκου	69
Συστηματική χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων	70
2.4.4.4. Φαινοτυπικές Μέθοδοι ελέγχου της in vitro ευαισθησίας παθογόνων μικροοργανισμών στους αντιμικροβιακούς παράγοντες - Δοκιμή ευαισθησίας (αντιβιογράμμα)	70
α) Μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικού σε άγαρ (Kirby-Bauer)	71
β) Μέθοδοι αραιώσεων των αντιβιοτικών σε ζωμό ή άγαρ	71
γ) E-test	72
δ) Αυτοματοποιημένα συστήματα	72
3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	73
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	74
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	74
4.1. ΥΛΙΚΑ	74
4.1.1. Δείγματα	74
4.1.2. Θρεπτικά υποστρώματα	77
4.1.3. Χημικά αντιδραστήρια	77
4.1.4. Λοιπά υλικά	78
	80

4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	
4.2.1. Μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας σωματικών κυττάρων στο νωπό γάλα	80
4.2.2. Τεχνική δειγματοληψίας	81
4.2.3. Προετοιμασία δειγμάτων	82
4.2.3.1. Τεχνική χειρισμού και ομοιογενοποίησης των δειγμάτων	82
4.2.3.2. Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων	82
4.2.4. Μέθοδοι καλλιέργειας των δειγμάτων γάλακτος, ανάπτυξης μικροοργανισμών, απομόνωσης και ταυτοποίησής τους	83
4.2.4.1. Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του είδους <i>Staphylococcus aureus</i>	83
4.2.4.2. Μέθοδος απομόνωσης στελεχών του γένους <i>Salmonella spp</i>	84
4.2.4.3. Μέθοδος απομόνωσης στελεχών του είδους <i>Clostridium perfringens</i>	86
4.2.4.4. Μέθοδος απομόνωσης στελεχών του είδους <i>Escherichia coli</i> Απομόνωση στελεχών <i>E. coli</i> 157:H7	88 89
4.2.4.5. Μέθοδος απομόνωσης και ταυτοποίησης στελεχών του γένους <i>Bacillus spp</i>	90
4.2.4.6. Έλεγχος ευαισθησίας στελεχών του είδους <i>S. aureus</i> στα χημειοθεραπευτικά	91
4.2.4.7. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας με τη μέθοδο αραίωσης των αντιβιοτικών σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα (Ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του φαρμάκου - Minimum Inhibitory Concentration, MIC)	92
Αρχή της μεθόδου	93
Τεχνική της μεθόδου	94
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	97
5.1 Αποτελέσματα	97
5.2. Συζήτηση	155

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	179
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	181
8. ABSTRACT	185
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	188

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.: Ανάπτυξη αντιβιοτικών και εμφάνιση ανθεκτικών σε αυτά βακτηρίων	3
Πίνακας 2α.: Κατηγορίες βακτηριοκτόνων και βακτηριοστατικών αντιμικροβιακών παραγόντων	9
Πίνακας 2β: Φάσμα δράσης των κυριότερων αντιμικροβιακών παραγόντων	13
Πίνακας 3: Αντιβιοτικά κρίσιμης σημασίας στην κτηνιατρική	15
Πίνακας 4:Κατηγορίες αντιμικροβιακών φαρμάκων «κρίσιμων» για την ιατρική, τα οποία χρησιμοποιούνται και στην κτηνιατρική	16
Πίνακας 5: Κατηγορίες αντιβιοτικών κρίσιμης σημασίας που χρησιμοποιούνται στην πρόληψη και θεραπεία νοσημάτων των παραγωγικών ζώων	22
Πίνακας 6: Αντιμικροβιακοί παράγοντες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως αυξητικοί παράγοντες στη διατροφή παραγωγικών ζώων	28
Πίνακας 7: Παραδείγματα ενδογενούς μικροβιακής αντοχής	34
Πίνακας 8: Μικροβιολογικοί κίνδυνοι που ανευρίσκονται στο νωπό γάλα διαφόρων ειδών ζώων, οι οποίοι είναι δυνατό να μεταφερθούν στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης αυτού	65
Πίνακας 9: Δείγματα που μελετήθηκαν	76
Πίνακας 10: Βαθμολόμηση τιμών αποτελεσμάτων του California mastitis test – CMT	81
Πίνακας 11: Ερμηνευτικός πίνακας των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν και τα όρια των ζωνών αναστολής	92
Πίνακας 12: Συνοπτικός ερμηνευτικός πίνακας που παρουσιάζει τα MICs, που ισχύουν για τα στελέχη του βακτηριακού είδους <i>S. aureus</i>	95
Πίνακας 13: Συνοπτικός ερμηνευτικός πίνακας που παρουσιάζει τα MICs, που ισχύουν για τα στελέχη του βακτηριακού είδους <i>E. coli</i>	96
Πίνακας 14: Καταμέτρηση (cfu/ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νωπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Α (μάρτυρες)	97
Πίνακας 15: Καταμέτρηση (cfu/ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νωπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Β1 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη)	100
Πίνακας 16: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νωπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Γ1 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)	103
Πίνακας 17: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νωπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Β2 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη)	106
Πίνακας 18: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νωπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Γ2 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη μετά την παρέλευση του	108

	χρόνου αναμονής)	
Πίνακας 19:	Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νωπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας B3 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη)	110
Πίνακας 20:	Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νωπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Γ3 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)	112
Πίνακας 21:	Καταμέτρηση (cfu/ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας B1 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη)	114
Πίνακας 22:	Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας Γ1 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)	117
Πίνακας 23:	Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας B2 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη)	120
Πίνακας 24:	Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας Γ2 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)	122
Πίνακας 25:	Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας B3 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη)	124
Πίνακας 26:	Καταμέτρηση (cfu/ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας Γ3 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)	126
Πίνακας 27:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας B1 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη) για τα απομονωθέντα στελέχη της <i>E. coli</i>	128
Πίνακας 28:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας Γ1 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη και μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη της <i>E. coli</i>	129
Πίνακας 29:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας B2 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη) για τα απομονωθέντα στελέχη της <i>E. coli</i>	129
Πίνακας 30:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας Γ2 (από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη της <i>E. coli</i>	130
Πίνακας 31:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα)	130

	προβατίων της ομάδας B3 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη) για τα απομονωθέντα στελέχη της <i>E. coli</i>	
Πίνακας 32:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίων της ομάδας Γ3 (προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη της <i>E. coli</i>	131
Πίνακας 33:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίων της ομάδας B1 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη) για τα απομονωθέντα στελέχη του <i>S. aureus</i>	132
Πίνακας 34:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίων της ομάδας Γ1 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη του <i>S. aureus</i>	134
Πίνακας 35:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίων της ομάδας B2 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη) για τα απομονωθέντα στελέχη του <i>S. aureus</i>	135
Πίνακας 36:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίων της ομάδας Γ2 (από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη του <i>S. aureus</i>	136
Πίνακας 37:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίων της ομάδας B3 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη) για τα απομονωθέντα στελέχη του <i>S. aureus</i>	137
Πίνακας 38:	Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίων της ομάδας Γ3 (προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη του <i>S. aureus</i>	138
Πίνακας 39:	Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>E. coli</i> ομάδας B1 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	139
Πίνακας 40:	Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>E. coli</i> ομάδας Γ1 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	140
Πίνακας 41:	Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>E. coli</i> ομάδας B2 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	141
Πίνακας 42:	Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>E. coli</i> ομάδας Γ2 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	142

Πίνακας 43: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>E. coli</i> ομάδας B3 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	143
Πίνακας 44: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>E. coli</i> ομάδας Γ3 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	144
Πίνακας 45: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>S. aureus</i> ομάδας B1 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	145
Πίνακας 46: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>S. aureus</i> ομάδας Γ1 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	146
Πίνακας 47: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>S. aureus</i> ομάδας B2 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	147
Πίνακας 48: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>S. aureus</i> ομάδας Γ2 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	148
Πίνακας 49: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>S. aureus</i> ομάδας B3 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	149
Πίνακας 50: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών <i>S. aureus</i> ομάδας Γ3 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν	150
Πίνακας 51: Αποτύπωση των ορίων ζωνών αναστολής κατά τον έλεγχο ευαισθησίας του μοναδικού απομονωθέντος Μεθικιλίνη Ανθεκτικό (MRSA) στελέχους <i>S. aureus</i>	151
Πίνακας 52: Συγκριτικός πίνακας αποτύπωσης θετικών δειγμάτων νοπού γάλακτος προβατίνων (έξι ομάδες εξεταζόμενων δειγμάτων) ως προς την απομόνωση βακτηρίων	152
Πίνακας 53: Συγκριτικός πίνακας αποτύπωσης θετικών δειγμάτων κοπράνων προβατίνων (έξι ομάδες εξεταζόμενων δειγμάτων) ως προς την απομόνωση βακτηρίων	153
Πίνακας 54: Συγκριτικός πίνακας αποτύπωσης θετικών δειγμάτων εκκρίματος μαστικού αδένου (γάλακτος) και κοπράνων προβατίνων (έξι ομάδες εξεταζόμενων δειγμάτων) ως προς την απομόνωση στελεχών <i>E. coli</i> O157:H7	154
Πίνακας 55: Κατανομή των θετικών δειγμάτων γάλακτος και μεγέθη απομονωθέντων πληθυσμών (cfu/ml)	156
Πίνακας 56: Συγκριτική κατανομή στελεχών <i>E. coli</i> O157:H7 μεταξύ των πειραματικών ομάδων σε δείγματα γάλακτος	158
Πίνακας 57: Σύμπτυξη του Πίνακα 56	158
Πίνακας 58: Συγκριτική κατανομή στελεχών <i>E. coli</i> O157:H7 μεταξύ των πειραματικών ομάδων σε δείγματα γάλακτος	159
Πίνακας 59: Συγκριτική κατανομή στελεχών <i>E. coli</i> O157:H7 μεταξύ των πειραματικών ομάδων σε δείγματα κοπράνων	167
Πίνακας 60: Συγκριτική κατανομή στελεχών <i>E. coli</i> O157:H7 μεταξύ των πειραματικών ομάδων σε δείγματα κοπράνων (βιοχημικό προφίλ και οροτύπηση)	167
Πίνακας 61: Ανθεκτικά στελέχη <i>E. coli</i> ανά πειραματική ομάδα και breakpoints (mg/L)	171
Πίνακας 62: Ανθεκτικά στελέχη ανά ομάδα και breakpoints του <i>S. aureus</i>	173
Πίνακας 63: Ανθεκτικότητα των στελεχών του <i>S. aureus</i> ανά πειραματική ομάδα	175
Πίνακας 64: Κατανομή των ανθεκτικών στελεχών της <i>E. coli</i> στις ομάδες που μελετήθηκαν	177
Πίνακας 65: Κατανομή των ανθεκτικών στελεχών της <i>E. coli</i> O157:H7 στις ομάδες που μελετήθηκαν	177

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων μηχανισμών δράσης των αντιμικροβικών φαρμάκων έναντι των μικροοργανισμών	12
Εικόνα 2: Μεταβίβαση γονιδίων μικροβιακής αντοχής	38
Εικόνα 3: Κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί αντιμικροβιακής αντοχής	40
Εικόνα 4: Τυπική κλινική εικόνα γαγγραινώδους μαστίτιδας με την αποβολή γάλακτος με τη μορφή αίματος και νερού	66
Εικόνα 5: α) California Mastitis Test (CMT), β) Ανάγνωση αποτελέσματος	81
Εικόνα 6: α) Τυπικές αποικίες <i>S. aureus</i> σε Baird – Parker Agar (BP), β) Gram χρώση: <i>S. aureus</i>	84
Εικόνα 7: α) Τυπικές αποικίες <i>Salmonella spp.</i> σε XLD agar και β) Gram χρώση: <i>Salmonella spp.</i>	86
Εικόνα 8: α) Gram χρώση: <i>Clostridium perfringens</i> , β) Εμφάνιση ανάπτυξης <i>Clostridium perfringens</i> σε Lactose – Sulfite (L.S.) Broth, γ) Lactose – Sulfite (L.S.) Broth μη ανάπτυξη <i>Clostridium perfringens</i> .	87
Εικόνα 9: α) Αποικίες <i>E. coli</i> σε VRBGA, β) Gram χρώση: <i>E. coli</i>	89
Εικόνα 10: α) Τυπικές αποικίες <i>Bacillus cereus</i> σε MEYP agar, β) Χρώση Gram	91
Εικόνα 11: Απεικόνιση μικροπλάκας τιτλοποίησης 96 φρεατίων από πολυστυρένιο	94

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στην καταπολέμηση των μολυσματικών ασθενειών βακτηριακής προέλευσης αποτελεί αντικείμενο ύψιστης σημασίας τα τελευταία 60 χρόνια και έφερε επανάσταση στα ιατρικά δεδομένα. Η αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία συνέβαλε κατά κύριο λόγο στην αύξηση του μέσου όρου του προσδόκιμου ζωής του ανθρώπου τον 20^ο αιώνα, διότι εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές έχουν σωθεί λόγω της χρήσης τους για στην ίαση διαφόρων λοιμώξεων.

Πολύ γρήγορα, στην ανθρώπινη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων προστέθηκε και η χρήση αυτών στην κτηνιατρική, τη γεωργία και την τεχνολογία των τροφίμων. Σήμερα σχεδόν όλες οι κατηγορίες αντιμικροβιακών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων και των νεότερων κατηγοριών αντιμικροβιακών όπως οι τρίτης και τέταρτης γενεάς κεφαλοσπορίνες, (οι φλουοροκινολόνες, τα γλυκοπεπτιδία και οι στρεπτογραμίνες) που χρησιμοποιούνται στην ιατρική, χρησιμοποιούνται και στην κτηνιατρική (Aarestrup et al 2008). Η μαζική χρήση τους στον τομέα αυτό στήριξε την εντατικοποίηση της σύγχρονης εκτροφής ζώων από τις αρχές της δεκαετίας του 1960, διευκολύνοντας τον πρώιμο απογαλακτισμό, τη δυνατότητα αύξησης της πυκνότητας των εκτρεφόμενων ζώων στις πτηνο-κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις, τη χρήση οικονομικότερων πηγών ζωοτροφών και πιθανότατα συνέβαλε στην αύξηση των αποδόσεων των ζώων και στην μείωση της τιμής των προϊόντων ζωικής προέλευσης. Όσον αφορά την κτηνιατρική χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων, εκτός της θεραπευτικής τους χρήσης σε ζώα συντροφιάς και παραγωγικά ζώα, χρησιμοποιούνται και για την πρόληψη εμφάνισης λοιμώξεων στις εκτροφές των παραγωγικών ζώων, καθώς και ως αυξητικοί παράγοντες για την αύξηση στην παραγωγή των πρώτων υλών (γάλα) των ζωοκομικών προϊόντων. Απόρροια των ανωτέρω, η χρήση τους αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης βιομηχανοποιημένης παραγωγής τροφίμων ζωικής προέλευσης. Εκτιμάται ότι η ποσότητα των αντιμικροβιακών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στο ζωικό πληθυσμό υπερβαίνει την αντίστοιχη αυτών για ανθρώπινη χρήση παγκόσμια. Το 1998 εκτελέστηκαν 80 εκατομμύρια ιατρικές συνταγές αντιβιοτικών στις Ηνωμένες Πολιτείες, ποσοστό που αντιστοιχεί σε 12.500 τόνους αντιβιοτικών. Δεδομένου ότι η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στην κτηνιατρική και τη γεωργία προστίθενται στην ανθρώπινη χρήση και ότι η χρήση αυτών στις αγροτικές πρακτικές αντιπροσωπεύει ποσοστό μεγαλύτερο από το 60% του συνόλου των χρήσεων στις Ηνωμένες Πολιτείες, οπότε αθροιστικά υπάρχει επιβάρυνση του περιβάλλοντος με 18.000 τόνους αντιβιοτικών (Todar 2011).

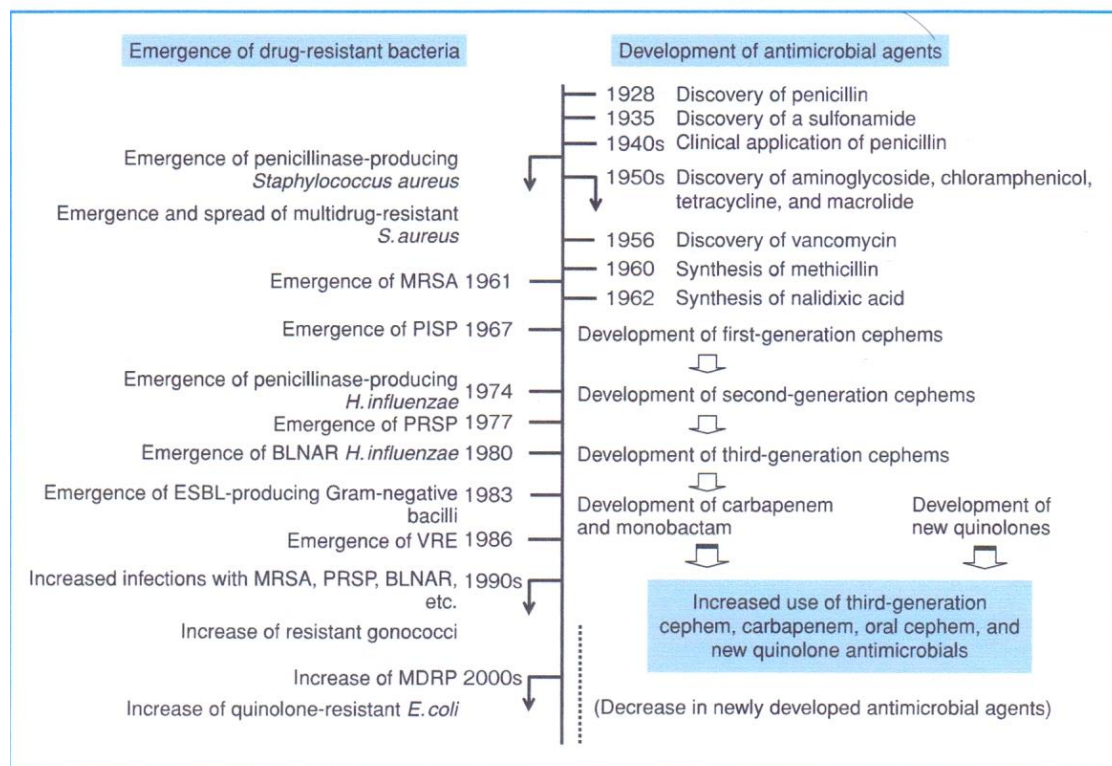
Σήμερα, οχτώ δεκαετίες μετά την ανακάλυψη των αντιβιοτικών, οι πολύτιμες αυτές για τον άνθρωπο ουσίες χάνουν την αποτελεσματικότητά τους με συνεχώς επιταχυνόμενο ρυθμό λόγω της εξάπλωσης του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής στους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί φυσιολογικό βιολογικό φαινόμενο και είναι συνέπεια της φυσικής επιλογής, κατά την οποία μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν αντοχή σε κάποιον αντιμικροβιακό παράγοντα, επιλέγονται και επικρατούν στον πληθυσμό των μικροοργανισμών, όταν ο πληθυσμός αυτός εκτεθεί στον αντιμικροβιακό παράγοντα. Τα μικροβιακά αυτά στελέχη είναι δυνατό στη συνέχεια να μεταδοθούν σε άλλο ξενιστή (άνθρωπο ή ζώο) ή / και να διασπαρούν στο περιβάλλον. Η υπέρμετρη και μη ενδεδειγμένη χρήση των αντιβιοτικών διαταράσσει την ισορροπία αυτού του φυσιολογικού φαινομένου. Η αυξανόμενη και μη ορθολογική χρήση των υπαρχόντων αντιβιοτικών τα τελευταία χρόνια στην ιατρική, την κτηνιατρική και την γεωργία συνέβαλε στην εξάπλωση του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής στα διαθέσιμα αντιβιοτικά και έχει αναγνωριστεί και καταγραφεί τις τελευταίες δεκαετίες ως παγκόσμιο πρόβλημα για τη Δημόσια Υγεία και μια από τις κορυφαίες προκλήσεις του 21ου αιώνα (Levy 2002, Jones and Rieke 2003, Chiller et al 2004, Levy and Marshall 2004, Phillips et al 2004, Carnevale 2005, Cox and Ricci 2008, Control and Prevention 2010, Marshall and Levy 2011, Voidarou 2011, WHO 2014).

Σήμερα, περίπου το 70% των βακτηρίων τα οποία προκαλούν ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις είναι ανθεκτικά τουλάχιστον σε ένα από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συχνότερα για θεραπευτικούς σκοπούς. Κάποιοι μικροοργανισμοί είναι ανθεκτικοί σε όλα τα εγκεκριμένα προς χρήση αντιβιοτικά και μπορούν να αντιμετωπιστούν μόνο με φάρμακα, η δράση των οποίων βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο και ως εκ τούτου είναι δυνητικά τοξικά. Επίσης έχει τεκμηριωθεί ανησυχητική αύξηση της ανθεκτικότητας στους αντιμικροβιακούς παράγοντες βακτηρίων των γενών *Staphylococcus* και *Streptococcus* (κυρίως *Streptococcus pneumoniae*), τα οποία είναι τα κύρια αίτια λοιμώξεων, που σχετίζονται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας του ανθρώπου. Σε πρόσφατες μελέτες βρέθηκε ότι το 25% των βακτηρίων που προκαλούν πνευμονία είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη και επιπρόσθετα το 25% αυτών είναι ανθεκτικά σε περισσότερα του ενός αντιβιοτικά (Todar 2011).

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών και η εμφάνιση ανθεκτικών σε αυτά, βακτηριακών στελεχών αποτυπώνεται χρονολογικά στον πίνακα 1.

Πίνακας 1.: Ανάπτυξη αντιβιοτικών και εμφάνιση ανθεκτικών σε αυτά βακτηρίων (Saga and Yamaguchi 2009, Wegener 2012).



Η διερεύνηση του τρόπου συσχέτισης των ανθεκτικών στους αντιμικροβιακούς παράγοντες βακτηρίων που προσβάλουν τον άνθρωπο, με τα αντίστοιχα που προσβάλουν τα παραγωγικά ζώα είναι περίπλοκη και δύσκολη. Η μετάδοση της μικροβιακής αντοχής από τα ζώα στον άνθρωπο δύναται να πραγματοποιηθεί με ποικίλους τρόπους, με την τροφική αλυσίδα να καταλαμβάνει πιθανώς την πρώτη θέση δεδομένου ότι οι περισσότερες λοιμώξεις στις αναπτυσσόμενες χώρες που προκαλούνται από παθογόνα βακτήρια – ανθεκτικά στους αντιμικροβιακούς παράγοντες του γαστρεντερικού σωλήνα, (*Salmonella enterica*, *Campylobacter coli/jejuni*, και *Yersinia enterocolitica*), πιθανώς λαμβάνουν χώρα μέσω αυτής της οδού (Wegener 2012). Επίσης παθογόνα βακτήρια που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι δυνατό να μεταφερθούν στον άνθρωπο μέσω της άμεσης επαφής με τους ζωικούς πληθυσμούς (π.χ. MRSA CC398) (Aarestrup et al. 2008). Βακτηριακά στελέχη καθώς και κατάλοιπα αντιβιοτικών προερχόμενα από τις εκτροφές ζώων διασπείρονται στο περιβάλλον, κυρίως μέσω της κόπρου και επηρεάζουν βακτηριακούς πληθυσμούς διαφόρων οικοσυστημάτων συμπεριλαμβανομένων και αυτών της άγριας πανίδας. Ως εκ τούτου το περιβάλλον και η άγρια πανίδα είναι δυνατό να γίνουν δεξαμενές παθογόνων μικροοργανισμών, με δυνατότητα μεταφοράς της μικροβιακής αντοχής στον άνθρωπο (Bezirtzoglou et al 2008,

Wegener 2012). Η έκταση αυτού του τρόπου μετάδοσης της μικροβιακής αντοχής (από ζωικούς πληθυσμούς σε ανθρώπους) δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς και ενδεχομένως να ποικίλλει για τα διαφορετικά είδη βακτηρίων. Η εξάπλωση γονιδίων αντοχής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες από τα βακτήρια που αποικίζουν τα ζώα, σε παθογόνα βακτήρια του ανθρώπου αποτελεί επιπρόσθετο δυνητικό κίνδυνο που περιπλέκει την κατάσταση (Council 1999, Wright 2010, Marshall and Levy 2011). Η διεθνής επιστημονική κοινότητα κατανοώντας και αναγνωρίζοντας το μέγεθος του προβλήματος της μικροβιακής αντοχής βρίσκεται σε συνεχή κινητοποίηση, η οποία αποσκοπεί κατά κύριο λόγο σε διορθωτικές ενέργειες για τον έλεγχο και περιορισμό του φαινομένου αυτού και την ενδεχόμενη εξάλειψή του για συγκεκριμένες ομάδες βακτηρίων. Η συνεργασία μεταξύ φορέων που δραστηριοποιούνται στους τομείς της ιατρικής, κτηνιατρικής, κτηνοτροφίας και γεωργίας για μια ολιστική προσέγγιση του θέματος είναι απαραίτητη διότι η χρήση αντιμικροβιακών είναι δεδομένη σε όλους αυτούς τους τομείς. Η συγκέντρωση περισσότερων βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με τη χρήση των αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα παγκοσμίως και με την εμφάνιση μικροβιακής αντοχής σε διαφορετικές χώρες και σε διαφορετικά συστήματα παραγωγής (ECDC and EMEA 2009, Diaz 2013) κρίνεται απαραίτητη, ώστε να είναι εφικτές οι συγκρίσεις μεταξύ στοιχείων των χωρών προκειμένου να εντοπιστούν οι περιοχές προτεραιότητας για παρέμβαση. Οι διαφορές στα συστήματα παραγωγής, στη μεθοδολογία δειγματοληψίας, στα εργαστηριακά πρωτόκολλα / μεθοδολογίες και τα επικρατούντα βακτήρια, καθιστούν τη σύγκριση των δεδομένων μεταξύ των χωρών δύσκολη και σε μερικές περιπτώσεις αδύνατη. Ωστόσο, υπάρχει ανάγκη εναρμόνισης των μεθοδολογιών στα συστήματα επιτήρησης ώστε να επιτραπεί η συγκρισιμότητα, να προαχθεί καλύτερος συντονισμός, κατανόηση του προβλήματος παγκοσμίως και επίτευξη προόδου.

Η αλόγιστη και συστηματική χρήση αντιβιοτικών σκευασμάτων στη θεραπευτική προσέγγιση μαστίτιδων στα παραγωγικά ζώα και η παρουσία καταλοίπων στο νωπό γάλα έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων. Στην Κείμενη Ευρωπαϊκή και Ελληνική Νομοθεσία θέτονται κανόνες ως προς την χρήση αντιβιοτικών και την τήρηση χρονικών ορίων αναμονής, όπου το νωπό γάλα δεν επιτρέπεται να εισέλθει στην τροφική αλυσίδα.

Λαμβάνεται δε ως κανόνας ότι μετά την πιστή τήρηση του χρονικού ορίου αναμονής, το νωπό γάλα, εφόσον ελεγχθεί και δώσει: (α) αρνητικό αποτέλεσμα ως προς την ύπαρξη καταλοίπων αντιβιοτικών και (β) ολικό αριθμό μεσόφιλων βακτηρίων (OMX), ολικό αριθμό ψυχρόφιλων βακτηρίων και ολικό αριθμό *E. coli* (εκφρασμένα σε cfu / ml) εντός θεσμοθετημένων ορίων μπορεί να δοθεί στη βιομηχανία τροφίμων.

Εν τούτοις μελέτες ως προς την κατανόηση της δυναμικής της παραμένουσας μικροβιακής χλωρίδας του γάλακτος και την χαρτογράφηση της ευαισθησίας / ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικές ουσίες των απομονωθέντων βακτηριακών ομάδων, σε ζώα που έχουν μόλις δεχτεί θεραπεία για μαστίτιδα ή μόλις έχουν εξέλθει από την επιτήρηση του χρονικού ορίου αναμονής, δεν υπάρχουν στην ελληνική και διεθνή βιβλιογραφία.

Μία ολιστική προσέγγιση του συστήματος «θεραπευτική αγωγή για μαστίτιδες - νοπό γάλα και διερεύνηση βακτηριακών ομάδων, οι οποίες πιθανόν να μπορούν να αποτελέσουν δείκτη επιβάρυνσης ως προς την ύπαρξη πολυανθεκτικών στελεχών σε αντιβιοτικές ουσίες» κρίνεται αναγκαία.

2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

2.1.1. Η Ιστορία της ανάπτυξης των αντιμικροβιακών παραγόντων

Εξετάζοντας το χρονικό εμφάνισης και εξέλιξης των ασθενειών του ανθρώπου, τα λοιμώδη νοσήματα αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο ποσοστό αυτών. Λίγο πριν το δεύτερο μισό του 19ου αιώνα διαπιστώθηκε ότι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για πληθώρα λοιμωδών νοσημάτων, που μαστίζουν την ανθρωπότητα από την αρχαιότητα και κατά συνέπεια, έλαβε χώρα η εμφάνιση και εξέλιξη της χρήσης των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, έναντι των αιτιολογικών παραγόντων των λοιμώξεων (Saga and Yamaguchi 2009). Τα αντιμικροβιακά είναι βιοσυνθετικές, συνθετικές ή ημισυνθετικές ουσίες οι οποίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις εκδηλώνουν μικροβιοκτόνο ή μικροβιοστατική δράση. Στην πραγματικότητα πρόκειται για τοξικές ουσίες (ενδοτοξίνες), οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς και οι οποίες χρησιμοποιούνται απ' αυτούς ως όπλο εναντίον άλλων μικροοργανισμών στον αγώνα για την επιβίωση. Αν και το προαναφερόμενο φαινόμενο του ανταγωνισμού μεταξύ μικροοργανισμών και η χρήση αποικιών μικροβίων, ως πηγή παραγωγής δραστικών ουσιών έναντι λοιμωδών νοσημάτων πρέπει να ήταν γνωστή από την αρχαιότητα, η πρώτη ουσιαστική παρατήρηση του φαινομένου αυτού έγινε το 1877 από τους Pasteur και Joubert, οι οποίοι ανακοίνωσαν, ότι το βακτηρίδιο του άνθρακα παύει να πολλαπλασιάζεται, όταν στο τριβλίο επώασης αυτού συνυπάρχει καλλιέργεια του *Bacillus subtilis* (Pasteur and Joubert 1877). Ακολούθησε παρόμοια παρατήρηση, από τον Gaffe λίγα χρόνια αργότερα, ο οποίος διαπίστωσε ότι η ανάπτυξη αποικίας σταφυλόκοκκου αναστέλλεται παρουσία ψευδομονάδας (Fuller et al 1971, Feline et al 1977). Το 1910 παρασκευάστηκε από τον Ehrlich ο αντιμικροβιακός παράγοντας με το όνομα σαλβαράζ, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της σύφιλης (Ingraham and Beerman 1950, Sarbu et al 2014, Lekshmi et al 2017). Η ανακάλυψη της πενικιλίνης το 1929 από τον Αλέξανδρο Φλέμινγκ, άνοιξε το δρόμο για τη σύγχρονη εποχή των αντιβιοτικών (Fleming 1980). Πολύ σύντομα ακολούθησε η ανακάλυψη πολλών άλλων αντιμικροβιακών φαρμάκων. Το 1935 οι σουλφοναμίδες αναπτύχθηκαν από τον Domagk και άλλους ερευνητές οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η προντοζίλη είχε θεραπευτικά αποτελέσματα, όταν χορηγήθηκε σε ζώα με λοίμωξη από αιμολυτικό στρεπτόκοκκο (Domagk 1935). Η ουσία αυτή δεν παρουσίαζε αντιμικροβιακή δράση in vitro, γεγονός το οποίο εξηγήθηκε αργότερα όταν διαπιστώθηκε ότι η προντοζίλη στον οργανισμό του ζώου μεταβολίζεται σε σουλφαναμίδη, η οποία και εκδήλωνε την αντιμικροβιακή δράση. Όπως είναι γνωστό, η σουλφαναμίδη αποτέλεσε τη μητρική ουσία της μεγάλης

αντιμικροβιακής οικογένειας των σουλφοναμιδών (Saga and Yamaguchi 2009, Jeśman et al 2011). Κατά τη διάρκεια των επόμενων δύο δεκαετιών, αναπτύχθηκαν νέες κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων η μία μετά την άλλη, οδηγώντας στη «χρυσή εποχή» της αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας. Το 1944, η στρεπτομυκίνη (αμινογλυκοζίδη), απομονώθηκε από βακτήριο του εδάφους (Schatz et al 1944). Στη συνέχεια, από σαπρόφυτα βακτήρια του εδάφους ανακαλύφθηκαν η χλωραμφενικόλη, η τετρακυκλίνη, τα μακρολίδια και τα γλυκοπεπτίδα (π.χ. βανκομυκίνη) (Appelbaum 2006). Το ναλιδιζικό οξύ, ένας συνθετικός αντιμικροβιακός παράγοντας της κατηγορίας των κινολονών παράχθηκε το 1962. Η συνεχής έρευνα και η βελτίωση της παραγωγής διαφόρων κατηγοριών αντιμικροβιακών παραγόντων οδήγησαν στην παρασκευή αντιμικροβιακών ουσιών ευρύτερου αντιμικροβιακού φάσματος και υψηλότερης αντιμικροβιακής δράσης με κύριο εκπρόσωπο τα β - λακταμικά αντιβιοτικά στα οποία ανήκουν οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι καρβεπενέμες και οι μονοβακτάμες. Εκτός των συνεχών βελτιώσεων όσον αφορά το αντιμικροβιακό φάσμα και τη δραστικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων, πρόοδος επήλθε με την ανάπτυξη φαρμάκων με καλύτερη φαρμακοδυναμική (καλύτερη απορρόφηση και συγκέντρωσή τους στο αίμα και τους ιστούς). Επιπλέον, με την καθιέρωση της εφαρμογής της αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας, βαρύτητα δόθηκε και στην ασφάλεια χρήσης των φαρμάκων αυτών, με αποτέλεσμα αντιμικροβιακοί παράγοντες που σχετίζονται με σοβαρές παρενέργειες να αντικατασταθούν με άλλους ασφαλέστερους. Οι κινολόνες αντιπροσωπεύουν χαρακτηριστικό παράδειγμα φαρμάκων με βελτιωμένη φαρμακοδυναμική και ασφάλεια. Το ναλιδιζικό οξύ, το πρώτο φάρμακο αυτής της κατηγορίας, ήταν δραστικό μόνο έναντι Gram-αρνητικών βακτηρίων και η χρήση του αρχικά περιοριζόταν σε λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, διότι επιτυγχάνει χαμηλές συγκεντρώσεις στο αίμα, κακή κατανομή στους ιστούς και ταχύ μεταβολισμό στο ανθρώπινο σώμα. Αντίθετα, η νορφλοξασίνη, η οποία τέθηκε σε κυκλοφορία το 1984, διατηρεί σταθερή μεταβολική κατάσταση και παρουσιάζει καλή κατανομή στους ιστούς, ενώ το αντιμικροβιακό της φάσμα είναι εκτενέστερο και καλύπτει τόσο τα Gram-θετικά όσο και τα Gram-αρνητικά βακτήρια συμπεριλαμβανομένης της *Pseudomonas aeruginosa* (Yoneda et al 2004, Saga and Yamaguchi 2009). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες της κατηγορίας των κινολονών που αναπτύχθηκαν μετά από τη νορφλοξασίνη ονομάστηκαν «νέες κινολόνες» και εξακολουθούν να είναι κύρια φάρμακα στην αντιμετώπιση λοιμώξεων με υψηλή αντιμικροβιακή δράση, ενώ η συχνότητα εμφάνισης των προκαλούμενων από αυτές παρενεργειών στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως τάση ανησυχίας και ίλιγγος είναι ηπιότερες (Powers 2004, Lekshmi et al 2017). Παρότι πολλές φαρμακευτικές εταιρείες σε διάφορες χώρες ανταγωνίστηκαν στην

ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων, ο αριθμός νέων διαθέσιμων φαρμάκων έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Από την άλλη πλευρά τα λοιμώδη νοσήματα συνεχίζουν να προσβάλλουν τον άνθρωπο, είτε ως αναδυόμενες και επανεμφανιζόμενες λοιμώξεις είτε ως ευκαιριακές λοιμώξεις και ως λοιμώξεις προκαλούμενες από μικροοργανισμούς, οι οποίοι παρουσιάζουν αντοχή στα υπάρχοντα αντιμικροβιακά φάρμακα (Morens et al 2004, Saga and Yamaguchi 2009). Η ορθολογική χρήση των περιορισμένων χημειοθεραπευτικών επιλογών στις μέρες μας είναι ύψιστης σημασίας δεδομένης της έλλειψης νέων φαρμάκων στην αγορά.

2.1.2. Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες ταξινομούνται σε ομάδες με διάφορα κριτήρια, όπως οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, ο μηχανισμός δράσης τους, το φάσμα δράσης τους κ.α. (Calderón and Sabundayo 2007).

α) Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων βάση των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων

Με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες οι αντιμικροβιακοί παράγοντες κατηγοριοποιούνται σε βακτηριοκτόνα, τα οποία επιφέρουν θανάτωση των βακτηρίων άμεσα και σε βακτηριοστατικά τα οποία προκαλούν επιβράδυνση της αναπαραγωγής των βακτηρίων, προκαλώντας θανάτωση – εξουδετέρωση αυτών μετά από τους αμυντικούς μηχανισμούς των ξενιστών (Frost 2007). Οι διαφορές αυτές σε γενικές γραμμές δεν είναι ουσιώδεις όσον αφορά την ανταπόκριση του ξενιστή (Bath-Hextall et al 2011), ωστόσο υπάρχουν κλινικές καταστάσεις κατά τις οποίες η επιλογή ενός βακτηριοκτόνου ή βακτηριοστατικού παράγοντα είναι κρίσιμη, όπως στην περίπτωση λοιμώξεων ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, ειδικά αυτών που παρουσιάζουν ουδετεροπενία. Η χρήση βακτηριοκτόνων παραγόντων είναι απαραίτητοι στη μέτρια ή σοβαρή ουδετεροπενία και επίσης ενδείκνυνται στη θεραπεία της μηνιγγίτιδας μικροβιακής προέλευσης και της βακτηριακής ενδοκαρδίτιδας (Finch 2009). Στον πίνακα 2α δίνονται τα κυριότερα βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά.

Πίνακας 2α.: Κατηγορίες βακτηριοκτόνων και βακτηριοστατικών αντιμικροβιακών παραγόντων (Cohen et al 2003, Nemeth et al 2015)

Βακτηριοκτόνα	Βακτηριοστατικά
aminoglycosides	glycylcyclines
b-lactams	lincosamides
fluoroquinolones	macrolides
glycopeptides	oxazolidinones
lipopeptides	streptogramins
nitroimidazoles and nitrofurans	sulphonamides

β) Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων βάση του μηχανισμού δράσης τους

Τα αντιβιοτικά είναι αποτελεσματικά έναντι των βακτηριακών κυττάρων (γνωστά και ως προκαρυωτικά κύτταρα). Όπως είναι γνωστό τα βακτηριακά κύτταρα είναι δομικά απλούστερα και πολύ μικρότερα σε σχέση με τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Tortora et al 2004). Οι διαφορές της κυτταρικής δομής μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων αποτελούν κριτήριο διαφοροποίησης ως προς τη δράση των αντιμικροβιακών παραγόντων, φαινόμενο το οποίο είναι γνωστό ως επιλεκτική τοξικότητα (Bath-Hextall et al 2011). Η επιλεκτικότητα αυτή βασίζεται στην αρχή ότι τα αντιβιοτικά αναστέλλουν τις βασικές βιοχημικές διεργασίες των βακτηριακών κυττάρων ενώ δεν επηρεάζουν σημαντικά τα κύτταρα του ξενιστή. Για ορισμένα αντιβιοτικά υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης αυτών η οποία επιφέρει επίδραση στους μικροοργανισμούς και αυτής που επιφέρει επίδραση στα κύτταρα-ξενιστές, γεγονός που σημαίνει ότι τα αντιβιοτικά μπορούν να έχουν δυσμενείς επιδράσεις στα κύτταρα-ξενιστές εάν η συγκέντρωση αυτών είναι υψηλή (Simonsen et al 2006). Κάποια αντιβιοτικά είναι περισσότερο αποτελεσματικά έναντι των κατά Gram-αρνητικών ενώ άλλα έναντι των κατά Gram-θετικών βακτηρίων, γεγονός που ενδυναμώνει την άποψη της επιλογής του κατάλληλου αντιβιοτικού (Frost 2007, Kaufman 2011). Υπάρχουν τέσσερις κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων έναντι των μικροοργανισμών, οι οποίοι βασίζονται στο φαινόμενο της εκλεκτικής τοξικότητας και παρατίθενται παρακάτω (Talaro 2004, Madigan et al 2008, Wright 2010, Talaro and Chess 2012, Prescott and Dowling 2013, Talaro and Chess 2018):

1) Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος

Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της ομάδας αντιβιοτικών είναι τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες), η βανκομυκίνη, η κυκλοσερίνη, η ριστοσετίνη, η βακιτρακίνη και η νοβοβοκίνη.

Τα βακτηριακά κύτταρα περιβάλλονται από τοίχωμα το οποίο δρα προστατευτικά έναντι μηχανικών επιδράσεων του περιβάλλοντος σε αυτά (όπως είναι οι μεταβολές της οσμωτικής πίεσης) και η λύση του τα καθιστά ευάλωτα. Το κριτήριο διαχωρισμού των βακτηρίων σε κατά Gram-θετικά και κατά Gram-αρνητικά αποτέλεσε η χημική σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Το μεγαλύτερο ποσοστό του κυτταρικού τοιχώματος των κατά Gram-θετικών βακτηρίων καταλαμβάνει το μουκοπεπτίδιο πεπτιδογλυκάνη (μουρεΐνη) (90%), ενώ στο τοίχωμα των κατά Gram-αρνητικών η ουσία αυτή καταλαμβάνει μόλις το 4-5%. Κατά συνέπεια τα β-λακταμικά αντιβιοτικά καθώς και άλλες αντιμικροβιακές ουσίες που έχουν ίδιο τρόπο δράσης αναστέλλουν το σχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης σε διάφορα στάδια, γεγονός στο οποίο αποδίδεται και η ιδιαίτερη δράση τους κυρίως έναντι των κατά Gram-θετικών μικροβίων (Josephine et al 2004, Kahne et al 2005, Park and Uehara 2008).

2) Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης

Όλοι οι ζωντανό οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων και των βακτηρίων, καθορίζονται από την ποσότητα και τον τύπο των πρωτεϊνών που έχουν ως δομικά συστατικά, τα οποία συνεχώς οφείλουν να παράγουν κατά τις διάφορες μεταβολικές και φυσιολογικές διεργασίες και κατά την ανταπόκριση των κυττάρων στις δυσμενείς συνθήκες. Δεδομένης λοιπόν της πρωτεύουσας σημασίας των πρωτεϊνών στις μεταβολικές και βιολογικές διεργασίες όλων των ζωντανών οργανισμών, οποιαδήποτε διαταραχή της διαδικασίας σύνθεσής τους σε ένα βακτηριακό κύτταρο οδηγεί στην παρεμπόδιση της ανάπτυξής του και την ολική καταστροφή του. Ο τύπος και η ποσότητα των πρωτεϊνών που παράγονται από ένα βακτήριο σε οποιαδήποτε δεδομένη στιγμή εξαρτάται από πληροφορίες που περιέχονται σε ένα ακόμα πολύ σημαντικό βιομόριο αυτού, το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA). Το DNA προσδιορίζει τον τύπο πρωτεΐνης που παράγει ένα βακτηριακό κύτταρο μέσω πληροφοριών που εμπεριέχει. Η πληροφορία αυτή είναι ένα σύνολο από γενετικούς κώδικες που ονομάζονται κωδικόνια και μεταφέρεται σε ένα συμπληρωματικό βιομόριο, το ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA) και συγκεκριμένα το αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA – mRNA). Στη συνέχεια αυτό μεταφράζεται (μέσω του transfer RNA - tRNA και των ριβοσωμάτων) σε πρωτεΐνη (Menninger and Otto 1982, Etebu 2013). Το ριβόσωμα των βακτηρίων, το οποίο αποτελεί το εργοστάσιο δημιουργίας πρωτεϊνών στο κύτταρο,

αποτελείται από δυο υπομονάδες, την 30S και την 50S (μικρή, μεγάλη αντίστοιχα). Οι δύο αυτές υπομονάδες του ριβοσώματος διαφέρουν ως προς τη χημική σύνθεση. Πολλοί αντιμικροβιακοί παράγοντες αναστέλλουν συγκεκριμένες υπομονάδες του ριβοσώματος. Τα αντιμικροβιακά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση χωρίζονται σε δύο υποομάδες, τους αναστολείς της σύνθεσης του 50S και του 30S (Epe and Woolley 1984). Η σύνθεση και η λειτουργία του ριβοσώματος των βακτηρίων διαφέρει από αυτές των ριβοσωμάτων των θηλαστικών. Έτσι εξηγείται και η επιλεκτική δράση των αντιβιοτικών στα μικροβιακά κύτταρα, ενώ δεν επηρεάζουν τα κύτταρα του μακροοργανισμού.

Η σπεκτινομυκίνη, οι τετρακυκλίνες, οι αμινογλυκοσίδες, οι λινκοσαμίδες, η χλωραμφενικόλη και τα μακρολίδια δρουν στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα και επιφέρουν αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε διάφορα στάδιά της και κυρίως διαταράσσουν τη ριβοσωμική λειτουργία (Douthwaite 1992, Katz and Ashley 2005). Οι αμινογλυκοσίδες, οι τετρακυκλίνες και η σπεκτινομυκίνη ενώνονται με την 30S ριβοσωμική υποομάδα των βακτηρίων και επιφέρουν αναστολή της παραγωγής πρωτεϊνικής φύσης ουσιών, όπως π.χ. ενζύμων. Η χλωραμφενικόλη, οι λινκοσαμίδες και τα μακρολίδια δρουν στην υποομάδα 50S και αναστέλλουν τη δράση της πεπτιδυλοτρανσφεράσης (Vannuffel and Cocito 1996, Chopra and Roberts 2001, Hong et al 2014).

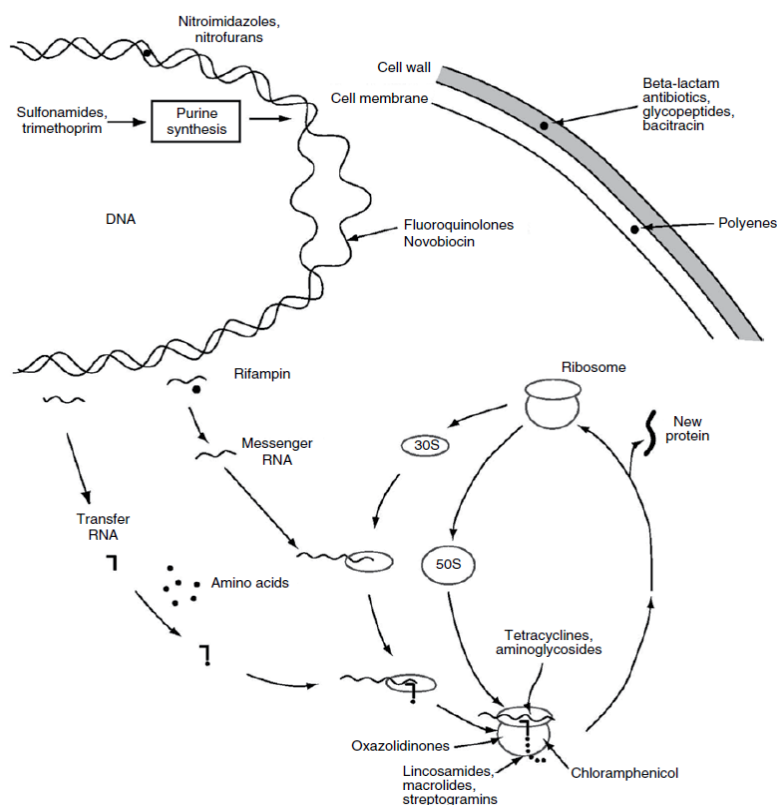
3) Αναστολή της σύνθεσης πυρηνικών οξέων

Ιδιαίτερα σημαντικοί για το βακτηριακό κύτταρο είναι οι μεταβολικοί οδοί που σχετίζονται με τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. Οποιαδήποτε διακοπή στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων επηρεάζει τα βακτηριακά κύτταρα και την επιβίωσή τους. Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες παρεμποδίζουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων μέσω του αποκλεισμού της αντιγραφής ή μέσω της διακοπής της μεταγραφής. Η διαδικασία του αναδιπλασιασμού του DNA διευκολύνεται από τα ένζυμα ελικάσες (Snow 1982). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες της κατηγορίας των κινολονών, για παράδειγμα, παρεμποδίζουν τη δράση αυτών των ενζύμων με αποτέλεσμα η διαδικασία της εκτίλυξης του DNA να παρεμποδίζεται, γεγονός που συνδέεται με την παρεμπόδιση της διαδικασίας αντιγραφής του DNA των ευαίσθητων στις κινολόνες βακτηρίων (Chen et al 1996). Αντιβιοτικά των οποίων ο τρόπος δράσης είναι η αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων παρεμποδίζουν επίσης τη δράση των ενζύμων τοποϊσομεράση II και τοποϊσομεράση IV των βακτηρίων, διαδικασία η οποία επηρεάζει αρνητικά την RNA πολυμεράση και η οποία με τη σειρά της αποτρέπει τη σύνθεση του RNA. Στην ομάδα αυτή εκτός των κινολονών ανήκουν και οι σουλφοναμίδες, η νοβοβοκίνη, η τριμεθοπρίμη και η ριφαμπικίνη (Snow 1982).

4) Αναστολή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη βρίσκεται κάτω από το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων, έχει όλα τα χαρακτηριστικά ενός βιολογικού φραγμού και ελέγχει τη διόδο διάφορων μορίων, από και προς το κυτταρόπλασμα. Διαταραχή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης προκαλεί καταστροφή του βακτηριακού κυττάρου. Οι κατηγορίες των αντιμικροβιακών που σχετίζονται με διαταραχή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης είναι ειδικές για κάθε ομάδα βακτηρίων. Διαφορές στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ μικρο- και μακρο-οργανισμού, αποτελούν τη βάση της επιλεκτικής δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών. Αντιβιοτικά των οποίων η δράση σχετίζεται με διαταραχή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης είναι η πολυμυξίνη E (κολιστίνη), η πολυμυξίνη B, η αμφοτερικίνη B, η νυστατίνη και η τυροσετίνη (Alborn et al 1991, Falagas et al 2010).

Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων έναντι των μικροοργανισμών, φαίνονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων μηχανισμών δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων έναντι των μικροοργανισμών (Prescott and Dowling 2013).

γ) Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων βάση του φάσματος δράσης τους

Κάθε αντιμικροβιακός παράγοντας έχει ένα χαρακτηριστικό φάσμα αντιμικροβιακής δράσης. Όσο ευρύτερο είναι το φάσμα δράσης ενός αντιβιοτικού, τόσο περισσότερα βακτηριακά είδη μπορούν να θανατωθούν από αυτό (Bath-Hextall et al. 2011). Ανάλογα με το φάσμα δράσης τους οι αντιμικροβιακοί παράγοντες διακρίνονται σε: α) «ευρέος» φάσματος και είναι τα αντιβιοτικά που δρουν τόσο έναντι των Gram-θετικών όσο και των Gram-αρνητικών βακτηρίων, όπως οι τετρακυκλίνες, η χλωραμφαινικόλη, οι κεφαλοσπορίνες, οι ημισυνθετικές πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι σουλφοναμίδες και οι αμινο-γλυκοσίδες. β) «στενού» φάσματος και είναι τα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την ανάπτυξη μόνο των Gram-θετικών ή μόνο των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η διάκριση αυτή δεν είναι πάντα απόλυτη καθώς ορισμένα αντιβιοτικά στενού φάσματος μπορεί να είναι δραστικά κατά κύριο λόγο έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων αλλά μπορεί επίσης να αναστέλλουν την ανάπτυξη και κάποιων Gram-θετικών βακτηρίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αντιβιοτικών στενού φάσματος αποτελούν η πενικιλίνη και η λινκομυκίνη που δρουν μόνο έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων και η αζθρεονάμη με την πολυμιξίνη (οι οποίες ανήκουν στις κατηγορίες των μονοβακαταμών και αμινογλυκοσιδών αντίστοιχα) και δρουν κατά κύριο λόγο έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων (πίνακας 2β).

Πίνακας 2β: Φάσμα δράσης των κυριότερων αντιμικροβιακών παραγόντων (Prescott and Dowling 2013)

Spectrum	Aerobic Bacteria		Anaerobic Bacteria		Examples
	Gram +	Gram -	Gram +	Gram -	
Very broad	+	+	+	+	Carbapenems; chloramphenicol; third-generation fluoroquinolones; glycolcyclines
Intermediately broad	+	+	+	(+)	Third- and fourth-generation cephalosporins
	+	(+)	+	(+)	Second-generation cephalosporins
Narrow	(+)	(+)	(+)	(+)	Tetracyclines
	+	+/-	+	(+)	Ampicillin; amoxicillin; first-generation cephalosporins
	+	-	+	(+)	Penicillin; lincosamides; glycopeptides; streptogramins; oxazolidinones
	+	+/-	+	(+)	Macrolides
	+/-	+	-	-	Monobactams; aminoglycosides
	(+)	+	-	-	Second-generation fluoroquinolones
	(+)	(+)	-	-	Trimethoprim-sulfa
	-	-	+	+	Nitroimidazoles
+	-	(+)	(+)	Rifamycin	

+: Excellent activity.

(+): Moderate activity.

+/-: Limited activity.

-: No or negligible activity.

δ) Ταξινόμηση αντιμικροβιακών παραγόντων βάση κριτηρίων που σχετίζονται με την μικροβιακή αντοχή

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες σήμερα είναι δυνατό να κατηγοριοποιηθούν βάση νέων κριτηρίων περισσότερο προσανατολισμένων στην θεραπευτική τους ισχύ τόσο στην ιατρική όσο και την κτηνιατρική κλινική πράξη. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO), η Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας των Ζώων (World Organisation for Animal Health, OIE) καθόρισαν κριτήρια ταξινόμησης των αντιβιοτικών με βάση την κλινική τους σημασία σε σχέση με τη μικροβιακή αντοχή (FAO 2008, WHO 2017). Η ανάγκη ταξινόμησης των αντιβιοτικών βάση κριτηρίων που σχετίζονται με την μικροβιακή αντοχή προκύπτει από το γεγονός ότι το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής μπορεί να αναπτυχθεί από την ανθρώπινη αλλά και την κτηνιατρική χρήση τους και αυτή η ταξινόμηση θα συμβάλει, μέσω της εφαρμογής κατάλληλων στρατηγικών, στον περιορισμό του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής.

Τα κριτήρια κατηγοριοποίησης που αφορούν τα προοριζόμενα για ανθρώπινη χρήση αντιβιοτικά είναι: 1) το κατά πόσο μια δραστική ουσία αποτελεί τη μόνη θεραπεία ή μια από τις ελάχιστες θεραπείες για ένα νόσημα και 2) το κατά πόσο μια δραστική ουσία χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ασθενειών που μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο ή για την αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από μικροοργανισμούς που μπορεί να έχουν προσλάβει γονίδια αντοχής από το ζωικό περιβάλλον. Με βάση τα δύο αυτά κριτήρια ορίστηκαν τρεις κατηγορίες αντιβιοτικών ως εξής:

Κρίσιμης σημασίας αντιβιοτικά (critically important) αυτά που πληρούν τα κριτήρια 1 και 2.

Μεγάλης σημασίας αντιβιοτικά (highly important) αυτά που πληρούν είτε το κριτήριο 1 είτε το κριτήριο 2.

Σημαντικά αντιβιοτικά (important) αυτά που δεν πληρούν κανένα από τα κριτήρια.

Η αντίστοιχη ταξινόμηση έγινε και για τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική. Τα κριτήρια στην περίπτωση αυτή ήταν τροποποιημένα διότι η έρευνα έγινε με ερωτηματολόγιο μεταξύ κτηνιάτρων. Πρώτο κριτήριο αποτελεί η θετική αξιολόγηση του αντιμικροβιακού παράγοντα ως θεραπευτικού μέσου στην κτηνιατρική κλινική πράξη από την πλειοψηφία των ερωτώμενων. Ως δεύτερο κριτήριο θεωρήθηκε η δραστικότητα ενός αντιμικροβιακού έναντι ειδικών λοιμώξεων και η ύπαρξη ή η έλλειψη άλλου θεραπευτικού μέσου για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων αυτών.

Με βάση τα δύο αυτά κριτήρια ορίστηκαν τρεις κατηγορίες αντιμικροβιακών ως εξής:

Κρίσιμης σημασίας κτηνιατρικά αντιβιοτικά [Veterinary Critically Important Antimicrobial Agents (VCIA)] αυτά που πληρούν τα κριτήρια 1 και 2.

Μεγάλης σημασίας κτηνιατρικά αντιβιοτικά [Veterinary Highly Important Antimicrobial Agents (VHIA)] αυτά που πληρούν είτε το κριτήριο 1 είτε το κριτήριο 2.

Σημαντικά κτηνιατρικά αντιβιοτικά [Veterinary Important Antimicrobial Agents (VIA)], αυτά που δεν πληρούν κανένα από τα παραπάνω κριτήρια.

Συγκρίνοντας τους καταλόγους των αντιβιοτικών κρίσιμης σημασίας για την ιατρική καθώς και την κτηνιατρική χρήση προκύπτουν έξι (6) κοινές κατηγορίες: οι αμινογλυκοσίδες, οι κεφαλοσπορίνες, οι μακρολίδες, οι πενικιλίνες, οι κινολόνες και οι τετρακυκλίνες. Η συνετή και ενδεδειγμένη χρήση αυτών των αντιμικροβιακών ουσιών καθώς και η επίβλεψη μέσω προγραμμάτων παρακολούθησης (monitoring) από τους σχετικούς φορείς είναι ύψιστης σημασίας. Οι κατηγορίες των αντιβιοτικών τα οποία κρίνονται «κρίσιμα» για την κτηνιατρική καθώς και οι κατηγορίες των αντιβιοτικών τα οποία κρίνονται «κρίσιμα» για την ιατρική και έχουν και κτηνιατρική χρήση παρουσιάζονται στους πίνακες 3 και 4 αντίστοιχα.

Πίνακας 3: Αντιβιοτικά κρίσιμης σημασίας στην κτηνιατρική (WHO 2014).

Antimicrobial agents	VCIA	VHIA	VIA
Aminocoumarin			x
Aminoglycosides	x		
Ansamycin-Rifamycins		x	
Arsenical			x
Bicyclomycin			x
Cephalosporins 1 st and 2 nd generations		x	
Cephalosporins 3 rd and 4 th generations	x		
Fusidic acid			x
Ionophores		x	
Lincosamides		x	
Macrolides	x		
Orthosomycins			x
Penicillins	x		
Phenicols	x		
Phosphonic acid		x	
Pleuromutilins		x	
Polypeptides		x	
Quinolones 1 st generation		x	
Quinolones 2 nd generation	x		
Quinoxalines			x
Sulfonamides	x		
Sulfonamides+Diaminopyrimidines	x		
Diaminopyrimidines	x		
Streptogramins			x
Tetracyclins	x		
Thiostrepton			x

Πίνακας 4: Κατηγορίες αντιμικροβιακών φαρμάκων «κρίσιμων» για την ιατρική, τα οποία χρησιμοποιούνται και στην κτηνιατρική (WHO 2011).

Antibiotic Class	Examples of Antibiotics Used in Animals	Importance in Human Medicine *
β-lactams	Penicillin, amoxicillin, ceftiofur	Critically important
Macrolides and lincosamides	Erythromycin, tylosin [§] , tilmicosin [§] , tulathromycin [§] , lincomycin [§]	Critically important
Aminoglycosides	Gentamicin, neomycin	Critically important
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin [§]	Critically important
Tetracyclines	Tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline	Highly important
Sulfonamides	Several sulfonamides and sulfonamide derivatives	Important
Streptogramins	Virginiamycin [§]	Highly important
Polypeptides	Bacitracin	Important
Phenicols	Florfenicol [§]	Highly important
Pleuromultilin	Tiamulin [§]	-

2.1.3. Η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνιατρική

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο όχι μόνο στην υγεία και ευζωία του ανθρώπου αλλά και των ζώων. Παράλληλα με τη χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών στην ιατρική από τα μέσα της δεκαετίας του 1930, η χρήση τους επεκτάθηκε και στην κτηνιατρική προκειμένου να επέλθει έλεγχος των ζωνοδόσων τόσο των αγροτικών ζώων όσο και των κατοικίδιων. Η χρήση τους συνέβαλε ουσιαστικά στην βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης των ζώων και στην μεγάλη αύξηση της κτηνοτροφικής παραγωγής. Εκτιμάται ότι το 2010 χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 63.200 τόνοι αντιβιοτικών στα ζώα και μέχρι το 2030 η κατανάλωση αναμένεται να αυξηθεί κατά 67% και να φτάσει περίπου τους 105.600 τόνους (Van Boeckel et al 2015). Η Κίνα, οι ΗΠΑ και η Βραζιλία είναι σήμερα οι χώρες που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούν αντιμικροβιακές ουσίες στη διατροφή των παραγωγικών ζώων και δεδομένης της αύξησης του εκτρεφόμενου ζωικού κεφαλαίου των χωρών αυτών, αναμένεται ότι η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών θα αυξηθεί επίσης στο εγγύς μέλλον. Σύμφωνα με εκτιμήσεις στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2012 σε σύνολο 12.272 τόνων αντιβιοτικών σημαντικών για την ιατρική, το 72,5% περίπου αυτών χρησιμοποιήθηκε σε ζώα και μόνο το 27,5% αυτών χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση λοιμώξεων του ανθρώπου. Από 41 εγκεκριμένων, από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) αντιμικροβιακών ουσιών για χρήση σε ζώα, οι 31 χαρακτηρίζονται «κρίσιμοι» για τη θεραπεία λοιμώξεων του ανθρώπου (Unnecessary 2015).

Τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική για τέσσερις κύριους σκοπούς: 1) τη θεραπεία λοιμώξεων (θεραπευτική χρήση), 2) την πρόληψη εκδήλωσης ασθενειών (προφύλαξη), 3) την ενίσχυση της ανάπτυξης (αυξητικοί παράγοντες για την αύξηση της μετατρεψιμότητας τροφής, του ρυθμού ανάπτυξης και των

αποδόσεων) και 4) για τον έλεγχο πρωτοζωικών λοιμώξεων των βοοειδών και πτηνών όπως η κοκκιδίωση (Landers et al 2012, Barton 2014). Κάποια αντιβιοτικά ανήκουν σε βασικές δομικές ομάδες χημικών ενώσεων, των οποίων μέλη δεν προορίζονταν αρχικά για ανθρώπινη χρήση. Εντούτοις, λόγω του ότι τα κύρια παθογόνα βακτήρια που ευθύνονται για λοιμώξεις του ανθρώπου έχουν καταστεί ανθεκτικά σε πολλά ή σε όλα τα διαθέσιμα αποτελεσματικά αντιβιοτικά, κατηγορίες αντιβιοτικών οι οποίες αρχικά χρησιμοποιήθηκαν μόνο στην κτηνιατρική χρησιμοποιούνται σήμερα και στην ιατρική (π.χ. vancomycin) ή η ιατρική τους χρήση βρίσκεται προς το παρόν σε πειραματικό στάδιο (π.χ. streptogramins B) (Jetacar 1999).

Το ιδεατό όσον αφορά την επιλογή του κατάλληλου αντιβιοτικού με σκοπό τον περιορισμό της εκδήλωσης μικροβιακής αντοχής του βακτηρίου που εκτίθεται στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό θα ήταν η απομόνωση και ταυτοποίηση του βακτηριακού στελέχους που ευθύνεται για μια συγκεκριμένη λοίμωξη και στη συνέχεια η χορήγηση αντιβιοτικού στενού φάσματος δράσης, το οποίο θα στοχεύει στο συγκεκριμένο παθογόνο. Επίσης για αυτό το σκοπό είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός αντιβιοτικών. Ωστόσο, λόγω του κόστους τους, οι εργαστηριακές αναλύσεις δεν συμπεριλαμβάνονται στις πρακτικές αντιμετώπισης των λοιμώξεων των ζώων και η επιλογή της φαρμακευτικής αγωγής για τη θεραπεία τους, βασίζεται στα κλινικά συμπτώματα των νοσούντων ζώων χωρίς να υποστηρίζεται από την εργαστηριακή επιβεβαίωση των υπεύθυνων βακτηρίων και τον εργαστηριακό έλεγχο της ευαισθησίας αυτών στα αντιβιοτικά. Επιπλέον σε ορισμένες λοιμώξεις (όπως στην περίπτωση της μυκοπλάσμωσης των χοίρων), είναι απαραίτητη η χρήση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος δράσης λόγω του ότι δεν υπάρχουν γνωστής θεραπευτικής δράσης αντιβιοτικά.

2.1.3.1 Χρήση αντιβιοτικών στη θεραπεία και πρόληψη λοιμώξεων των ζώων

Αντιμικροβιακή αγωγή χορηγείται σε ζώα τα οποία έχουν προσβληθεί από παθογόνα βακτήρια και η θεραπεία κρίνεται χρήσιμη για τον περιορισμό της εξάπλωσης της νόσου σε άλλα ζώα της εκτροφής, αλλά και στη μείωση της διασποράς του παθογόνου βακτηρίου μέσω απεκκρίσεων (π.χ. ούρων). Εκτός από τη θεραπεία λοιμώξεων, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται επίσης στα ζώα προληπτικά για την αποφυγή εμφάνισης ασθενειών ακόμη και όταν τα ζώα είναι υγιή και δεν υπάρχουν μολυσματικοί παράγοντες στο περιβάλλον της εκτροφής. Οι αρχές στις οποίες βασίζεται η θεραπεία και πρόληψη των νοσημάτων των ζώων ακολουθούν την ίδια μεθοδολογία όπως και στην περίπτωση του ανθρώπου. Ωστόσο, η προληπτική χρήση αντιβιοτικών στα ζώα και ιδιαίτερα στα παραγωγικά συνηθίζεται περισσότερο. Για παράδειγμα, σε κάποιες περιπτώσεις, όταν το

ποσοστό των νοσούντων ζώων σε ένα κοπάδι είναι αυξημένο και υπάρχει η πιθανότητα επέκτασης της νόσου στα υπόλοιπα ζώα, τότε συνήθως όλα τα ζώα υποβάλλονται σε θεραπευτική αγωγή. Η προληπτική χορήγηση αντιβιοτικών γίνεται είτε ατομικά είτε ομαδικά μέσω της χορήγησης των αντιβιοτικών με την τροφή ή το νερό. Τα ζώα των εκτατικών εκτροφών, συνήθως δεν λαμβάνουν καμία αντιμικροβιακή θεραπεία κατά τη διάρκεια της ζωής τους ή λαμβάνουν το πολύ μία ή δυο θεραπείες σε εξειδικευμένες λοιμώξεις.

Παραγωγικά ζώα

Τα κύρια νοσήματα των ζώων που απαιτούν χρήση θεραπευτικής ή προφυλακτικής αγωγής αφορούν κατά κύριο λόγο το αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα των μονογαστρικών, των πτηνών και των μηρυκαστικών.

Βοοειδή κρεοπαραγωγής και γαλακτοπαραγωγής

Στα βοοειδή κρεοπαραγωγής και γαλακτοπαραγωγής χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά για εύρος λοιμογόνων παραγόντων. Με εξαίρεση τα περιστασιακά μαζικά κρούσματα λοιμώξεων σε επίπεδο κοπαδιών, η χρήση των αντιβιοτικών αφορά σε μεμονωμένα ζώα. Οι προληπτικές και θεραπευτικές αγωγές στα κοπάδια βοοειδών με τη χρήση αντιβιοτικών ενδεικτικά περιλαμβάνουν: α) τις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, για τη θεραπεία των οποίων χορηγούνται συνήθως τετρακυκλίνες, τυλοσίνη, ερυθρομυκίνη, νεομυκίνη και τριμεθοπρίμη – σουλφοναμίδες. β) τη μαστίτιδα των μηρυκαστικών η οποία θεραπεύεται με τη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών των κατηγοριών των β-λακταμών, των τετρακυκλινών, της λυνκομυσίνης και τριμεθοπρίμης – σουλφοναμίδων και τη χορήγηση β-λακταμών, κεφαλοσπορινών, νεομυκίνης και τετρακυκλινών με σκοπό επίσης την πρόληψη της μαστίτιδας κατά την ξηρά περίοδο. Όσον αφορά τον έλεγχο της μαστίτιδας των γαλακτοπαραγωγών ζώων, οι στρατηγικές που ακολουθούνται ως κομμάτι μιας πολύπλευρης προσέγγισης ελέγχου αυτής, αναφέρονται εκτενώς στο κεφάλαιο 4.

γ) τις γαστρεντερικές λοιμώξεις οι οποίες θεραπεύονται με τη χορήγηση τετρακυκλινών και νεομυκίνης. δ) την κοκκιδίωση νεαρών ζώων για τη θεραπεία της οποίας χρησιμοποιείται πολυαιθέρας και ε) τις λοιμώξεις των ποδιών οι οποίες αντιμετωπίζονται με τη χρήση πενικιλινών, τετρακυκλινών, κεφτιοφούρης και τριμεθοπρίμης – σουλφοναμίδων.

Οι κατάλληλες πρακτικές διαχείρισης των εκτροφών ζώων μειώνουν τον κίνδυνο εκδήλωσης κρουσμάτων λοιμογόνων ασθενειών, παρόλα αυτά όμως δεν τον εξαλείφουν

και κατά συνέπεια παραμένει η αναγκαιότητα διαθεσιμότητας αντιβιοτικών στις εκτροφές βοοειδών γαλακτοπαραγωγής και κρεοπαραγωγής.

Χοίροι

Στις μεγάλες χοιροτροφικές μονάδες όπου η κτηνιατρική επίβλεψη των χοίρων είναι σε υψηλό ποσοστό ενταγμένη στη διαχείρισή τους, η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων εφαρμόζεται, αλλά σε χαμηλά ποσοστά και περισσότερο εξειδικευμένα. Υπάρχουν σοβαρά νοσήματα των χοίρων που συχνά απαιτούν θεραπευτική παρέμβαση ή χρήση αντιβιοτικών προληπτικά. Τα σημαντικότερα νοσήματα καθώς και τα συνήθη χρησιμοποιούμενα για τη θεραπεία τους αντιβιοτικά είναι: α) λοιμώξεις προκαλούμενες από το εντεροτοξινογόνο στέλεχος *E. coli* που προσβάλλει τα μη απογαλακτισμένα αλλά και τα αμέσως μετά τον απογαλακτισμό χοιρίδια (ηλικίας δυο εβδομάδων μετά τον απογαλακτισμό), για την αντιμετώπιση των οποίων χορηγούνται αμοξυσιλίνη, τριμεθοπρίμη, σπεκτινομυκίνη, απραμυκίνη και νεομυκίνη. β) Η αναπνευστική μυκοπλάσμωση για τη θεραπεία της οποίας χρησιμοποιούνται τετρακυκλίνες, λινκομυσίνη, τυλοσίνη και τιαμουλίνη. γ) Η ακτινοβακίλλωση της οποίας ο αιτιολογικός παράγοντας είναι το βακτήριο *Actinobacillus pleuropneumoniae* και για τη θεραπεία του χρησιμοποιούνται πενικιλίνη, αμοξυσιλίνη, τετρακυκλίνες, τριμεθοπρίμη. δ) Εντερίτιδα η οποία θεραπεύεται με τη χρήση τετρακυκλινών, λινκομυσίνης και τυλοσίνης και ε) Κολίτιδα οφειλόμενη σε είδη του γένους *Serpulina* για τη θεραπεία της οποίας εφαρμόζονται λινκομυσίνη, τιαμουλίνη και διμετριδαζόλη. Η προληπτική χρήση αντιβιοτικών σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης των χοίρων είναι απαραίτητη ώστε να τεθούν υπό έλεγχο τα παραπάνω νοσήματα και να διασφαλιστεί η ευζωία και η παραγωγικότητά τους. Η χρήση αντιβιοτικών για τον έλεγχο νοσημάτων των χοίρων αυξάνει το κόστος παραγωγής και κατά συνέπεια το ενδιαφέρον των παραγωγών και με την ταυτόχρονη συμβολή των κτηνιάτρων πρέπει να στραφεί προς τη μείωση της χρησιμοποιούμενης ποσότητά τους και την ταυτόχρονη αύξηση της χρήσης αποτελεσματικότερων αντιβιοτικών.

Μικρά μηρυκαστικά (αιγοπρόβατα)

Η χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων στην αιγοπροβατοτροφία είναι περιορισμένη λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής σε σχέση με την αξία του ζωικού κεφαλαίου. Ωστόσο αντιμικροβιακά φάρμακα χρησιμοποιούνται για νοσήματα των κάτω άκρων των προβάτων, είτε θεραπευτικά, είτε προληπτικά. Η χρήση των δημητριακών στα σιτηρέσια των αμνών, οδήγησε στην ανάγκη χρήσης αντιβιοτικών για την πρόληψη της γαλακτικής

οξέωσης, για την οποία συνήθως προστίθεται στο σιτηρέσιο αυτών η αντιμικροβιακή ουσία βιργινιαμυκίνη.

Πτηνά

Οι εκτροφές πτηνών συνήθως βρίσκονται υπό κτηνιατρική επίβλεψη η οποία διασφαλίζει τον έλεγχο των βακτηριακών λοιμώξεων. Οι λοιμώξεις των πτηνών έχουν τεθεί υπό έλεγχο τα τελευταία χρόνια με την εξάλειψη των παθογόνων στα ζώα αναπαραγωγής, μέσω εφαρμογής προγραμμάτων βιοασφάλειας, μέσω προηγμένων συνθηκών υγιεινής και προγραμμάτων εμβολιασμού. Για παράδειγμα λοιμώξεις όπως η μυκοπλάσμωση, η κόρυζα και η χολέρα ελέγχονται με εμβολιασμό των πτηνών. Στην πτηνοτροφία η θεραπεία με αντιβιοτικά απαιτείται για νοσήματα για τα οποία δεν υπάρχουν προγράμματα εμβολιασμού ή όταν τα προγράμματα αυτά αποτυγχάνουν. Η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων σε πτηνά κρεοπαραγωγής και ωοπαραγωγής είναι περιορισμένη λόγω των χρόνων αναμονής που απαιτούνται με σκοπό την απουσία καταλοίπων αυτών στα παραγόμενα προϊόντα (κρέας, αυγά). Για παράδειγμα μόνο δυο χρησιμοποιούμενοι αντιμικροβιακοί παράγοντες, η αμοξυσιλίνη και η ερυθρομυκίνη, οι οποίοι χρησιμοποιούνται θεραπευτικά στην πτηνοτροφία, έχουν χρόνο αναμονής μικρότερο των 5 ημερών. Για την πρόληψη της νεκρωτικής εντερίτιδας η οποία οφείλεται στο *Clostridium perfringens* και συνδέεται με παρεμπόδιση της ανάπτυξης, μείωση της μετατρεψιμότητας τροφής και κάποιες φορές μέχρι και τον θάνατο χρησιμοποιούνται η αβοπαρσίνη, η βιργινιαμυκίνη και η βακίτρακίνη, αντιβιοτικά τα οποία προστίθενται στην τροφή. Η νεομυκίνη ή η αμοξυκιλίνη χρησιμοποιούνται θεραπευτικά στο πόσιμο νερό για 3-5 ημέρες, όταν η προληπτική αγωγή αποτυγχάνει.

Ζώα συντροφιάς – μικρά κατοικίδια

Η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων σε αυτή την κατηγορία ζώων, όσον αφορά στη θεραπεία συμπτωματικών λοιμώξεων γίνεται σε ατομικό επίπεδο. Κάποια αντιμικροβιακά όπως οι σουλφοναμίδες και οι τετρακυκλίνες χρησιμοποιούνται στη θεραπεία λοιμώξεων των οικόσιτων πτηνών και ψαριών ενυδρείων.

Ιχθύες

Η χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών στον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών ήταν μέχρι πρόσφατα περιορισμένη αλλά με αυξητική τάση. Πρόσφατα προέκυψε ανησυχία όσον αφορά την εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών στην εκκολαπτόμενη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών, η οποία χρήση υπερδιπλασιάστηκε μεταξύ των ετών 1994 και 2004

(Cabello 2006, Heuer et al 2009). Κάποια από τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά δεν ενδείκνυται και όταν αυτό κρίνεται απαραίτητο πρέπει να γίνεται κάτω από κτηνιατρική επίβλεψη και μόνο στα αρχικά στάδια της παραγωγής. Ωστόσο, η μικροβιολογία των υδρόβιων ζώων και το περιβάλλον τους είναι σύνθετη και εκφράζονται ανησυχίες σχετικά με την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά βακτηρίων του υδάτινου περιβάλλοντος.

Ο πίνακας 5 περιλαμβάνει κατηγορίες αντιβιοτικών κρίσιμης σημασίας που χρησιμοποιούνται στην πρόληψη και θεραπεία νοσημάτων των παραγωγικών ζώων.

Πίνακας 5: Κατηγορίες αντιβιοτικών κρίσιμης σημασίας που χρησιμοποιούνται στην πρόληψη και θεραπεία νοσημάτων των παραγωγικών ζώων (OIE List 2015)

ANTIMICROBIAL AGENTS (CLASS, SUB-CLASS, SUBSTANCE)	SPECIES	Specific comments	VCIA	VHIA	VIA
AMINOCOUMARIN Novobiocin	BOV, CAP, OVI, PIS	Novobiocin is used in the local treatment of mastitis and in septicaemias in fish			X
AMINOGLYCOSIDES					
AMINOCYCLITOL Spectinomycin Streptomycin Dihydrostreptomycin	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI API, AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI	The wide range of applications and the nature of the diseases treated make aminoglycosides extremely important for veterinary medicine.			
AMINOGLYCOSIDES + 2 DEOXYSTREPTAMINE Kanamycin Neomycin Framycetin Paromomycin Apramycin Fortimycin Gentamicin Tobramycin Amikacin	AVI, BOV, EQU, PIS, SUI API, AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI BOV, CAP, OVI AVI, BOV, CAP, OVI, LEP, SUI AVI, BOV, LEP, OVI, SUI AVI, BOV, LEP, OVI, SUI AVI, BOV, CAM, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI EQU EQU	Aminoglycosides are of importance in septicaemias; digestive, respiratory and urinary diseases. Gentamicin is indicated for <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections with few alternatives. Apramycin and Fortimycin are currently only used in animals. Few economic alternatives are available.	X		
AMPHENICOLS Florfenicol Thiamphenicol	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI AVI, BOV, CAP, OVI, PIS, SUI	The wide range of applications and the nature of the diseases treated make phenicols extremely important for veterinary medicine. This class is of particular importance in treating some fish diseases, in which there are currently no or very few treatment alternatives. This class also represents a useful alternative in respiratory infections of cattle, swine and poultry. This class, in particular florfenicol, is used to treat pasteurellosis in cattle and pigs.	X		
ANSAMYCIN – RIFAMYCINS Rifampicin Rifaximin	EQU BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI	This antimicrobial class is authorised only in a few countries and with a very limited number of indications (mastitis) and few alternatives. Rifampicin is essential in the treatment of <i>Rhodococcus equi</i> infections in foals. However it is only available in a few countries, resulting in an overall classification of VHIA.		X	
ARSENICAL Roxarsone Nitarosone	AVI, SUI AVI, SUI	Arsenicals are used to control intestinal parasitic coccidiosis. (<i>Eimeria</i> spp.).			X
BICYCLOMYCIN Bicozamycin	AVI, BOV, PIS, SUI	Bicyclomycin is listed for digestive and respiratory diseases in cattle and septicaemias in fish.			X
CEPHALOSPORINS				X	

ANTIMICROBIAL AGENTS (CLASS, SUB-CLASS, SUBSTANCE)	SPECIES	Specific comments	V CIA	V HIA	V IA
CEPHALOSPORINS FIRST GENERATION Cefacetrile Cefalexin Cefalotin Cefapirin Cefazolin Cefalonium	BOV BOV, CAP, EQU, OVI, SUI EQU BOV BOV, CAP, OVI BOV, CAP, OVI	Cephalosporins are used in the treatment of septicemias, respiratory infections, and mastitis.			
CEPHALOSPORINS SECOND GENERATION Cefuroxime	BOV				
CEPHALOSPORINS THIRD GENERATION Cefoperazone Ceftiofur Ceftriaxone	BOV, CAP, OVI AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI AVI, BOV, OVI, SUI	The wide range of applications and the nature of the diseases treated make cephalosporin third and fourth generation extremely important for veterinary medicine.	X		
CEPHALOSPORINS FOURTH GENERATION Cefquinome	BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI	Cephalosporins are used in the treatment of septicemias, respiratory infections, and mastitis. Alternatives are limited in efficacy through either inadequate spectrum or presence of antimicrobial resistance.			
FUSIDIC ACID Fusidic acid	BOV, EQU	Fusidic acid is used in the treatment of ophthalmic diseases in cattle and horses.			X
IONOPHORES Lasalocid Maduramycin Monensin Narasin Salinomycin Semduramicin	AVI, BOV, LEP, OVI AVI API, AVI, BOV, CAP AVI, BOV AVI, LEP, BOV, SUI AVI	Ionophores are essential for animal health because they are used to control intestinal parasitic coccidiosis (<i>Eimeria</i> spp.) where there are few or no alternatives available. Ionophores are critically important in poultry. <u>This class is currently only used in animals.</u>		X	
LINCOSAMIDES Pirlimycin Lincomycin	BOV, SUI, AVI API, AVI, BOV, CAP, OVI, PIS, SUI	Lincosamides are essential in the treatment of Mycoplasmal pneumonia, infectious arthritis and hemorrhagic enteritis of pigs.		X	
MACROLIDES (C refers to the chemical structure)					
MACROLIDES C14 Erythromycin Oleandomycin	API, AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI BOV	The wide range of applications and the nature of the diseases treated make macrolides extremely important for veterinary medicine.	X		
MACROLIDES C15 Gamithromycin Tulathromycin	BOV BOV, SUI	Macrolides are used to treat Mycoplasma infections in pigs and poultry, haemorrhagic digestive disease in pigs (<i>Lawsonia intracellularis</i>) and liver abscesses (<i>Fusobacterium necrophorum</i>) in cattle, where they have very few alternatives.			
MACROLIDES C16 Carbomycin Josamycin Kitasamycin Spiramycin Tilmicosin Tylosin Mirosamycin Terdecamycin	AVI AVI, PIS, SUI AVI, SUI, PIS AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI API, AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI API, AVI, SUI, PIS AVI, SUI	This class is also used for respiratory infections in cattle			

ANTIMICROBIAL AGENTS (CLASS, SUB-CLASS, SUBSTANCE)	SPECIES	Specific comments	VCIA	VHIA	VIA
Tildipirosin Tylvalosin	BOV, SUI AVI, SUI				
MACROLIDES C17 Sedecamycin	SUI				
ORTHOSOMYCINS Avilamycin	AVI, LEP	Avilamycin is used for enteric diseases of poultry and rabbit. <u>This class is currently only used in animals.</u>			X
PENICILLINS					
NATURAL PENICILLINS (including esters and salts) Benethamine penicillin Benzylpenicillin Penethamate (hydroiodide) Benzylpenicillin procaine / Benzathine penicillin	BOV AVI, BOV, CAM, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI BOV BOV, CAM, CAP, EQU, OVI, SUI	<u>Penethamate (hydroiodide) is currently only used in animals</u>			
AMDINOPENICILLINS Mecillinam	BOV, SUI				
AMINOPENICILLINS Amoxicillin Ampicillin Hetacillin	AVI, BOV, CAP, EQU, OVI, PIS, SUI AVI, BOV, CAP, EQU, OVI, PIS, SUI BOV	The wide range of applications and the nature of the diseases treated make penicillins extremely important for veterinary medicine.			
AMINOPENICILLIN + BETALACTAMASE INHIBITOR Amoxicillin + Clavulanic Acid Ampicillin + Sulbactam	AVI, BOV, CAP, EQU, OVI, SUI AVI, BOV, SUI	This class is used in the treatment of septicaemias, respiratory and urinary tract infections.	X		
CARBOXYPENICILLINS Ticarcillin Tobicillin	EQU PIS	This class is very important in the treatment of many diseases in a broad range of animal species.			
UREIDOPENICILLIN Aspoxicillin	BOV, SUI	Few economical alternatives are available.			
PHENOXYPENICILLINS Phenoxymethylpenicillin Phenethicillin	AVI, SUI EQU				
ANTISTAPHYLOCOCCAL PENICILLINS Cloxacillin Dicloxacillin Nafcillin Oxacillin	BOV, CAP, EQU, OVI, SUI BOV, CAP, OVI, AVI, SUI BOV, CAP, OVI BOV, CAP, EQU, OVI, AVI, SUI				
PHOSPHONIC ACID Fosfomycin	AVI, BOV, PIS, SUI	Fosfomycin is essential for the treatment of some fish infections with few alternatives however it is only available in a few countries, resulting in an overall classification of VHIA.		X	

ANTIMICROBIAL AGENTS (CLASS, SUB-CLASS, SUBSTANCE)	SPECIES	Specific comments	VCIA	VHIA	VIA
PLEUROMUTILINS Tiamulin Valnemulin	AVI, CAP, LEP, OVI, SUI AVI, SUI	The class of pleuromutilins is essential against respiratory infections in pigs and poultry. This class is also essential against swine dysentery (<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>) however it is only available in a few countries, resulting in an overall classification of VHIA.		X	
POLYPEPTIDES Enramycin Gramicidin Bacitracin	AVI, SUI EQU AVI, BOV, LEP, SUI, OVI	Bacitracin is used in the treatment of necrotic enteritis in poultry. This class is used in the treatment of septicaemias, colibacillosis, salmonellosis, and urinary infections.		X	
POLYPEPTIDES CYCLIC Colistin Polymixin	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, AVI	Cyclic polypeptides are widely used against Gram negative enteric infections.			
QUINOLONES					
QUINOLONES FIRST GENERATION Flumequin Miloxacin Nalidixic acid Oxolinic acid	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI PIS BOV AVI, BOV, LEP, PIS, SUI, OVI	Quinolones of the 1st generations are used in the treatment of septicaemias and infections such as colibacillosis.		X	
QUINOLONES SECOND GENERATION (FLUOROQUINOLONES) Ciprofloxacin Danofloxacin Difloxacin Enrofloxacin Marbofloxacin Norfloxacin Ofloxacin Orbifloxacin Sarafloxacin	AVI, BOV, SUI AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI AVI, BOV, LEP, SUI AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI AVI, BOV, EQU, LEP, SUI AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI AVI, SUI BOV, SUI PIS	The wide range of applications and the nature of the diseases treated make fluoroquinolones extremely important for veterinary medicine. Fluoroquinolones are critically important in the treatment of septicaemias, respiratory and enteric diseases.	X		
QUINOXALINES Carbadox Olaquinox	SUI SUI	Quinoxalines (carbadox) is used for digestive disease of pigs (e.g. swine dysentery). <u>This class is currently only used in animals.</u>			X

ANTIMICROBIAL AGENTS (CLASS, SUB-CLASS, SUBSTANCE)	SPECIES	Specific comments	VCIA	VHIA	VIA
SULFONAMIDES					
Sulfachlorpyridazine	AVI, BOV, SUI				
Sulfadiazine	AVI, BOV, CAP, OVI, SUI				
Sulfadimethoxine	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI				
Sulfadimidine (Sulfamethazine, Sulfadimerazin)	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI				
Sulfadoxine	BOV, EQU, OVI, SUI				
Sulfafurazole	BOV, PIS				
Sulfaguandine	AVI, CAP, OVI				
Sulfamerazine	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI	The wide range of applications and the nature of the diseases treated make sulfonamides extremely important for veterinary medicine.			
Sulfadimethoxazole	AVI, BOV, SUI				
Sulfamethoxine	AVI, PIS, SUI				
Sulfamonomethoxine	AVI, PIS, SUI				
Sulfanilamide	AVI, BOV, CAP, OVI				
Sulfapyridine	BOV, SUI				
Phthalylsulfathiazole	SUI				
Sulfaquinoxaline	AVI, BOV, CAP, LEP, OVI				
SULFONAMIDES+ DIAMINOPYRIMIDINES					
Sulfamethoxyridazine	AVI, BOV, EQU, SUI				
Ormetoprim+ Sulfadimethoxine	PIS				
Trimethoprim+ Sulfonamide	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI				
DIAMINOPYRIMIDINES					
Baquiloprim	BOV, SUI				
Trimethoprim	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI				
Ormetoprim	AVI				
STREPTOGRAMINS					
Virginiamycin	AVI, BOV, OVI, SUI	Virginiamycin is an important antimicrobial in the prevention of necrotic enteritis (<i>Clostridium perfringens</i>)			X
TETRACYCLINES					
Chlortetracycline	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI				
Doxycycline	AVI, BOV, CAM, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI	The wide range of applications and the nature of the diseases treated make tetracyclines extremely important for veterinary medicine			
Oxytetracycline	API, AVI, BOV, CAM, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI	This class is critically important in the treatment of many bacterial and chlamydial diseases in a wide range of animal species.			
Tetracycline	API, AVI, BOV, CAM, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI	This class is also critically important in the treatment of animals against heartwater (<i>Ehrlichia ruminantium</i>) and anaplasmosis (<i>Anaplasma marginale</i>) due to the lack of antimicrobial alternatives.			
THIOSTREPTON					
Nosiheptide	AVI, SUI	This class is currently used in the treatment of some dermatological conditions.			X

Συνομογραφίες

AVI: avian EQU: Equine
API: bee LEP: Rabbit
BOV: bovine OVI: Ovine
CAP: caprine PIS: Fish
CAM: camel SUI: Swine

VCIA: Veterinary Critically Important Antimicrobial Agents
VHIA: Veterinary Highly Important Antimicrobial Agents
VIA: Veterinary Important Antimicrobial Agents

2.1.3.2. Χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες

Παγκόσμια ένας μη αναμενόμενος τομέας εφαρμογής των αντιμικροβιακών φαρμάκων στην εκτροφή των ζώων, είναι η χρήση αυτών ως συμπληρώματα διατροφής για την αύξηση της σωματικής τους ανάπτυξης. Τα αντιμικροβιακά φάρμακα χρησιμοποιήθηκαν ως αυξητικοί παράγοντες (Antimicrobial growth promotants - AGPs) για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1950, όταν ανακαλύφθηκε ότι μικρές, υποθεραπευτικές δόσεις αντιβιοτικών όπως η προκαΐνη, η πενικιλίνη και η τετρακυκλίνη (συγκέντρωσης 1/10 έως 1/100 της θεραπευτικής δόσης), παρεχόμενες στα ζώα μέσω των ζωοτροφών, μπορούν να αυξήσουν τη μετατρεψιμότητα της τροφής στις εκτροφές πτηνών, χοίρων και βοοειδών (Stokstad and Jukes 1950).

Αυτή η παρατήρηση άλλαξε την προοπτική της αντιμικροβιακής χρήσης στα παραγωγικά ζώα, γεγονός που οδήγησε σε αντιπαράθεση όσον αφορά την ουσιαστική χρήση τους ως θεραπευτικά μέσα λοιμώξεων του ανθρώπου και την οικονομική ανάγκη χρήσης τους σε παραγωγικά ζώα. Η θετική επίδραση των αντιβιοτικών στην ανάπτυξη των ζώων παρατηρήθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1940 σε κοτόπουλα των οποίων το σιτηρέσιο περιλάμβανε παραπροϊόντα ζύμωσης του βακτηριδίου *Streptomyces aureofaciens* το οποίο παράγει τετρακυκλίνη (Jukes and Williams 1953, Lekshmi et al. 2017). Σύντομα η χρήση της στρεπτομυκίνης ως αυξητικός παράγοντας επεκτάθηκε και στις ζωοτροφές των αγροτικών ζώων (Wahlstrom et al 1950). Το σουλφοναμίδιο ήταν το πρώτο αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στην κτηνοτροφία ως αυξητικός παράγοντας και επίσης το φάρμακο αυτό με την αντιπαρασιτική του δράση συνέβαλε σημαντικά στη μείωση των παρασιτικών νοσημάτων των ζώων (Hao et al 2014). Στη συνέχεια, διάφορα αντιβιοτικά όπως η χλωροτετρακυκλίνη, το φολικό οξύ, το Carbadox, η τιλμικοσίνη, η τυλοσίνη κτλ. χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως αυξητικοί παράγοντες (AGPs) στα παραγωγικά ζώα. Τα κυριότερα αντιβιοτικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως αυξητικοί παράγοντες στα σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων φαίνονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: αντιμικροβιακοί παράγοντες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως αυξητικοί παράγοντες στη διατροφή παραγωγικών ζώων (Lekshmi et al. 2017).

Antibiotic Group	Antibiotic(s) Used as Growth Promoters
Glycolipids	Bambermycin, avoparcin, ardacin
Streptogramins	Virginiamycin
Oligosaccharide	Avilamycin
Polypeptide	Bacitracin
Ionophore	Monensin, salinomycin
Macrolide	Tylosin, spiramycin, erythromycin
Tetracycline	Chlortetracycline, oxytetracycline
Quinoxalines	Carbadox, olaquidox
Elfamycin	Efrotomycin
Pleuromutilins	Tiamulin
β -Lactam	Penicillin

Η αυξητική δράση των αντιβιοτικών βασίζεται στις παρατηρούμενες επιδράσεις τους στην ενίσχυση της ανάπτυξης των ζώων ενώ καμία επιστημονική μελέτη δεν απέδειξε με ακρίβεια τον μηχανισμό με τον οποίο τα αντιβιοτικά παρουσιάζουν τέτοιου είδους δράση. Εκτιμάται ότι αλληλοεπιδρούν με το φυσικό περιβάλλον της εντερικής μικροχλωρίδας των ζώων και οδηγούν σε θετικές επιδράσεις στην ανάπτυξή τους. Μερικοί πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν: 1) τον έλεγχο χρόνιων βακτηριακών λοιμώξεων και τη γενική βελτίωση της υγείας των ζώων, 2) την αύξηση της οφέλιμης μικροχλωρίδας του εντέρου, 3) την αυξημένη παραγωγή βιταμινών και άλλων αυξητικών παραγόντων και 4) την καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών μέσω του εντερικού βλεννογόνου. Οι παράγοντες αυτοί ενδεχομένως δρουν συνεργατικά, οδηγώντας στην αύξηση της ανάπτυξης των ζώων των οποίων η διατροφή περιλαμβάνει αντιβιοτικά (Prescott and Dowling 2013).

Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η χρήση των αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες έχει θετικές επιδράσεις στη συνολική ανάπτυξη και ευημερία των παραγωγικών ζώων των εντατικών εκτροφών (Hao et al. 2014). Αποδείχτηκε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης χοίρων των οποίων η διατροφή περιελάμβανε αντιβιοτικά ως αυξητικούς παράγοντες σε ποσοστό που κυμάνθηκε από 4% έως 8% και του δείκτη μετατρεψιμότητας τροφής σε ποσοστό από 2% - 8% (Jensen 1998, Butaye et al 2003, Lekshmi et al. 2017). Σε όρνιθες αναπαραγωγής, η χρήση βακιτρακίνης, πενικιλίνης, χλωροτετρακυκλίνης, οξυτετρακυκλίνης, ερυθρομυκίνης, τυλοσίνης, βιργινιαμυκίνης, λινκομυκίνης και βαμπερμαμυκίνης συνέβαλε στην αύξηση του βάρους τους (Stutz and Lawton 1984, Lekshmi et al. 2017). Η ποσότητα των αυξητικών παραγόντων (AGP) που χρησιμοποιείται ποικίλει ανάλογα με την αντιμικροβιακή χημική ουσία, αλλά οι συγκεντρώσεις σε γενικές γραμμές κυμαίνονται σε υπο-θεραπευτικές δόσεις. Για παράδειγμα, το συνιστώμενο επίπεδο για την αβοπαρκίνη (avoparcin) στην Ευρωπαϊκή Ένωση ήταν 20 mg / kg σε χοίρους και 40 mg / kg σε κοτόπουλα. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τον πληθυσμό των

ζώων αυτών η ποσότητα της χρησιμοποιούμενης αβοπαρκίνης ήταν αρκετά υψηλότερη από εκείνη που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία λοιμώξεων του ανθρώπου. Σύμφωνα με μια εκτίμηση, στη Δανία χρησιμοποιήθηκαν 24.000 kg δραστικής αβοπαρκίνης σε ζώα ενώ για τον άνθρωπο και για το ίδιο χρονικό διάστημα χρησιμοποιήθηκαν 24 kg (Wegener et al 1999). Η προσθήκη αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες στις ζωοτροφές, πέρα από την επίδρασή τους στην ανάπτυξη και την αύξηση της παραγωγής τους, συνέβαλαν στη βελτίωση της υγείας και της γενικότερης ευημερίας τους, στη βελτίωση της υγιεινής του περιβάλλοντος εκτροφής τους και κατ'επέκταση στον έλεγχο σοβαρών μολυσματικών ασθενειών αυτών (Manning et al 1994, Kyriakis et al 1996). Παρά τις θεικές επιδράσεις η συγκεκριμένη χρήση των αντιβιοτικών συνδέθηκε και με άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου (λόγω της αποβολής υψηλού ποσοστού αυτών 75% -90% στο περιβάλλον μέσω των ούρων και περιττωμάτων των αγροτικών ζώων (Regulation 2003, Voidarou et al 2011, WHO 2014), καθώς και με την ανάπτυξη του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής βακτηρίων που σχετίζονται με λοιμώξεις των συγκεκριμένων ζωικών πληθυσμών. Η ΕΕ αποφάσισε να καταργήσει σταδιακά και να απαγορεύσει οριστικά την εμπορία και τη χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές. Τα αντιβιοτικά θα επιτρέπεται να προστίθενται στις ζωοτροφές μόνο για κτηνιατρικούς σκοπούς. Ο κανονισμός για τις πρόσθετες ύλες στις ζωοτροφές εφαρμόστηκε από 1ης Ιανουαρίου 2006 (WHO 2012) και το εν λόγω μέτρο είναι σύμφωνο με τη συνολική στρατηγική της ΕΕ για την καταπολέμηση της απειλής για την ανθρώπινη υγεία και την υγεία των ζώων και φυτών από τη μικροβιακή αντοχή.

2.1.3.3. Επιτήρηση της χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνιατρική

Η επιτήρηση της κατανάλωσης αντιβιοτικών στην κτηνιατρική σε Ευρωπαϊκές χώρες (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption – ESVAC) ξεκίνησε το 2009 από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) μετά από αίτημα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Τα αρχικά δεδομένα κάλυπταν την περίοδο 2005-2009 από 9 Ευρωπαϊκές χώρες και αφορούσαν τις πωλήσεις αντιβιοτικών για κτηνιατρικούς σκοπούς στις συμμετέχουσες χώρες. Γενικά, ανευρέθηκαν μεγάλες διαφορές στο είδος και την ποσότητα των συνταγογραφούμενων αντιβιοτικών μεταξύ των χωρών, ενώ κοινό εύρημα αποτέλεσε η αυξητική τάση των πωλήσεων των αντιβιοτικών που θεωρούνται καθοριστικής σημασίας για την ιατρική, σύμφωνα με τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Uchil et al 2014, EFSA 2015a).

Οι αρμόδιοι κτηνίατροι οφείλουν να συμμορφώνονται με την κρατική νομοθεσία η οποία διέπει τη χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών που τους εξουσιοδοτεί να συνταγογραφούν

αντιβιοτικά για θεραπεία λοιμώξεων των ζώων, τα οποία αρχικά χρησιμοποιούνταν μόνο για θεραπεία λοιμώξεων του ανθρώπου. Η «συνετή χρήση αντιβιοτικών» καθορίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 1997 (WHO 2000) και έκτοτε πολλές διεθνείς αρχές όπως η Παγκόσμια κτηνιατρική εταιρεία, (World Veterinary Association), η Διεθνής Ομοσπονδία Παραγωγών Γεωργίας (International Federation of Agriculture Producers) και η Παγκόσμια Ομοσπονδία Βιομηχανιών Υγείας των Ζώων (World Federation of Animal Health Industry), επιτηρούν τη χρήση αντιβιοτικών στα ζώα.

2.2. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

2.2.1. Το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής – Γενική θεώρηση

Με τη βελτίωση των μικροβιολογικών, μοριακών και αναλυτικών διαγνωστικών τεχνικών, πολυάριθμες αντιβακτηριακές ενώσεις αναγνωρίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως επιλογή στις περιπτώσεις μικροβιακών λοιμώξεων ανθρώπων ή ζώων. Ανεξάρτητα από την αναγκαιότητα εφαρμογής τους, αυτές οι ισχυρές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για τον έλεγχο της ανάπτυξης μικροοργανισμών σε κλινικά περιβάλλοντα κατά τη διαχείριση κλινικών περιστατικών, για τη θεραπεία λοιμώξεων του ανθρώπου και των ζώων, ενώ βρήκαν εφαρμογή ακόμη και στην τεχνολογία τροφίμων ως συντηρητικά (Farber 1959). Ωστόσο, τα παθογόνα βακτήρια παρουσίασαν σύντομα ενδείξεις επιβίωσης έναντι των θανατηφόρων επιδράσεων των αντιβιοτικών και ο πρώτος ανθεκτικός στην πενικιλίνη σταφυλόκοκκος αναφέρθηκε πολύ σύντομα μετά την εισαγωγή πενικιλίνης το 1946, αν και οι πενικιλινάσες ανακαλύφθηκαν πολύ πριν από την ανακάλυψη της ίδιας της πενικιλίνης, υποδηλώνοντας την εμφάνιση φυσικών δεξαμενών γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής (D'costa et al 2006, Davies and Davies 2010). Η μη ορθή χρήση των αντιβιοτικών αντιπροσωπεύει το 20% - 50% του συνόλου των καταναλωθέντων (Čížman 2003) και αφορά τη χρήση τους στην αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων (δεν ενδείκνυται), τη συνταγογράφηση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος, τη μη συμμόρφωση των ασθενών στη θεραπευτική αγωγή και τη μη ορθή δοσολογία ή διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής (Tenover 2006, Starrels et al 2009).

Τα βακτήρια είναι δυνατό να αναπτύξουν μηχανισμούς μικροβιακής αντοχής λόγω της έκθεσής τους σε υπο-θανατηφόρα επίπεδα αντιβιοτικών στο περιβάλλον επιβίωσής τους, ή εναλλακτικά, έχουν τη δυνατότητα άμεσης απόκτησης μηχανισμών μικροβιακής αντοχής άλλων βακτηρίων, μέσω μηχανισμών μεταφοράς γενετικού υλικού (DNA). Σύμφωνα με δεδομένα του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) των Ηνωμένων Πολιτειών, πάνω από δύο εκατομμύρια άνθρωποι στις Ηνωμένες Πολιτείες προσβάλλονται από ανθεκτικούς στα αντιβιοτικά μικροοργανισμούς και περίπου 23.000

άνθρωποι ετησίως οδηγούνται στο θάνατο, ενώ στην Ευρώπη περίπου 25.000 θάνατοι οφείλονται σε βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά (ECDC and EMEA 2009). Η νοσηρότητα και η θνησιμότητα που οφείλονται σε διάφορες μολυσματικές ασθένειες σε πυκνοκατοικιμένες χώρες χαμηλού βιοτικού επιπέδου αυξάνονται αισθητά και η θεραπεία τους επηρεάζεται καθοριστικά από την ανάπτυξη αντοχής των υπεύθυνων παθογόνων στα υπάρχοντα αντιβιοτικά (Chattopadhyay 2014).

Ο άνθρωπος, τα ζώα αλλά και κάποια τρόφιμα αποτελούν μέρη ενός πολύπλοκου και διασυνδεδεμένου οικοσυστήματος και λαμβάνοντας υπόψη τη μετακίνηση ανθρώπων και ζώων καθώς και τη διακίνηση τροφίμων παγκοσμίως, κρίνεται ύψιστης σημασίας η εκτίμηση και αξιολόγηση των σχετικών κινδύνων εμφάνισης και διάδοσης του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής. Η χρήση λοιπόν των αντιβιοτικών στην τεχνολογία των τροφίμων και τη γεωργία έχει άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις στην εμφάνιση του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά βακτηρίων που σχετίζονται με λοιμώξεις των ζώων, τα οποία είναι δυνατό να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα μέσω των ζωοκομικών προϊόντων. Είναι πλέον αποδεκτό ότι η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στην κτηνοτροφία έχει ως αποτέλεσμα, την ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής των ανθρώπινων παθογόνων άμεσα ή έμμεσα, διότι ενώ τα ευαίσθητα βακτήρια θανατώνονται με τη χρήση αντιβιοτικών, αφήνουν ανθεκτικές παραλλαγές τους που με τη σειρά τους μπορούν να υπερισχύσουν (Wegener 2003). Οι οφειλόμενες σε τέτοιου είδους ανθεκτικά βακτήρια λοιμώξεις του ανθρώπου, καθίστανται μη ιάσιμες, είτε απαιτούν παρατεταμένη θεραπεία, ή η θεραπεία είναι περίπλοκη και δαπανηρή (Heuer et al. 2009). Η αποτελεσματικότητα πολλών δημοφιλών και αποτελεσματικών αντιβιοτικών είναι σε κίνδυνο, κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή κρίση στη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών στο εγγύς μέλλον.

2.2.2. Ορισμοί και μορφές μικροβιακής αντοχής

Ως μικροβιακή αντοχή ορίζεται η προσωρινή ή μόνιμη ικανότητα ενός μικροοργανισμού και των απογόνων του να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται κάτω από συνθήκες που φυσιολογικά θα τους εξουδετέρωναν ή θα ανέστειλαν την ανάπτυξή τους (McDonnell and Russell 1999, Acar and Rostel 2001, Mathur and Singh 2005). Οι αντιμικροβιακές ουσίες εξ ορισμού περιλαμβάνουν οποιαδήποτε ουσία η οποία επιφέρει αναστολή της ανάπτυξης ή και το θάνατο των μικροοργανισμών σε κλινικό περιβάλλον ή μείωση του μικροβιακού φορτίου σε υλικά και επιφάνειες. Περιλαμβάνουν αντιβιοτικά, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων ανθρώπων και ζώων, καθώς και χημικά βιοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την απολύμανση σε περιβάλλοντα επεξεργασίας

τροφίμων. Ένας μικροοργανισμός μπορεί να αποκτήσει αντοχή σε ένα αντιβιοτικό στο οποίο παρουσίαζε έως πρόσφατα ευαισθησία, γεγονός που σημαίνει ότι το αντιβιοτικό δεν θα είναι πλέον σε θέση να επιφέρει το θάνατο ή την αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο ίδιο επίπεδο όπως και πριν. Η πλειονότητα των περιπτώσεων μικροβιακής αντοχής οφείλονται σε γονίδια ανθεκτικότητας τα οποία μεταφέρονται μεταξύ μικροοργανισμών με μηχανισμούς γενετικής ανταλλαγής. Όταν ένας βακτηριακός πληθυσμός ο οποίος ευθύνεται για την πρόκληση μιας λοίμωξης είναι ευαίσθητος στα αντιβιοτικά επιλογής, θα θανατωθεί κατά την έκθεσή του σε αυτά. Ωστόσο, υπάρχει πάντα ένας μικρός υποπληθυσμός ανθεκτικών κυττάρων αυτών, ο οποίος είναι δυνατό να πολλαπλασιάζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών φαρμάκων (Addis 2015, Smith and Crabb 1956). Εάν η συγκέντρωση των αντιμικροβιακών δεν είναι αρκετά υψηλή ώστε να θανατωθεί αυτός ο υποπληθυσμός, τότε το περιβάλλον κρίνεται ευνοϊκό για την επιλογή του πληθυσμού αυτού. Στην περίπτωση αυτή είναι αποδεκτό ότι αυτά τα ανθεκτικά βακτηριακά κύτταρα προκύπτουν από τυχαίες μεταλλάξεις και ότι περιστασιακά οι τυχαίες αυτές μεταλλάξεις εκφράζονται από ένα γονίδιο, το οποίο συνδέεται με την ευαισθησία έναντι των αντιβιοτικών και στη συνέχεια είναι δυνατό να κληρονομηθεί σταθερά από όλους τους απογόνους. Επίσης ανθεκτικά βακτηριακά κύτταρα είναι δυνατό να αποκτήσουν κάποιο γονίδιο αντοχής μέσω ανταλλαγής γενετικού υλικού από κάποιο άλλο βακτηριακό κύτταρο (Smith 1967, Mare 1968).

Η ικανότητα των βακτηρίων να επιβιώνουν παρουσία αντιμικροβιακής ουσίας καθώς και αλλαγές στην ευαισθησία τους έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων μπορεί να προσδιορισθούν εργαστηριακά. Τα βακτήρια είναι δυνατό να εμφανίσουν φάσμα αποκρίσεων στους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Έτσι ένα βακτηριακό είδος μπορεί να χαρακτηριστεί ως «ευαίσθητο» (sensitive), «ενδιάμεσα ευαίσθητο» (intermediate) και «ανθεκτικό» (resistant) στον αντιμικροβιακό παράγοντα στον οποίο δοκιμάζεται στο εργαστήριο. Η δραστηριότητα λοιπόν ενός αντιβιοτικού έναντι συγκεκριμένου βακτηριακού είδους είναι ένα μετρήσιμο μέγεθος, το οποίο προσδιορίζεται εργαστηριακά ως Ελάχιστη Ανασταλτική Πυκνότητα (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) και εκφράζεται σε $\mu\text{g/ml}$ ή ως ζώνη αναστολής της μικροβιακής ανάπτυξης (Inhibition zone) και εκφράζεται σε mm. Η MIC προσδιορίζει την ελάχιστη πυκνότητα (συγκέντρωση) του αντιβιοτικού που είναι ικανή να αναστείλει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού σε συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας στο εργαστήριο και αναφέρεται στη μειωμένη ευαισθησία των βακτηρίων σε αντιβιοτικά πάνω από ένα «σημείο διαχωρισμού» (breakpoint), το οποίο ορίζεται ως το ανώτατο όριο της φυσιολογικής ευαισθησίας ενός συγκεκριμένου βακτηριακού είδους το οποίο είναι επίσης γνωστό και ως επιδημιολογική αντοχή. Η τιμή

της MIC διαχωρίζει έναν πρωτόγονο πληθυσμό από έναν ανθεκτικό υποπληθυσμό και ονομάζεται βιολογικό ή μικροβιολογικό breakpoint. Το μέγεθος αυτό καθορίζει την βιολογική αντοχή ενός μικροοργανισμού, (είναι γνωστή επίσης και ως επιδημιολογική αντοχή) έναντι ενός αντιμικροβιακού παράγοντα και οι μεταβολές του υποδηλώνουν την εμφάνιση και έκφραση ενός μηχανισμού αντοχής (Kahlmeter et al 2003, Van Eldere 2005, Bywater et al 2006). Στην κλινική πράξη η μικροβιακή αντοχή προσδιορίζεται από το κλινικό αποτέλεσμα, από το αν δηλαδή ο ασθενής θεραπεύτηκε ή όχι. Έτσι το κλινικό breakpoint ορίζεται ως η τιμή εκείνη της MIC της αντιμικροβιακής ουσίας κάτω από την οποία η πιθανότερη έκβαση είναι η ίαση (ευαίσθητο) ενώ πάνω από την οποία πιθανότατα δεν θα υπάρξει θεραπευτικό αποτέλεσμα (ανθεκτικό). Η μικροβιακή αντοχή μπορεί συχνά να επιβεβαιωθεί γενοτυπικά, με την ανίχνευση της παρουσίας ενός συγκεκριμένου γονιδίου ή μηχανισμού μικροβιακής αντοχής μέσω μοριακών τεχνικών. Η μικροβιακή αντοχή μπορεί να είναι ενδογενής ή επίκτητη.

2.2.2.1. Ενδογενής μικροβιακή αντοχή

Η ενδογενής αντοχή (Intrinsic resistance) είναι φυσική σε όλα τα μέλη μιας συγκεκριμένης βακτηριακής ταξονομικής ομάδας, όπως ενός βακτηριακού γένους, είδους, ή υποείδους έναντι ενός συγκεκριμένου αντιβιοτικού. Σε αυτή την περίπτωση τα βακτήρια παρουσιάζουν αντοχή σε κάποιο/α αντιβιοτικό/ά από τη φύση τους, χωρίς δηλαδή να απαιτείται τροποποίηση του γενετικού τους υλικού και ως εκ τούτου η θεραπεία με τη χρήση αυτών των αντιβιοτικών δεν θα έχει επιτυχή έκβαση, ή ενδέχεται ακόμη και να επιδεινώσει μια συγκεκριμένη κλινική κατάσταση (Aarestrup 2006, Davies and Davies 2010, Viseur et al 2011). Παραδείγματα ενδογενούς αντοχής αποτελούν, πολλά Gram-αρνητικά βακτηρίδια τα οποία εκ φύσεως είναι ανθεκτικά στη δράση των μακρολιδίων, δεδομένου ότι αυτές οι χημικές ουσίες λόγω του μεγάλου μοριακού τους βάρους είναι αδύνατο να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα και να αποκτήσουν πρόσβαση στον κυτοπλασματικό στόχο τους. Άλλα παραδείγματα ενδογενούς αντοχής περιλαμβάνουν α) τη μειωμένη δραστηριότητα των αμινογλυκοσιδών έναντι των αναερόβιων βακτηρίων, λόγω της μη ικανότητας διείσδυσης της αμινογλυκοσίδης στο εσωτερικό των κυττάρων υπό αναερόβιες συνθήκες και β) την αντοχή στην πολυμυξίνη των κατά Gram-θετικών βακτηρίων λόγω της απουσίας της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης από την κυτταροπλασματική τους μεμβράνη. Παραδείγματα φαινοτύπων ενδογενούς αντοχής για τις κύριες τάξεις βακτηρίων φαίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Παραδείγματα ενδογενούς μικροβιακής αντοχής (Prescott and Dowling 2013).

Organism	Intrinsic Resistance(s)
Most Gram-negative bacteria (<i>Enterobacteriaceae Pseudomonas</i> spp., or <i>Campylobacter</i> spp.)	Penicillin G, oxacillin, macrolides, lincosamides, streptogramins, glycopeptides, bacitracin
<i>Klebsiella</i> spp.	Ampicillin
<i>Proteus vulgaris</i>	Ampicillin, cephalosporins I, polymyxins
<i>Proteus mirabilis</i>	Tetracycline, polymyxins
<i>Serratia marcescens</i>	Ampicillin, amoxicillin-clavulanate, cephalosporins I, polymyxins
<i>Enterobacter</i> spp.	Ampicillin, amoxicillin-clavulanate, cephalosporins I, ceftiofur
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ampicillin, cephalosporins I and II, ceftriaxone, kanamycin, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim, quinolones
<i>Haemophilus</i> spp.	(Streptomycin, kanamycin), macrolides
<i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Campylobacter coli</i>	Cephalosporins I, trimethoprim
Most Gram-positive bacteria	Polymyxins, quinolones
<i>Streptococcus</i> spp.	Aminoglycosides (low level)
<i>Enterococcus</i> spp.	Oxacillin, cephalosporins, aminoglycosides (low level), sulfonamides (<i>in vivo</i>), trimethoprim (<i>in vivo</i>)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Oxacillin, cephalosporins, lincosamides
<i>Bacillus anthracis</i>	Cephalosporins, sulfonamides, trimethoprim
<i>Anaerobes</i> (including <i>Clostridium</i> spp.)	Aminoglycosides

Η ενδογενής μικροβιακή αντοχή βακτηριακών γενών πρέπει να λαμβάνεται υπόψη από τους κλινικούς ιατρούς και κτηνιάτρους έτσι ώστε να αποφεύγονται οι ακατάλληλες και αναποτελεσματικές θεραπευτικές αγωγές. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τη Δοκιμή Ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά φάρμακα (EUCAST) παρέχει λίστα αντιμικροβιακής ευαισθησίας για εύρος μικροοργανισμών και αντιβιοτικών (<http://mic.eucast.org/Eucast2/>).

2.2.2.2. Επίκτητη μικροβιακή αντοχή

Η επίκτητη μικροβιακή αντοχή αναφέρεται στην ικανότητα των βακτηρίων να προσαρμόζονται σταδιακά στην παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών (στις οποίες δεν παρουσιάζουν ενδογενή αντοχή) αναπτύσσοντας μηχανισμούς αντοχής, είτε 1) μέσω σημειακών μεταλλάξεων του χρωμοσωματικού τους DNA (mutations) (κάθετη μεταβίβαση), ή / και 2) με απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια [οριζόντια μεταβίβαση γονιδίων, Horizontal Gene Transfer (HGT)]. Συνήθως ως επίκτητη αντοχή αναφέρεται μόνον αυτή που οφείλεται σε οριζόντια μεταβίβαση γονιδίων και ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ βακτηριακών στελεχών του ίδιου ή διαφορετικού είδους (Aarestrup et al. 2008, Courvalin 2008, van Hoek et al 2011, Verraes et al 2013).

1) Μεταλλάξεις (mutations) (κάθετη μεταβίβαση)

Κάθε βακτηριακός πληθυσμός είναι πιθανόν να περιέχει στελέχη που έχουν υποστεί μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις συμβαίνουν ως τυχαία γεγονότα, συμβάλλουν ελάχιστα στην απόκτηση αντοχής (ένα στα 10^8 - 10^9 βακτηριακά κύτταρα ενός βακτηριακού πληθυσμού

θα αποκτήσει αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες μέσω μετάλλαξης) και ως εκ τούτου θεωρούνται σπάνια αιτία ανθεκτικότητας. Μπορούν να αποκτήσουν σημαντική κλινική σημασία όταν το αντιμικροβιακό φάρμακο που χρησιμοποιείται είναι ευρείας χρήσης στην κλινική πράξη, διότι με την πάροδο του χρόνου επιβιώνουν τα ανθεκτικά στελέχη και υπερτερούν στο μικροβιακό πληθυσμό (κάθετη μεταβίβαση) (Lindgren et al 2003, Courvalin 2008, Couce and Blázquez 2009).

2) Απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού - Μεταβίβαση γονιδίων (Οριζόντια μεταβίβαση γονιδίων αντοχής)

Για την πλειοψηφία των κλινικών απομονωθέντων στελεχών, η αντιμικροβιακή αντοχή είναι αποτέλεσμα της απόκτησης γονιδίων αντοχής τα οποία συχνά βρίσκονται σε εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία. Η μεταβίβαση νέων γονιδίων στο βακτήριο μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικούς τρόπους (Amábile-Cuevas and Chicurel 1992, Amábile-Cuevas 2013).

α) Μεταμόρφωση (transformation): κατά αυτόν τον τρόπο μεταφοράς γενετικού υλικού λαμβάνει χώρα ενσωμάτωση εξωγενούς «ελεύθερου» DNA από το περιβάλλον, το οποίο έχει προκύψει από τη λύση άλλων βακτηρίων όμοιου είδους. Το «ξένο» DNA εισέρχεται στο κύτταρο – δέκτη, όπου ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα. Απαντάται στους πνευμονιοκόκκους, στους αιμοφίλους κι άλλους Gram + κόκκους (Amábile-Cuevas and Chicurel 1992, Amábile-Cuevas 2013).

β) Σύζευξη (conjugation): αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό μεταβίβασης γονιδίων αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η μεταβίβαση του γενετικού υλικού γίνεται μέσω πλασμιδίων, τα οποία μπορεί να φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια αντοχής (πλασμίδια πολλαπλής αντοχής). Περιλαμβάνει τη μονόδρομη μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ βακτηρίων του ίδιου ή διαφορετικού είδους και απαιτείται άμεση επαφή μεταξύ δύο βακτηρίων (δότη – δέκτη). Η ικανότητα της σύζευξης οφείλεται στην παραγωγή ειδικών νηματοειδών προεκβολών των συζευκτικών ινιδίων (sexpili), τα οποία αποτελούν την οδό μέσω της οποίας πραγματοποιείται η μεταβίβαση (συζευκτικά – αυτομεταφερόμενα πλασίδια). Αν και υπάρχουν κάποια παραδείγματα μεταφοράς γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής μέσω βακτηριοφάγων, ο κύριος τρόπος μεταβιβάσιμης μικροβιακής αντοχής μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών παγκοσμίως είναι αυτός της βακτηριακής σύζευξης και θεωρείται υπεύθυνος για την αύξηση της πολυανθεκτικότητας βακτηριακών στελεχών από διάφορες πηγές όπως απόβλητα, ζώα, άνθρωπος (Burrus et al 2002, Burrus and Waldor 2004, Lyras et al 2004, Wozniak and Waldor 2010, Verraes et al. 2013).

Μεταθετά γενετικά στοιχεία

Η οριζόντια μεταβίβαση των γονιδίων αντοχής, η διατήρησή τους σε βακτηριακούς πληθυσμούς και η δημιουργία αντοχής σε πολλαπλά αντιβιοτικά ενισχύεται σημαντικά από γενετικές δομές όπως είναι τα πλασμίδια (plasmids), τα ιντεγκρόνια (integrans) και τα τρανσποζόνια (transposons) (Aarestrup 2006, Salyers et al 2007, Bennett 2008, Revilla et al 2008, Verraes et al. 2013). Αυτά τα κινητά γενετικά στοιχεία αντιπροσωπεύουν μια δεξαμενή κινητού DNA, δεδομένου ότι επιτρέπουν στα γονίδια να μετακινούνται μέσα στο γονιδίωμα ενός βακτηρίου ή μεταξύ γονιδιωμάτων διαφορετικών βακτηρίων.

1. Πλασμίδια: Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά αυτο-αναπαραγόμενα γενετικά στοιχεία που δεν είναι απαραίτητα για την επιβίωση, αλλά φέρουν γονίδια τα οποία προσδίδουν κάποιο επιλεκτικό πλεονέκτημα (ή πλεονεκτήματα) στο βακτήριο ξενιστή τους, όπως τα γονίδια μικροβιακής αντοχής. Παρά την φαινομενική αποτελεσματικότητα αυτών των μηχανισμών μεταφοράς, τα βακτηρίδια διαθέτουν εύρος στρατηγικών ώστε να αποφευχθεί η «προσβολή» τους από το ξένο DNA (Thomas and Nielsen 2005). Τα πλασμίδια ταξινομούνται ανάλογα με τα γονίδια που κωδικοποιούν, σε πλασμίδια αντοχής (R πλασμίδια), σε πλασμίδια παθογένειας κ.ά. Επίσης με βάση την ιδιότητά τους να μεταφέρουν αντίτυπά τους σε άλλα βακτήρια με τη διαδικασία της βακτηριακής σύζευξης, τα πλασμίδια ταξινομούνται σε συζευτικά ή μη. Τέλος ανάλογα με την ικανότητά τους να συνυπάρχουν (χωρίς να εξασκείται κάποια συγκεκριμένη επιλεκτική πίεση) στο ίδιο βακτηριακό κύτταρο τα πλασμίδια ταξινομούνται σε ομάδες συμβατότητας (Carattoli 2011). Κάποια πλασμίδια μπορούν εύκολα να μεταφερθούν μεταξύ ποικίλων βακτηριακών ειδών, για παράδειγμα μεταξύ μη παθογόνων και συγγενών παθογόνων βακτηρίων οδηγώντας έτσι σε κάποιες περιπτώσεις στην εμφάνιση και μαζική εγκατάσταση νέων βακτηριακών πληθυσμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Porpe et al 2005). Εκτός από το φαινόμενο της μετακίνησης μεταξύ βακτηρίων, τα γονίδια ανθεκτικότητας μπορούν επίσης να κινούνται εντός του γονιδιώματος ενός απλού βακτηριακού κυττάρου και να μεταφέρονται από το χρωμόσωμα σε ένα πλασμίδιο ή μεταξύ διαφορετικών πλασμιδίων ή να επιστρέφουν πίσω στο χρωμόσωμα, επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη ποικίλων συνδυασμών γονιδίων αντοχής. Τα τρανσποζόνια και τα ιντεγκρόνια παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή την κινητικότητα εντός του

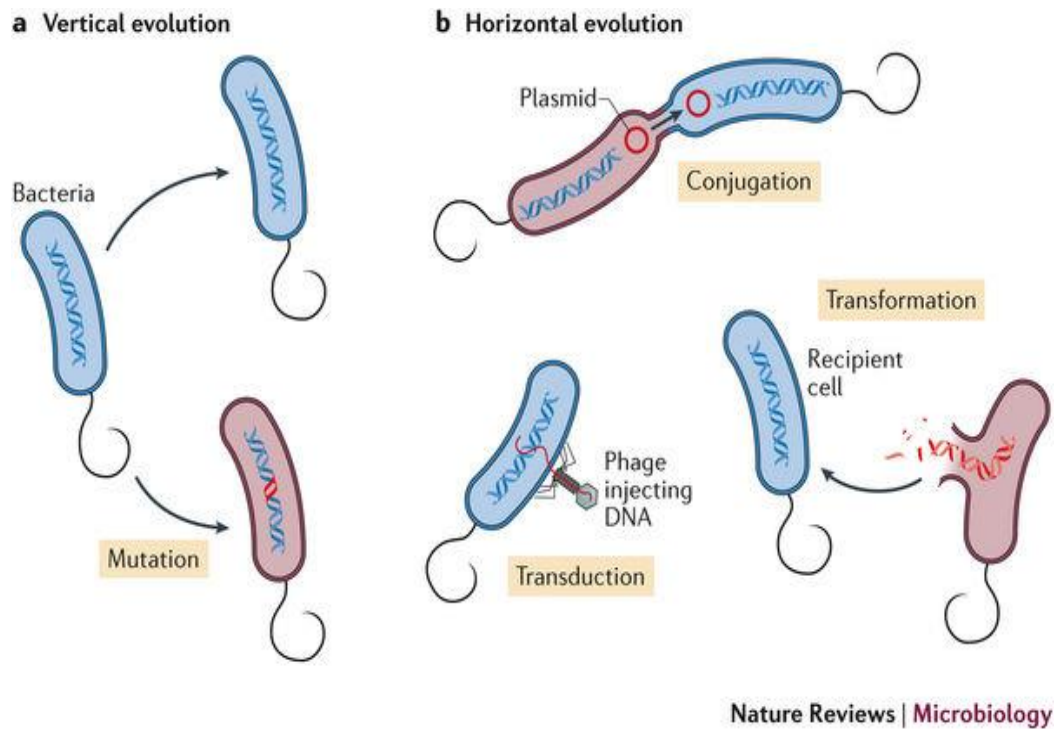
γονιδιώματος (Toleman et al 2006, Bennett 2008, Courvalin 2008, Amábile-Cuevas 2013)

2. *Τρανσποζόνια*: Τα τρανσποζόνια (transposons) είναι μεταθετά γενετικά στοιχεία τα οποία περιέχουν ένα ή ομάδα γονιδίων και μπορούν να μετακινηθούν τόσο ενδοκυτταρικά όσο και μεταξύ γειτονικών γενετικών μονάδων (Bennett 2008).

3. *Ιντεγκρόνια*: Τα ιντεγκρόνια (integrons) είναι γενετικά στοιχεία τα οποία μπορούν να αναγνωρίζουν και να ενσωματώνουν γονιδιακές «κασέτες» (μικρά μεταθετά στοιχεία), περιλαμβάνουν ένα μόνο γονίδιο και μια θέση ανασυνδυασμού, δεν κινούνται, αλλά μετακινούνται με πλασμίδια και τρανσποζόνια. Τα ιντεγκρόνια μέσω της διαδικασίας ενσωμάτωσης γονιδιακών κασετών στην ουσία μπορούν να «παγιδεύουν» γονίδια αντοχής (Stokes and Hall 1989, Aarestrup 2006).

γ) **Μεταγωγή (transduction)**: Ο μηχανισμός αυτός πραγματοποιείται με την βοήθεια βακτηριοφάγων και συνίστανται στην μεταφορά γενετικού υλικού (DNA) από αυτούς, από ένα κύτταρο σε άλλο του αυτού μικροβιακού είδους. Στην περίπτωση που αυτό το γενετικό υλικό περιλαμβάνει γονίδιο ή γονίδια που καθορίζουν ανθεκτικότητα, αυτή μεταφέρεται στο νέο - προσβληθέν κύτταρο το οποίο είναι ικανό να τον μεταφέρει και στους απογόνους του (Verraes et al. 2013). Η μεταγωγή αποτελεί σημαντικό μηχανισμό στη μεταφορά ανθεκτικότητας μεταξύ στελεχών *Staphylococcus aureus* όπου ορισμένοι φάγοι μπορούν να μεταφέρουν πλασμίδια που ρυθμίζουν την παραγωγή πενικιλινασών ή άλλων ουσιών υπευθύνων για την ανθεκτικότητα έναντι της ερυθρομυκίνης, τετρακυκλίνης ή χλωραμφαινικόλης (McDonald 1966).

Στην εικόνα 2 φαίνονται οι μηχανισμοί μεταβίβασης γονιδίων μικροβιακής αντοχής.



Εικόνα 2: Μεταβίβαση γονιδίων μικροβιακής αντοχής (Sommer et al 2017).

2. 2.3. Βιοχημικοί μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει αρκετούς κυτταρικούς βιολογικούς μηχανισμούς οι οποίοι τους προσδίδουν αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (Kumar and Varela 2013). Η βάση δεδομένων για τα γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά (ARDB) παραθέτει την ύπαρξη περισσότερων από 23.000 πιθανών γονιδίων αντοχής (Liu and Pop 2008). Οι κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί αντιμικροβιακής αντοχής περιγράφονται παρακάτω:

α) Τροποποίηση – αδρανοποίηση του αντιμικροβιακού φαρμάκου με τη δράση ενζύμων (Enzymatic drug inactivation)

Ένας από τους πρωταρχικούς μηχανισμούς αντοχής αφορά την ενζυματική αδρανοποίηση των αντιμικροβιακών παραγόντων (De Pascale and Wright 2010). Τα ένζυμα αυτά μεταβολίζουν υδρολυτικά συστατικά του αντιβιοτικού, παράγοντας αδρανή μεταβολικά τελικά προϊόντα, τα οποία δεν θανατώνουν ή δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Η πρώτη περίπτωση ενζυμικής αδρανοποίησης αντιβιοτικών αφορούσε την αδρανοποίηση των πενικιλινών και άλλων αντιβιοτικών της κατηγορίας των β-λακταμών με τη δράση των πενικιλινασών, γνωστές και ως λακταμάσες (Jacoby and Bush 2005). Κάποια ένζυμα λόγω του εύρους δράσης τους, ονομάστηκαν ευρέως φάσματος λακταμάσες (ESBLs) (Michael et al 2015). Αυτές αποτελούν πρόκληση τόσο στο

ανθρώπινο όσο και στο κτηνιατρικό κλινικό περιβάλλον (Smet et al 2010). Άλλα υδρολυτικά ένζυμα τα οποία απενεργοποιούν ορισμένα μακρομοριακά αντιμικροβιακά είναι οι εστεράσες (Leclercq 2002, Ryörlä et al 2014). Επίσης, μικροβιακά ένζυμα είναι δυνατό να επιφέρουν βιοχημική τροποποίηση των αντιβιοτικών, καθιστώντας τα μη ικανά να θανατώσουν ή να αναστείλουν την ανάπτυξη βακτηρίων (Ramirez and Tolmasky 2010). Το αντιβιοτικό είναι δυνατό να αδρανοποιηθεί, είτε πριν είτε μετά τη διείσδυσή του στο βακτηριακό κύτταρο (π.χ., β-λακταμάσες και αμινογλυκοσιδο – τροποποιητικά ένζυμα (AMEs). Τα ένζυμα αυτά συνήθως είναι επίκτητα και μεταφέρονται στο μικροβιακό κύτταρο με πλασμίδια, τρανσποζόνια και άλλους μηχανισμούς οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού, αλλά και ενδογενή. Κάποια όμως αντιβιοτικά (π.χ. Vancomycin) δεν αδρανοποιούνται από ένζυμα.

β) Τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού (Target modification)

Αυτός ο βακτηριακός μηχανισμός περιλαμβάνει την τροποποίηση τόσο επιφανειακών στόχων (π.χ. τροποποίηση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος των ανθεκτικών στην βανκομυκίνη εντεροκόκκων) (Healy et al 2000, Lambert 2005), όσο και ενδοκυττάρων στόχων (π.χ. αντοχή στα μακρολίδια των Gram-θετικών βακτηρίων λόγω τροποποίησης του ριβοσωμιακού στόχου αυτών) (Fàbrega et al 2008, Lambert 2012).

γ) Παρεμπόδιση της πρόσδεσης του αντιμικροβιακού φαρμάκου στο στόχο (προστασία στόχου) (Target protection)

Στον μηχανισμό αυτό το ριβόσωμα προστατεύεται από μικρά πεπτίδια και έτσι παρεμποδίζεται η δέσμευση του αντιβιοτικού από τον στόχο του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντοχή βακτηρίων στις τετρακυκλίνες. Οι αναστολείς της πρωτεϊνσύνθεσης δεσμεύονται στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος, στην οποία θέση θα προσδένονταν η τετρακυκλίνη (Roberts 1996, Schnappinger and Hillen 1996).

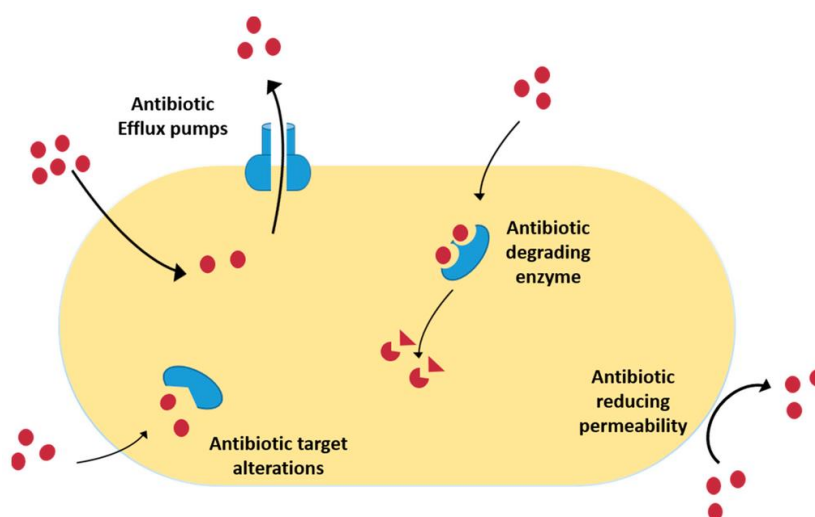
δ) Διαταραχές στη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (Reduced permeability)

Αυτός ο μηχανισμός αναφέρεται ως μείωση της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και εμποδίζει την πρόσβαση του αντιβιοτικού στους ενδοκυτταρικούς στόχους, προσδίδοντας έτσι μικροβιακή αντοχή (Nikaido 1988, 2001, Delcour 2009). Ένας πολύ γνωστός και εκτενώς μελετημένος μηχανισμός μείωσης της διαπερατότητας σχετίζεται με την παρουσία στην εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηριδίων διάφορων πρωτεϊνικών διαύλων, οι οποίες ονομάζονται πορίνες

και εμπλέκονται στη μεταφορά, την πρόσληψη ή την εκροή ποικίλων χημικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων και διαφόρων κατηγοριών αντιβιοτικών (Li et al 2015). Οι πορίνες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του περιβάλλοντος και του βακτηρίου. Οι ιδιότητες διαπερατότητας έχουν σημαντική επίπτωση στην εισροή του αντιβιοτικού. Τα υδρόφιλα αντιβιοτικά όπως οι β-λακτάμες, η τετρακυκλίνη, η γλωραμφαινικόλη και οι φθοριοκινολόνες αποκτούν πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω πορινών, ενώ οι μακρολίδες και τα άλλα υδρόφοβα αντιβιοτικά διαχέονται διαμέσου της λιπιδικής διπλοστιβάδας (Hernández-Allés et al 1999, Galdiero et al 2012).

ε) *Ενεργή εκροή (Active efflux) αντιμικροβιακών φαρμάκων:*

Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει την ενεργή εκροή αντιβιοτικών από το βακτηριακό κύτταρο μέσω των αντλιών ενεργητικής εκροής (Kumar and Varela 2012, Floyd et al 2013). Οι αντλίες ενεργητικής εκροής (οι οποίες υπάρχουν σε όλα τα ζώντα κύτταρα για την αποβολή τοξικών ουσιών) είναι συστήματα πρωτεϊνών οι οποίες εξωθούν ενεργητικά τα αντιβιοτικά από το κυτταρόπλασμα (όπως συμβαίνει στις μακρολίδες κ.λπ.), πίσω στον περιπλασμικό χώρο (π.χ. αντλία εκροής τετρακυκλίνης - TetA στα εντεροβακτηριακά) ή απευθείας στο εξωτερικό περιβάλλον (μεταφορείς εκροής πολλαπλών φαρμάκων RND). Μπορεί να συνυπάρχουν διάφοροι τύποι αντλιών, οπότε συνδέονται με ισχυρή αντοχή. Οι κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί αντιμικροβιακής αντοχής παρουσιάζονται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί αντιμικροβιακής αντοχής (Borges et al 2016)

2.2.4. Αντοχή βακτηρίων στα αντιβιοτικά

2.2.4.1. Αντοχή των σταφυλοκόκκων στα αντιβιοτικά

β- λακταμικά αντιμικροβιακά

Τα β- λακταμικά αντιβιοτικά φέρουν στο μόριό τους β- λακταμικό δακτύλιο και περιλαμβάνουν τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες, τις μονοβακτάμες, τις πενέμες, τις καρβαπενέμες καθώς και τους αναστολείς των β- λακταμασών. Ο μηχανισμός δράσης των παραπάνω αντιμικροβιακών σχετίζεται με την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Προκειμένου τα αντιβιοτικά αυτά να δράσουν έναντι ενός βακτηριακού κυττάρου απαιτείται η ένωσή τους με τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin- binding proteins, PBP), οι οποίες είναι ένζυμα που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και χαρακτηρίζονται έτσι λόγω της ικανότητας σύνδεσής τους με την πενικιλίνη μέσω της οποίας φτάνουν σε ικανή συγκέντρωση στον βιολογικό τους στόχο, δηλαδή στο σημείο σύνθεσης του μουκοπεπτιδίου. Ο *S. aureus* παράγει τέσσερις διαφορετικές πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBP 1,2,3,4), από τις οποίες οι PBP-2 και PBP-3 είναι απαραίτητες για την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Η αντοχή των σταφυλοκόκκων έναντι των β- λακταμικών αντιβιοτικών οφείλεται στην παραγωγή των β- λακταμασών, ένζυμα που μετέχουν στην υδρόλυση του β- λακταμικού δακτυλίου. Έναντι των πενικιλινών και κεφαλοσπορινών δρα μεγάλο φάσμα β- λακταμασών η παραγωγή των οποίων ρυθμίζεται από το γονίδιο *blaZ*, που εδρεύει σε πλασμίδια και μπορεί να μεταδοθεί μεταξύ σταφυλοκόκκων μέσω φάγου (Sabath 1982, Foster 2017). Προκειμένου να αντιμετωπιστεί η συνεχώς αυξανόμενη αντοχή των σταφυλοκόκκων στην πενικιλίνη, το 1961 παρήχθησαν ημισυνθετικές πενικιλίνες (μεθικιλίνη, οξασιλλίνη, δικλοξασιλλίνη και κλοξασιλλίνη) οι οποίες φέρουν αντοχή στη δράση της β- λακταμάσης, αλλά πολύ γρήγορα και η δράση αυτών συνδέθηκε με αντοχή των σταφυλοκόκκων σε αυτές (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA) (Fomina et al 1971, Blázquez et al 2014). Σήμερα, παγκοσμίως ταυτοποιούνται στελέχη MRSA τα περισσότερα των οποίων παρουσιάζουν αντοχή σε πολλαπλά αντιβιοτικά (Appelbaum 2006). Η ανθεκτικότητα γενών *S. aureus* στη μεθικιλίνη αποδίδεται στην παραγωγή μιας νέας πρωτεΐνης (PBP2a) η οποία παρουσιάζει μειωμένη τάση σύνδεσης με τις β- λακτάμες. Κωδικοποιείται από το *mecA* γονίδιο, το οποίο αποτελεί βασικό στοιχείο της χρωμοσωματικής σταφυλοκοκκικής κασέτας (Staphylococcal Cassette Chromosome, SCCmec) και έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να μεταδοθεί μεταξύ στελεχών *S. aureus* και ενδεχομένως και μεταξύ άλλων ειδών του γένους *Staphylococcus* (Katayama et al 2000, Berger-Bächli and Rohrer 2002, Reygaert

2013, Hiramatsu et al 2014). Τα επίπεδα αντοχής σε στελεχών MRSA παρουσιάζουν διακυμάνσεις και μπορεί να κυμαίνονται από φαινοτυπικά ευαίσθητα σε εξαιρετικά ανθεκτικά. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην αποτελεσματική ή όχι παραγωγή της PBP 2a, η οποία ρυθμίζεται από ποικιλία χρωμοσωμικών παραγόντων (Stapleton and Taylor 2002, Paterson et al 2013, Peacock and Paterson 2015).

Τετρακυκλίνες

Είναι αντιβιοτικά ευρέος φάσματος και ο μηχανισμός δράσης τους αφορά την αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης λόγω της δέσμευσης από το αντιβιοτικό της ριβοσωμικής υπομονάδας 30S, που σχετίζεται με την προσθήκη νέων αμινοξέων στην πεπτιδική αλυσίδα (Andersen 1996, Emaneini et al 2013). Οι κύριοι μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής του σταφυλοκόκκου στις τετρακυκλίνες είναι: α) η ενεργητική απέκκριση του αντιβιοτικού μέσω αντλιών εκροής. Τα γονίδια που ευθύνονται για τον παραπάνω μηχανισμό είναι τα *tetK* και *tetL* τα οποία εδρεύουν σε πλασμίδια (Ardic et al 2005). β) η προστασία του ριβοσώματος, μέσω της παραγωγής πρωτεϊνών που παρεμποδίζουν τη σύνδεση των τετρακυκλινών με τα ριβοσώματα και υπεύθυνα γονίδια είναι τα *tetM* και *tetO*, τα οποία βρίσκονται σε μεταθετά στοιχεία ή στο χρωμόσωμα (Fuda et al 2005, Pantosti et al 2007).

Μακρολίδες

Οι μακρολίδες δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνσύνθεση των βακτηριακών κυττάρων μέσω της ένωσής του με την 50S υπομονάδα των ριβοσωμάτων και την παρεμπόδιση της μεταφοράς ή και της μετάθεσης των πεπτιδίων. Η αντοχή στις μακρολίδες επέρχεται μέσω: α) τροποποίησης του στόχου δράσης του αντιβιοτικού, με υπεύθυνα τα γονίδια *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC*) (erythromycin resistance methylase) (Hosseini et al 2016), β) ενεργητικής απέκκρισης του αντιβιοτικού με αντλία εκροής και γ) αδρανοποίησης του αντιβιοτικού με τη δράση ενζύμων (Lai and Weisblum 1971, Leclercq 2002, Ding et al 2012).

Αμινογλυκοσίδες

Αυτή η ομάδα αντιβιοτικών έχει ως κύριους εκπροσώπους τη γενταμυκίνη, τη στρεπτομυκίνη, τη νεομυκίνη, τη καναμυκίνη και την αμικασίνη (Ramirez and Tolmasky 2010). Είναι προϊόντα μεταβολισμού μικροοργανισμών του γένους *Streptomyces* (kanamycin, tobramycin) και *Micromonospora* (gentamicin), ενώ άλλες είναι ημισυνθετικά παράγωγα. Ο μηχανισμός δράσης αυτής της ομάδας

αντιμικροβιακών παραγόντων έγκειται στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, μέσω δέσμευσης της ριβοσωμικής υπομονάδας 30S των μικροβίων, με αποτέλεσμα να προκαλούν λανθασμένη ανάγνωση της γενετικής πληροφορίας και την παραγωγή μη λειτουργικών πρωτεϊνών. Ο κύριος τρόπος αντοχής των βακτηρίων στις αμινογλυκοσίδες είναι η παραγωγή ενζύμων (ακετυλοτρανσφεράσες, φωσφοτρανσφεράσες και αδενυλοτρανσφεράσες) τα οποία είτε αδρανοποιούν είτε τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ένωσης αυτών με το ριβόσωμα του βακτηρίου. Επίσης η αντοχή στελεχών *S. aureus* στις αμινογλυκοσίδες σχετίζεται και με χρωμοσωμικές μεταλλάξεις (Zarubica et al 2011, Garneau-Tsodikova and Labby 2016).

Φουσιδικό οξύ

Η δράση του φουσιδικού οξέως σχετίζεται με την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης των βακτηριακών κυττάρων. Η αντοχή των σταφυλοκόκκων στο φουσιδικό οξύ οφείλεται είτε σε σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων (*fusA*), είτε στην ύπαρξη γονιδίων μικροβιακής αντοχής (*fusB*, *fusC* και *fusD*) (Chopra 1976, Castanheira et al 2010).

Κινολόνες

Οι κινολόνες προκαλούν αναστολή της δράση της DNA- γυράσης A και της τοποϊσομεράσης IV που οδηγούν στην αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού DNA. Σε αυτή την κατηγορία αντιβιοτικών ανήκουν το ναλιδιζικό οξύ, η σιπροφλοξασίνη και η νορφλοξασίνη.

Οι κινολόνες διεισδύουν παθητικά στα βακτηριακά κύτταρα και επιφέρουν το θάνατό τους αναστέλλοντας τη σύνθεση του βακτηριακού DNA. Τα βακτήρια αποκτούν αντοχή στις κινολόνες μέσω μεταλλάξεων (γονίδια *gyrA* και *gyrC*) που οδηγούν σε αλλαγές των ενζύμων-στόχων ή σε αλλαγές της διαπερατότητας της κυτταρικής τους μεμβράνης και των συστημάτων εξώθησης αυτής (Wolfson and Hooper 1985, Blondeau 2004, Redgrave et al 2014).

Σουλφοναμίδες

Οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων παρεμβαίνοντας στη σύνθεση του φολλικού οξέος, ενώ δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη κυττάρων τα οποία δεν συνθέτουν φολλικό οξύ, όπως τα κύτταρα των θηλαστικών. Η μειωμένη παραγωγή φολλικού οξέως από τα βακτηριακά κύτταρα οδηγεί στην αναστολή της ανάπτυξης τους λόγω της μείωσης του σχηματισμού νουκλεοτιδίων. Η αντοχή των βακτηρίων στις σουλφοναμίδες είναι πολύ συχνή, και είναι δυνατό να οφείλεται: α) σε

μεταλλάξεις οι οποίες σχετίζονται με την παραγωγή π-αμινοβενζοϊκού οξέος και ενζύμων απαραίτητων στη σύνθεση του φολλικού οξέος (Oakberg and Luria 1947, Jensen and Lyon 2009). β) σε παραγωγή ενζύμων ανθεκτικών στη δράση της σουλφοναμίδης ή σε μειωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος.

Γλυκοπεπτίδια

Τα γλυκοπεπτίδια στα οποία ανήκουν η βανκομυκίνη και η τεϊκοπλανίνη παράγονται από ακτινομύκητες και αποτελούνται από μόρια αμινοξέων ενωμένα με σάκχαρα. Δρουν έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων, λόγω του ότι το μεγάλο μόριό τους δεν είναι δυνατό να διαπεράσει το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η βανκομυκίνη προκειμένου να εκδηλώσει αντιμικροβιακή δράση πρέπει να ενωθεί με την D- αλανίνη και μέσω αυτής της σύνδεσης επέρχεται αναστολή της βιοσύνθεσης του μουκοπεπτιδίου της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Η μειωμένη ευαισθησία των βακτηρίων στη βανκομυκίνη οφείλεται σε πάχυνση του κυτταρικού τους τοιχώματος το οποίο παγιδεύει τη βανκομυκίνη στην περιφέρεια του κυττάρου με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της (Tenover et al 2001). Αποτελεί το φάρμακο επιλογής σε περιπτώσεις λοιμώξεων προκαλούμενες από στελέχη MRSA.

Πολυαντοχή στα αντιμικροβιακά

Ως πολυανθεκτικό (Multi Drug Resistant, MDR) χαρακτηρίζεται ένα βακτηριακό στέλεχος το οποίο παρουσιάζει αντοχή έναντι τριών ή περισσότερων αντιμικροβιακών φαρμάκων. Η εμφάνιση της μικροβιακής αντοχής σχετίζεται με πολλά αίτια όπως η μη ορθολογική χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων, η μετακίνηση ανθρώπινου και ζωικού πληθυσμού καθώς και η διακίνηση τροφίμων ζωικής προέλευσης κατά την οποία νέα ανθεκτικά στελέχη είναι δυνατό να εισαχθούν στον προϋπάρχοντα πληθυσμό, ο ανεπαρκής έλεγχος των λοιμώξεων και η ανεπάρκεια του υπεύθυνου υγειονομικού προσωπικού για τον έλεγχο της διασποράς λοιμώξεων (Alekshun and Levy 2007, Miyakis et al 2011, Stryjewski and Corey 2014).

2.2.4.2. Αντοχή της *E. coli* στα αντιβιοτικά

Ένας από τους βασικότερους μηχανισμούς αντοχής βακτηρίων της οικογένειας των εντεροβακτηριακών σχετίζεται με τη δομή τους. Τα κατά Gram-αρνητικά βακτήρια διαθέτουν δομές οι οποίες ενισχύουν την αντοχή τους στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Η εξωτερική μεμβράνη του κυτταρικού τους τοιχώματος φέρει πορίνες, οι οποίες αποτελούν πρωτεϊνικές δομές που σχηματίζουν πόρους και ελέγχουν τη διόδο

διαφόρων μορίων. Η φυσική ανοσία (ενδογενής αντοχή) ορισμένων Gram – αρνητικών βακτηρίων σε ορισμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες αποδίδεται στο μεγάλο μοριακό βάρος αυτών και την επακόλουθη δυσκολία εισόδου τους στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου (Paterson 2006).

β- λακταμικά αντιμικροβιακά

Οι κύριοι μηχανισμοί αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηριδίων συμπεριλαμβανομένης της *E. coli* στα β-λακταμικά είναι: α) η μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα η οποία αποτελεί φραγμό στην είσοδο των αντιβιοτικών. Η μειωμένη είσοδος των β-λακταμικών αντιβιοτικών εντός των περισσότερων Gram-αρνητικών βακτηριακών κυττάρων οφείλεται σε μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν δομικές αλλαγές στις πορίνες. β) η έκκριση β-λακταμασών στον περιπλασματικό χώρο των Gram-αρνητικών βακτηρίων και η εντόπισή τους σε στρατηγικά σημεία, οι οποίες υδρολύουν το β-λακταμικό δακτύλιο του μορίου των αντιβιοτικών αυτών (Richmond and Curtis 1974, Jacoby and Sutton 1985, Jacoby and Munoz-Price 2005, Canton et al 2008). Όλα σχεδόν τα γένη της οικογένειας των εντεροβακτηριακών παράγουν μια κεφαλοσπορινάση η οποία κωδικοποιείται από το βακτηριακό χρωμόσωμα (επίκτητη αντοχή).

Η τροποποίηση των πενικιλινο-δευσμευτικών πρωτεϊνών δεν παρατηρείται στην περίπτωση των Gram - αρνητικών και κατ' επέκταση στην *E. coli* (Poirel et al 2012).

Αμινογλυκοσίδες

Ο συχνότερος μηχανισμός αντοχής της *E. coli* στις αμινογλυκοσίδες είναι η παραγωγή ενζύμων τα οποία αδρανοποιούν ή τροποποιούν τις διάφορες αμινογλυκοσίδες με αποτέλεσμα τη διασταυρούμενη αντοχή (Courvalin 2005). Επίσης η αντοχή της *E. coli* στις αμινογλυκοσίδες συνδέεται με το μηχανισμό της ενεργητικής απέκκρισής τους (efflux) από το βακτηριακό κύτταρο (Davis 1987, Ma et al 1994, Nikaido 1996).

Τετρακυκλίνες

Στους κύριους μηχανισμούς αντοχής της *E. coli* στις τετρακυκλίνες περιλαμβάνονται: α) η ενεργητική έξοδος του αντιβιοτικού από το κυτταρόπλασμα με αντλίες εκροής (efflux pump) μέσω μεμβρανικών πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή ο ρυθμός αποβολής του φαρμάκου είναι μεγαλύτερος σε σχέση με το ρυθμό εισόδου του στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου με αποτέλεσμα τη χαμηλή ή και ανεπαρκή ενδुकυτταρική συγκέντρωση αυτού. Υπάρχουν 33 γονίδια τετρακυκλίνης (tet) και 3

γονίδια οξυτετρακυκλίνης (otr), τα οποία ευθύνονται για την παραγωγή των μεμβρανικών πρωτεϊνών (McGowan 2006).

β) οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις οι οποίες μέσω της μειωμένης παραγωγής πρωτεϊνών (πορινών) οδηγούν σε αντοχή στο αντιβιοτικό (Cohen et al 1993).

Τριμεθοπρίμη – Σουλφοναμίδες

Η τριμεθοπρίμη σε συνδυασμό με τις σουλφοναμίδες εφαρμόζεται ως αντιβακτηριακή αγωγή για τη θεραπεία λοιμώξεων προκαλούμενες από *E. coli*. Η αντοχή των μικροβίων σε αυτές μπορεί να οφείλεται σε χρωμοσωματικές μεταλλάξεις, σε μεταφορά της αντοχής μέσω πλασμιδίων, σε ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα και απώλεια σύνδεσης του φαρμάκου με το στόχο δράσης του (Breeze et al 1975, Perreten and Boerlin 2003).

Κινολόνες

Οι κινολόνες αποτελούν κατηγορία αντιβιοτικών ευρέως φάσματος και οι πιθανοί μηχανισμοί αντοχής της *E. coli* στις κινολόνες είναι οι: α) μεταλλάξεις γονιδίων (gyrA, gyrB) που κωδικοποιούν τα βακτηριακά ένζυμα DNA γυράση και DNA τοποϊσομεράση. β) Μειωμένη συσσώρευση του αντιβιοτικού είτε λόγω μη διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης είτε λόγω υπερλειτουργίας των αντλιών εκροής. γ) Παρουσία γονιδίων (qnr) τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεΐνη QNR η οποία δρα προστατευτικά στην DNA - γυράση έναντι των κινολονών (Martínez-Martínez et al 1998, Jacoby 2005, Ruiz et al 2012).

2.3. ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ

Η παρουσία στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά και η μετάδοσή τους στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας εξετάζεται ως κύρια πηγή μικροβιακής αντοχής στον άνθρωπο και προσελκύει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Παραδείγματα πολυανθεκτικών στους αντιμικροβιακούς παράγοντες βακτηριακών γενών τροφιμογενούς προέλευσης, περιλαμβάνουν τα κατά Gram-θετικά βακτήρια *S. aureus* (Smith and Wardyn 2015, Bortolaia et al 2016), *Enterococcus spp* (Giraffa 2003), *Lactococcus spp* (Walther et al 2008), *Lactobacillus spp* (Danielsen and Wind 2003) και τα κατά Gram-αρνητικά *E. coli* (Szmolka and Nagy 2013), *Campylobacter spp* (Zhang et al 2003), *Listeria monocytogenes* (Dhama et al 2015) και *S. enterica* (Sánchez-Vargas et al 2011, Shrestha et al 2015). Σχεδόν παράλληλα με τη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και στο περιβάλλον παραγωγής τροφίμων, βρέθηκε ότι

στελέχη *E. coli* και *Salmonella enterica* εμφάνισαν πολυαντοχή σε αντιβιοτικά (Anderson 1968, Levy 1998), με αποτέλεσμα την επακόλουθη επικράτηση αυτών των πολυανθεκτικών στελεχών (Witte 2000, Andersen et al 2015). Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η χρήση της αβοπαρκίνης σε κοτόπουλα, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντοχής του βακτηρίου *Enterococcus faecium* στη βανκομυκίνη (Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*, VRE), βακτήριο το οποίο μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου κρέατος (Wegener et al. 1999). Η απαγόρευση της χρήσης της αβοπαρκίνης στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 1997 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της μόλυνσης πουλερικών και ανθρώπου από το βακτήριο αυτό (VRE). Το ενδιαφέρον που σχετίζεται με βακτηριακά γένη ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα δεν περιορίζεται μόνο σε παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι συνδέονται με άμεσους κινδύνους για τη δημόσια υγεία, αλλά το ενδιαφέρον και για βακτηρικά στελέχη τα οποία ανήκουν στη φυσιολογική μικροχλωρίδα των τροφίμων είναι συνεχώς αυξανόμενο (Hayes et al 2003, Martin et al 2005). Ερευνητές υποστηρίζουν ότι εντερόκοκκοι είναι δυνατό να μεταφέρουν γονίδια μικροβιακής αντοχής από τα τρόφιμα στον άνθρωπο. Έχει αποδειχθεί ότι τα ίδια γονίδια μικροβιακής αντοχής βρέθηκαν σε βακτήρια που απομονώθηκαν από μη παστεριωμένο τυρί και σε βακτήρια που απομονώθηκαν από ανθρώπους (Ogier and Serror 2008).

α) Μετάδοση βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης γάλακτος

Το γάλα αποτελεί σημαντική δεξαμενή παθογόνων παραγόντων, καθώς μπορεί να φιλοξενήσει ποικιλία μικροοργανισμών (Oliver et al 2005). Οι πηγές μόλυνσης του νωπού γάλακτος καθώς και οι μικροβιακοί πληθυσμοί του νωπού γάλακτος αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.4. Στο παρόν κεφάλαιο γίνεται αναφορά σε περιπτώσεις λοιμώξεων του ανθρώπου από βακτήρια προερχόμενα από την κατανάλωση γάλακτος, τα οποία παρουσιάζουν και ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Σύμφωνα με την ομάδα εμπειρογνομόνων της EFSA και όσον αφορά τους βιολογικούς κινδύνους για τα έτη 2007 έως 2012, στην ΕΕ σημειώθηκαν 27 εστίες τροφολοιμώξεων που σχετίζονται με την κατανάλωση νωπού γάλακτος. Από αυτές, 21 συσχετίστηκαν με το *Campylobacter spp.* (κυρίως το είδος *C. jejuni*), 1 με το βακτηριακό γένος *Salmonella typhimurium*, 2 με στελέχη *Escherichia coli* που παράγουν shiga τοξίνη (Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* - STEC), και 3 με τον ιό της κροτωγενούς εγκεφαλίτιδας (Tick-borne encephalitis virus - TBEV). Εντούτοις καμία περίπτωση μετάδοσης του βακτηρίου *L. monocytogenes* από το νωπό γάλα στον άνθρωπο δεν αναφέρθηκε μεταξύ των ετών 2007 και 2012.

Σύμφωνα με την παραπάνω έρευνα, το 85% περίπου των εστιών οφείλεται στο νωπό αγελαδινό γάλα και το υπόλοιπο ποσοστό σε νωπό γάλα αιγών (EFSA 2015b). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το νωπό γάλα γαϊδούρας φαίνεται να είναι απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του (π.χ. κατά του *Clostridium perfringens*, των θετικών στην πηκτάση σταφυλοκόκκων, των μυκήτων, ειδών του γένους *Salmonella* και του είδους *E. coli*) (Šarić et al 2012). Όσον αφορά την κροτωγενή εγκεφαλίτιδα (TBEV) πρέπει να επισημανθεί ότι θεωρείται ως μία από τις συχνότερες και δυνητικά θανατηφόρες ανθρώπινες μολύνσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Αυτή η ζωνοσογόνος λοίμωξη είναι ενδημική στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη και στη Ρωσία (Cisak et al 2010, Hudopisk et al 2013). Η TBEV μεταδίδεται κυρίως στον άνθρωπο μέσω των μολυσμένων κροτώνων και λιγότερο συχνά (αλλά πιο αποτελεσματικά και με μικρότερη περίοδο επώασης) μέσω της κατανάλωσης νωπού γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων από μολυσμένα ζώα και κυρίως μέσω της κατανάλωσης αίγιου γάλακτος και τυριού (Caini et al 2012). Συγκεκριμένα τα κύρια γένη βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά τα οποία μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης γάλακτος παρουσιάζονται παρακάτω:

1. *Staphylococcus aureus*, συμπεριλαμβανομένου του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Αν και ο *S. aureus* είναι τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο, λοιμώξεις μέσω της κατανάλωσης νωπού γάλακτος προκαλούμενες από σταφυλόκοκκους ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη (MRSA) δεν έχουν επιβεβαιωθεί σε χώρες της ΕΕ. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αυξανόμενες αναφορές για την απομόνωση του MRSA από γαλακτοκομικές εκμεταλλεύσεις και από νωπό γάλα δεξαμενών συλλογής σε αρκετά κράτη μέλη της ΕΕ (Gindonis et al 2013, Paterson et al 2013). Σε πρόσφατη μελέτη στη Γερμανία, η παρουσία MRSA σε δείγματα γάλακτος δεξαμενών συλλογής κυμάνθηκε στο 4,4% (Kreausukon et al 2012) και σε μελέτες στη νότια Γερμανία αναφέρθηκε μικρότερο ποσοστό το οποίο ανέρχεται στο 2,2% (Friedrich et al 2011). Ομοίως, μελέτες σε δείγματα γάλακτος εκτροφών στη νοτιοδυτική Γερμανία έδειξαν παρουσία του βακτηρίου σε ποσοστά μεταξύ 5,1 και 16,7% (Spohr et al 2011). Στελέχη MRSA απομονώθηκαν επίσης από δείγματα γάλακτος στο Βέλγιο (Vanderhaeghen et al 2010) και στις ΗΠΑ (Haran et al 2012). Μελέτες της EFSA έδειξαν ότι, μεταξύ των διαφόρων κλάδων της βοοτροφίας, οι εκτροφές μόσχων κρεατοπαραγωγής παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη επιβάρυνση από MRSA. Επιπλέον, το νωπό γάλα και τα παραγόμενα από αυτό γαλακτοκομικά προϊόντα

που ενδέχεται να έχουν μολυνθεί με MRSA θα πρέπει να παρακολουθούνται σε εκείνα τα κράτη μέλη όπου η κατανάλωση αυτών των προϊόντων είναι συχνότερη (Team 2014).

2. Shigatoxin-producing *E. coli* (STEC)

Παρά το γεγονός ότι το εντεροτοξινογόνο στέλεχος STEC O157 αποτελεί τον συνηθέστερο παράγοντα πρόκλησης γαστρεντερικών λοιμώξεων οι οποίες σχετίζονται με την κατανάλωση νωπού γάλακτος σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες (Gillespie et al 2003, Andreoletti et al 2007), οι πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με την εμφάνιση μικροβιακής αντοχής των στελεχών αυτών είναι ελάχιστες. Στις ΗΠΑ, προσδιορίστηκε μικροβιακή αντοχή στελεχών STEC που προκάλεσαν λοιμώξεις σε ανθρώπους μετά από κατανάλωση νωπού αγελαδινού γάλακτος μεταξύ των ετών 2000 και 2009 (Oliver et al 2009) και μελέτη στο Ιράν το 2009 που αφορούσε σε έλεγχο στελεχών STEC προερχόμενα από δείγματα νωπού γάλακτος, απέδειξε ότι το 23,1% αυτών ήταν ανθεκτικά στις τετρακυκλίνες (Mohammadi et al 2013).

3. Βακτήρια που μεταφέρουν γονίδια μικροβιακής αντοχής στις ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBL) / AmpC

Οι ορότυποι *Salmonella* που φέρουν γονίδια ESBL / AmpC και απομονώθηκαν από νωπό γάλα δεξαμενών συλλογής είναι οι *S. newport*, *dublin*, *typhimurium* και *infantis*. Έχουν καταγραφεί στελέχη *Escherichia coli* που μεταφέρουν γονίδια ESBL / AmpC από μόσχους και βοοειδή γαλακτοπαραγωγής στο Ηνωμένο Βασίλειο (Teale et al 2005, Liebana et al 2006) και πιο πρόσφατα από μόσχους κρεοπαραγωγής στην Ολλανδία (Hordijk et al 2013, EFSA 2015b), ενώ σε χαμηλότερα ποσοστά από βοοειδή γαλακτοπαραγωγής (Maran 2012). Επίσης πρόσφατα έχουν αναφερθεί απομονωθέντα στελέχη των βακτηρίων *E. coli* και *klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae* τα οποία φέρουν γονίδια αντοχής τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (beta-lactamase genes, bla genes) σε περιστατικά μαστίτιδας βοοειδών στο Ηνωμένο Βασίλειο (Timofte et al 2014).

4. *Salmonella* spp

Όσον αφορά την εκδήλωση τροφολοιμώξεων που σχετίζονται με την κατανάλωση νωπού γάλακτος στην Αγγλία και την Ουαλία κατά τα έτη 1992 έως 2000, η *Salmonella* spp ενοχοποιήθηκε ως αιτιολογικός παράγοντας για το 35,7% αυτών (Gillespie et al. 2003). Σε όλες τις περιπτώσεις, ο υπεύθυνος ορότυπος ήταν η *S. typhimurium*. Παρότι η ανωτέρω μελέτη δεν περιελάμβανε δοκιμή ευαισθησίας των υπό εξέταση στελεχών, είναι πολύ

πιθανό τα στελέχη αυτά να παρουσίαζαν ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, καθώς κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου πάνω από το 90% των απομονωθέντων στελεχών του βακτηρίου *S. typhimurium* από ανθρώπινες λοιμώξεις στην Αγγλία και την Ουαλία παρουσίασε αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό και πάνω από το 70% των στελεχών ήταν πολυανθεκτικά (παρουσίασαν αντοχή σε τέσσερα ή περισσότερα αντιβιοτικά) (Threlfall et al 1999, Threlfall 2002). Άλλες αναφορές μικροβιακής αντοχής βακτηριακών ειδών του γένους *Salmonella* σχετιζόμενες με την κατανάλωση νωπού αγελαδινού γάλακτος σε άλλες χώρες της ΕΕ δεν υπήρξαν. Στην Αριζόνα και στις ΗΠΑ στην αρχή της δεκαετίας του 1980 παρουσιάστηκαν κρούσματα τροφολοίμωξης προκαλούμενης από κατανάλωση νωπού γάλακτος μολυσμένου με πολυανθεκτικά στελέχη της *S. typhimurium* (Tacket et al 1985). Μία από τις περιπτώσεις αφορούσε ηλικιωμένη γυναίκα η οποία κατέληξε αφού προσβλήθηκε από σαλμονέλα και παρουσίασε εντερίτιδα και σήψη ενώ δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία με χλωραμφενικόλη. Τα απομονωθέντα στελέχη *S. typhimurium* από δείγματα αυτής της ασθενούς, άλλων ασθενών και νωπού γάλακτος παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, τη χλωραμφενικόλη, την καναμυκίνη, τη στρεπτομυκίνη, τις σουλφοναμίδες και τις τετρακυκλίνες. Οι ερευνητές μετά τη μελέτη του ανωτέρω κρούσματος κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στελέχη του γένους *Salmonella* ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα είναι δυνατόν να μεταφερθούν μέσω της κατανάλωσης νωπού γάλακτος από τα ζώα στον άνθρωπο και να οδηγήσουν ορισμένους ξενιστές ακόμη και σε θανατηφόρες λοιμώξεις. Στα πλαίσια των ερευνών του Εθνικού Συστήματος Παρακολούθησης της Υγείας των Ζώων (National Animal Health Monitoring System, NAHMS) των ΗΠΑ, για το χρονικό διάστημα 2002 έως 2007 στελέχη *Salmonella* που απομονώθηκαν από γάλα δεξαμενών συλλογής, αναλύθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί και να διερευνηθεί η μικροβιακή αντοχή ώστε να χαρακτηριστούν περαιτέρω τα ανθεκτικά στελέχη (Van Kessel et al 2013). Προσδιορίστηκε η ευαισθησία σε 15 αντιμικροβιακούς παράγοντες 26 οροτύπων από σύνολο 176 απομονωθέντων στελεχών *Salmonella*. Το 17% αυτών (30 στελέχη) που αντιπροσώπευαν 6 διαφορετικούς οροτύπους της *S. enterica* επέδειξε αντοχή σε τουλάχιστον έναν αντιμικροβιακό παράγοντα. Το 11,4% (20 στελέχη, εκ των οποίων 14 ανήκαν στο είδος *S. newport*, 3 στο είδος *S. dublin*, 2 στο είδος *S. typhimurium* και 1 στο είδος *S. infantis*) εμφάνισε φαινότυπο ανθεκτικό σε πολλαπλά αντιμικροβιακά φάρμακα (multidrug - resistant - MDR), που σημαίνει την παρουσία αντοχής στην αμπικιλίνη, χλωραμφενικόλη, στρεπτομυκίνη, σουλφοναμίδες και τετρακυκλίνες και επιπλέον αντοχή στην αμοξυκιλίλη-κλαβουλανικό οξύ και τις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος. Από αυτές τις μελέτες, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μικρός μεν αλλά σημαντικός κίνδυνος πρόκλησης

λοιμώξεων από είδη *Salmonella spp* μέσω της κατανάλωσης νωπού γάλακτος και των παρασκευαζόμενων από αυτό γαλακτοκομικών προϊόντων στις ΗΠΑ. Αξίζει να σημειωθεί ότι, περιπτώσεις λοιμώξεων μέσω του νωπού γάλακτος ή γαλακτοκομικών προϊόντων, προκαλούμενες από ορότυπους του είδους *S. dublin*, το οποίο είναι το πλέον σύνηθες είδος *Salmonella* που σχετίζεται με λοιμώξεις των βοοειδών, σπάνια έχουν αναφερθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο (Lahuerta et al 2011) ή σε άλλες χώρες της ΕΕ (Rabsch et al 2001). Το γεγονός αυτό δεν είναι πλήρως κατανοητό, αλλά μπορεί να σχετίζεται με την περιορισμένη χρήση αντιβιοτικών στα ενήλικα βοοειδή σε αντίθεση με τους μόσχους σε κάποιες χώρες ή στον αποκλεισμό της λοίμωξης μέσω εισερχόμενων πλασμιδίων που κωδικοποιούν αντιμικροβιακή αντίσταση με μη συμβατούς μηχανισμούς.

5. *Campylobacter spp*

Αν και το βακτήριο *Campylobacter spp* θεωρείται σημαντικός παράγοντας στην πρόκληση λοιμωδών νοσημάτων του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου, οι οποίες σχετίζονται με την κατανάλωση νωπού γάλακτος, οι αναφορές αντιμικροβιακής αντοχής σε απομονωμένα από νωπό γάλα βοοειδών μικροβιακά στελέχη αυτού είναι σπάνιες. Σε χώρες της ΕΕ, σε μελέτη το 2010 σχετικά με την παρουσία βακτηρίων του γένους *Campylobacter* σε 150 δείγματα αγελαδινού γάλακτος που προέρχονταν από επιλεγμένες περιοχές της Πολωνίας, απομονώθηκε το βακτήριο μόνο από επτά (4,6%) δείγματα. Από αυτά δε τα απομονωμένα στελέχη, τα πέντε (71,5%) ήταν ανθεκτικά στη δοξυκυκλίνη και τα έξι (85,8%) στις τετρακυκλίνες και την σιπροφλοξασίνη (Wysok et al 2011). Στην Ιταλία, σε μελέτη το 2012 (Serraino et al 2013), διερευνήθηκε η παρουσία *Campylobacter spp* και *Arcobacter spp* σε αγέλες βουβαλιών γαλακτοπαραγωγής τα οποία εκτρέφονταν με σκοπό την παραγωγή και πώληση νωπού γάλακτος καθώς και η ευαισθησία των απομονωθέντων στελεχών στην σιπροφλοξακίνη, τετρακυκλίνη, χλωραμφενικόλη, αμπικιλλίνη, ερυθρομυκίνη και γενταμυκίνη. Απομονώθηκαν 52 στελέχη από 49 εξετασθέντα δείγματα νωπού γάλακτος που ελήφθησαν από 12 αγροκτήματα (85,7%) (Serraino et al 2013). Από τα στελέχη αυτά τα 16 ταυτοποιήθηκαν ως *Campylobacter spp*, εκ των οποίων 6 ταυτοποιήθηκαν ως *Campylobacter jejuni*, 8 ως *Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis*, 1 ως *Campylobacter concisus* και 1 επίσης ως *Campylobacter fetus subsp. Fetus*. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη *Campylobacter* ήταν ευαίσθητα στα μακρολίδια, τα οποία αποτελούν τα αντιβιοτικά πρώτης επιλογής για τη θεραπεία της καμπυλοβακτηρίωσης όταν αυτή κρίνεται απαραίτητη. Διαπιστώθηκε αντοχή των στελεχών αυτών στις φθοροκινολόνες και τις τετρακυκλίνες, ενώ από τα είδη του γένους *Arcobacter* τα 22 ταυτοποιήθηκαν ως *Arcobacter butzleri* και τα 14 ως *Arcobacter*

cryaerophilus και παρουσίασαν αντοχή στην αμπικιλίνη και την χλωραμφενικόλη. Αν και ο αριθμός των απομονωθέντων στελεχών των οποίων ελέγχθηκε η ευαισθησία σε αντιμικροβιακούς παράγοντες ήταν περιορισμένος, οι ερευνητές δήλωσαν ότι η αυξημένη εμφάνιση *Campylobacter spp.* και *Arcobacter spp.* στις γαλακτοπαραγωγικές εκμεταλλεύσεις, αποτελεί έναν αναδυόμενο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία στην Ιταλία. Άλλες μελέτες κατέδειξαν σημαντικό βαθμό ανθεκτικότητας στελεχών του *Campylobacter jejuni* το οποίο απομονώθηκε από διάφορες πηγές όπως δείγματα ζώων, νωπού γάλακτος και ανθρώπινων κοπράνων, στη σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin) (62,8%), στις τετρακυκλίνες (55,9%) και το ναλιδιξικό οξύ (55,2%) (Di Giannatale et al 2014). Εκτός των χωρών της ΕΕ, κατά τα έτη 2000 και 2003, σε μελέτη στο Κεμπέκ και τον Καναδά, σε δείγματα από διάφορες πηγές απομονώθηκαν στελέχη *C. jejuni* για τα οποία δεν αναφέρθηκε σχεδόν καμία αντοχή στη σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin) (Levesque et al 2007).

6. *Listeria monocytogenes*

Ένα ακόμα βακτήριο που μπορεί να θεωρηθεί ύποπτο και έχει προκαλέσει θανατηφόρες λοιμώξεις στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης νωπού γάλακτος στις ΗΠΑ είναι η *L. Monocytogenes* (Oliver et al. 2009). Μικροβιακή αντοχή στελεχών του βακτηρίου *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από νωπό γάλα σπάνια έχει αναφερθεί σε χώρες της ΕΕ. Σε μελέτη στη Βόρειο Ιρλανδία το 2001, σε σύνολο 45 απομονωθέντων στελεχών των οποίων ελέγχθηκε η ευαισθησία στην αμπικιλίνη, γενταμυκίνη, στρεπτομυκίνη, σουλφοναμίδες, ερυθρομυκίνη, χλωραμφενικόλη, κεφαλοθίνη και τετρακυκλίνες (Harvey and Gilmour 2001), μόνο 2 παρουσίασαν αντοχή στην τετρακυκλίνη. Σε χώρες εκτός της ΕΕ, έχει αναφερθεί μικροβιακή αντοχή στελεχών του εν λόγω βακτηρίου στην τετρακυκλίνη και πενικιλίνη, σε μελέτη που έλαβε χώρα στη Μαλαισία το 2012 (Jamali et al 2013) και πρόσφατα αναφέρθηκε πολλαπλή αντοχή απομονωθέντων στελεχών *Listeria* από νωπό γάλα στη Νιγηρία (Uwanibe et al 2014).

Όσον αφορά στην κατανάλωση νωπού γάλακτος μικρών μηρυκαστικών (αιγοπρόβατα) σε χώρες της ΕΕ, οι μόνες αναφορές αντιμικροβιακής αντοχής αφορούν: α) απομονωθέντα στελέχη *Staphylococcus spp.* στη βόρεια Ιταλία, όπου το 10% αυτών έφερε το γονίδιο αντοχής tet (K) (Ruaro et al 2013), β) στελέχη *E. coli* O157 τα οποία απομονώθηκαν από γάλα αιγών και αγελάδων στην περιοχή της Λομβαρδίας στην Ιταλία (Picozzi et al 2005) και γ) απομονωθέντα στελέχη *E. coli* O157 από γάλα βοοειδών και αιγοπροβάτων στην Ελλάδα το 2009, όπου παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα αντοχής στις τετρακυκλίνες, τη στρεπτομυκίνη και τις σουλφοναμίδες (Solomakos et al 2009). Μόνο ένα στέλεχος MRSA

απομονώθηκε μεταξύ 601 στελεχών *S. aureus* τα οποία απομονώθηκαν από νωπό πρόβειο στην Ισπανία (Ariza-Miguel et al 2014). Τέλος αναφορές μικροβιακής αντοχής σε βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν από νωπό γάλα μόνοπλων και καμήλας στην ΕΕ δεν υπήρξαν.

β) Μετάδοση μικροβιακής αντοχής στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης προϊόντων κρέατος

Βακτηριακά είδη των γενών *Salmonella*, *Campylobacter* και του είδους *E. coli* καθώς και πολυανθεκτικά είδη του γένους *Staphylococcus* έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς διαφορετικούς τύπους προϊόντων κρέατος σε πρατήρια πώλησης, καθώς και σε αγροτικά ζώα και στο περιβάλλον εκτροφής αυτών (Bhargava et al 2011). Η παρουσία του *Enterococcus spp.* στο γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση του κρέατος κατά το στάδιο της σφαγής. Στελέχη αυτού του γένους εκτός από τα νωπά κρέατα, έχουν απομονωθεί επίσης και από μεταποιημένα κρέατα (Franz et al 1999). Τα βακτήρια αυτά είναι από τα πλέον ανθεκτικά στη θερμική επεξεργασία, μη σπορογόνα και ως εκ τούτου η θέρμανση των μεταποιημένων κρεάτων κατά τη διαδικασία της παραγωγής τους δεν επηρεάζει την παρουσία ή απουσία αυτών. Η επιβίωσή τους μετά τη θερμική επεξεργασία, επιτρέπει την εμπλοκή τους στην αλλοίωση των επεξεργασμένων προϊόντων όπως είναι τα κονσερβοποιημένα ζαμπόν και τα γεύματα κρέατος σε πακέτο (Magnus et al 1986). Η αντοχή στην επίδραση της θερμότητας των βακτηρίων *Enterococcus spp* στα προϊόντα αυτά επηρεάζεται από συστατικά όπως το αλάτι, τα νιτρώδη και το είδος του ιστού.

γ) Μετάδοση μικροβιακής αντοχής στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης ιχθύων

Παθογόνα βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά έχουν επίσης απομονωθεί από προϊόντα ιχθύων ή άλλων αλιευμάτων. Για παράδειγμα, παθογόνα βακτήρια ιχθύων του γένους *Aeromonas* με αντοχή στην τριμεθοπρίμη – σουλφαμεθοξαζόλη (SXT) απομονώθηκαν στη Γερμανία (Kadlec et al 2011). Αντοχή στα αντιβιοτικά παθογόνων βακτηρίων των ιχθύων, διαπιστώθηκε επίσης στο είδος *Vibrio parahaemolyticus* το οποίο απομονώθηκε από οστρακοειδή στη Γεωργία και Νότια Καρολίνα (Baker-Austin et al 2008), στην *E. coli* O157: H7 από γαρίδες στα πρατήρια πώλησης στην Ινδία (Surendraraj et al 2010), στα είδη *Vibrio parahaemolyticus* και *V. alginolyticus* από εκτρεφόμενους ιχθύες στην Κορέα (Oh et al 2011) και σε είδη του γένους *Salmonella* από διάφορα αλιεύματα (Khan et al 2009). Η παρατήρηση ότι παρόμοιες ή ακόμη και πανομοιότυπες γονιδιακές αλληλουχίες έχουν ανιχνευθεί από παθογόνα βακτήρια ιχθύων, ανθρώπων, παραγωγικών ζώων,

τροφίμων ζωικής προέλευσης ή / και ζώα συντροφιάς, υποδηλώνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των οικοσυστημάτων σε επίπεδο παρουσίας γονιδίων μικροβιακής αντοχής (Kadlec et al. 2011).

δ) Μετάδοση μικροβιακής αντοχής στον άνθρωπο μέσω των παραγωγικών ζώων και του περιβάλλοντος των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων

Σημαντική ποσότητα αντιβιοτικών ουσιών απεκκρίνεται στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων των ζώων και έχει παρατηρηθεί η εμφάνιση περιβαλλοντικής αντοχής η οποία μπορεί να οδηγήσει στην ευρύτερη διάδοση ανθεκτικών βακτηρίων (Finley et al 2013, Li et al 2013). Τα περιβαλλοντικά βακτήρια που εκτίθενται σε συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών φαρμάκων χαμηλότερες από τις μικροβιοκτόνες, μπορούν να αναπτύξουν αντοχή και μέσω γενετικών μηχανισμών ανταλλαγής, ο φαινότυπος αντοχής διαχέεται βαθμιαία μεταξύ παθογόνων και μη παθογόνων βακτηρίων. Τα ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα βακτήρια που συνδέονται με τα παραγωγικά ζώα διαδίδονται στο περιβάλλον μέσω της τροφικής αλυσίδας, ενώ οι εργαζόμενοι στις κτηνοτροφικές εκτροφές είναι οι φορείς αυτών των βακτηρίων (Alexopoulos et al, Aarestrup et al. 2008, van Cleef et al 2015). Σε μελέτη στις Ηνωμένες Πολιτείες διαπιστώθηκε ότι οι εργαζόμενοι σε εκτροφές πτηνών παρουσίασαν 32 φορές υψηλότερο κίνδυνο να μεταφέρουν ανθεκτικό στη γενταμυκίνη στελεχος της *E. coli* σε σύγκριση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (Price et al 2007). Οι μελέτες σχετικά με τα μη παθογόνα βακτήρια ωστόσο, είναι περιορισμένες και επικεντρώνονται κατά κύριο λόγο στους ευκαιριακά παθογόνους εντερόκοκκους (Cocconcelli et al 2003, Johnston and Jaykus 2004). Η σχέση μεταξύ της χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα και της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στους αντιμικροβιακούς παράγοντες παρατηρήθηκε αρχικά σε στελέχη του βακτηρίου *E. coli* το οποίο απομονώθηκε από τον εντερικό σωλήνα πουλερικών που τους χορηγήθηκε μέσω τροφής στρεπτομυκίνη (Starr and Reynolds 1951). Σε πρόσφατη μελέτη στην οποία συμμετείχαν επτά ευρωπαϊκές χώρες βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των αντιμικροβιακών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν και της εμφάνισης ανθεκτικότητας έναντι αυτών, στελεχών της *E. coli* τα οποία απομονώθηκαν από χοίρους, πουλερικά και βοοειδή (Chantziaras et al 2013). Έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές η ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής σε πολλαπλά αντιμικροβιακά φάρμακα στελεχών *E. coli* και *Salmonella* τα οποία απομονώθηκαν από χοίρους που τρέφονταν με ζωοτροφές που περιείχαν αυτούς τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Rajić et al 2004, Varga et al 2009, Burow et al 2014). Η μείωση της χρήσης της τυλοσίνης κατά τα έτη 1998 και 1999 ακολούθησε μείωση της αντοχής στην ερυθρομυκίνη απομονωθέντων στελεχών *E.*

faecium και *E. faecalis* από χοίρους. Η αυξημένη εμφάνιση μικροβιακής αντοχής στη βιργινιαμυκίνη (virginiamycin) στελεχών *E. faecium* τα οποία απομονώθηκαν από κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής συσχετίστηκε με την αυξημένη χρήση της βιργινιαμυκίνης κατά την περίοδο 1995-1997 στη Δανία και η επακόλουθη απαγόρευση της χρήσης βιργινιαμυκίνης το 1998, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση αυτής της αντοχής (Aarestrup et al 2001). Άλλα γένη σημαντικών παθογόνων που χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής και σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής στα αντιμικροβιακά φάρμακα είναι τα *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter spp*, *Salmonella spp* και *Shigella spp*. Έρευνες κατέγραψαν μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της χρήσης υποθεραπευτικών συγκεντρώσεων τετρακυκλίνης, ή συνδυασμού αυτής με σουλφαμεθαζίνη και της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών του *Campylobacter spp* σε κρεοπαραγωγά βοοειδή (Inglis et al 2005). Πολλές επιστημονικές μελέτες επίσης απέδειξαν την ύπαρξη ισχυρής σχέσης μεταξύ της χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων, είτε ως αυξητικών παραγόντων (AGP), είτε ως μέσων θεραπείας λοιμώξεων των παραγωγικών ζώων και πτηνών και της ανάπτυξης του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής μεταξύ συγγενών βακτηριακών γενών (Levy et al 1976, Endtz et al 1991, Bager et al 1997). Τα παραγωγικά ζώα καθώς και οι εργαζόμενοι σε εκμεταλλεύσεις που χρησιμοποιούν AGP αποικίζονται από περισσότερα βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά σε σύγκριση με τα ζώα και τους εργαζομένους εκτροφών στις οποίες δεν χρησιμοποιούνται αυξητικοί παράγοντες (Marshall and Levy 2011). Η ευρεία χρήση των κινολονών και τρίτης και τέταρτης γενιάς κεφαλοσπορινών στην κτηνοτροφία αλλά και στην ιατρική για τη θεραπεία της σαλμονέλλωσης του ανθρώπου, οδήγησε στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών σε ανθρώπους τα οποία ενδέχεται να θέσουν σε κίνδυνο την κλινική εφαρμογή τους. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η ευρεία χρήση των μακρολιδίων στα παραγωγικά ζώα, οδήγησε στην επιλογή ανθεκτικών σε μακρολίδια στελεχών του βακτηριακού γένους *Campylobacter spp*. Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία των μακρολιδίων στη θεραπεία λοιμώξεων παιδιών από το *Campylobacter spp*, η συνέχιση της χρήσης αυτών των αντιμικροβιακών στα παραγωγικά ζώα χρήζει κριτική επανεξέταση. Η χρήση αντιμικροβιακών στα παραγωγικά ζώα, συσχετίζεται όχι μόνο με την εμφάνιση του φαινομένου της πολυανθεκτικότητας αλλά και με την εξάπλωση λοιμωδών νοσημάτων του ανθρώπου των οποίων η αποτελεσματική θεραπεία και εκρίζωση δεν είναι πλέον δυνατή (Witte 2000, Hershberger et al 2005, Silbergeld et al 2008, Marshall and Levy 2011). Σύμφωνα με τις πολιτικές πρακτικές που εφαρμόζονται στην Ευρώπη, οι οποίες απαγορεύουν τη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων για μη θεραπευτικούς σκοπούς στη γεωργία (π.χ. αβοπαρκίνη και βιργινιαμυκίνη), έχουν οδηγήσει στον περιορισμό του

φαινομένου της μικροβιακής αντοχής, καθώς και στην μείωση των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MICs) αντιμικροβιακών όπως η βανκομυκίνη (Silbergeld et al. 2008, Marshall and Levy 2011). Μελέτη της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) και του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (EMA) σχετικά με τον αντίκτυπο των μέτρων που ελήφθησαν για τη μείωση της χρήσης αντιμικροβιακών στα παραγωγικά ζώα και τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης συμπέρανε το συσχετισμό μεταξύ της μείωσης της χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων και του περιορισμού του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής. Έχει προταθεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση με τη συμμετοχή πολλών ενδιαφερομένων φορέων για τη μείωση της χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων στα ζώα, με την εφαρμογή καλύτερων πρακτικών διαχείρισης των εκτροφών με σκοπό την πρόληψη και τον περιορισμό των λοιμωδών νοσημάτων των ζώων και την αναζήτηση εναλλακτικών πρακτικών όπως ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός παθογόνων παραγόντων, η χρήση ανοσοδιεγερτικών, προβιοτικών και βακτηριοφάγων, ο περιορισμός της χρήσης αντιμικροβιακών στην πρόληψη νοσημάτων κλπ. (Murphy et al 2017).

2.4. ΓΑΛΑ – ΜΑΣΤΙΤΙΔΕΣ - ANTIBIOTIKA

2. 4.1. Γενικά για το γάλα

Γάλα είναι το έκκριμα του μαστικού αδένου των θηλαστικών που προορίζεται για τη διατροφή του νεογέννητου για το οποίο αποτελεί τη μοναδική τροφή μέχρι ορισμένη ηλικία. Για τον άνθρωπο όμως, το γάλα εξακολουθεί να αποτελεί μέρος της καθημερινής διατροφής του, είτε αυτούσιο, είτε με τη μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων (τυρί, βούτυρο, γιαούρτη) για όλη τη διάρκεια της ζωής του.

Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, ορίζει ότι «γάλα είναι το απηλλαγμένο πρωτογάλακτος προϊόν της ολοσχερούς, άνευ διακοπής αμέλξεως υγιώς έχοντος γαλακτοφόρου ζώου, διαβιούντος και διατρεφομένου υπό υγιεινούς όρους και μη ευρισκομένου εις κατάστασιν υπερκοπώσεως».

Όταν η λέξη γάλα δεν συνοδεύεται από κάποιο επίθετο που να δηλώνει την προέλευσή του, εννοείται ότι το γάλα είναι αγελαδινό. Όταν όμως προέρχεται από άλλο ζώο, υποχρεωτικά πρέπει να συνοδεύεται από λέξεις που να δηλώνουν την προέλευσή του (πρόβειο, γίδινο, βουβαλίσιο, κ.λπ.). Παραπλήσιοι ορισμοί για το γάλα δίδονται και στις νομοθεσίες άλλων χωρών.

Σύμφωνα με ορισμό των οργανισμών FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας του Ο.Η.Ε) / WHO (Fao 1961),

«γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται από μία ή δύο αμέλξεις χωρίς να προστεθεί ή ν' αφαιρεθεί τίποτε».

Ο Κώδικας γάλακτος των Η.Π.Α., ορίζει ως γάλα το «έκκριμα του μαστού το οποίο είναι απαλλαγμένο από πρωτόγαλα, παίρνεται με άμελξη μιας ή περισσότερων υγιών αγελάδων και το οποίο περιέχει τουλάχιστον 3,15% λίπος και 8,25% στερεά συστατικά άνευ λίπους» (Ordinance 1953).

Από ιστορική άποψη δεν είναι γνωστό πότε ο άνθρωπος χρησιμοποίησε για πρώτη φορά το γάλα των ζώων ως τροφή. Από κείμενα των Σουμέριων προκύπτει ότι ήδη και πριν το 6.000 π.Χ. ο άνθρωπος εκμεταλλευόταν το γάλα των ζώων, ενώ στη Βίβλο η «Γη της Επαγγελίας» είναι η γη στην οποία «ρέει μέλι και γάλα» (Lampert 1970).

Φαίνεται ότι η χρησιμοποίηση του γάλακτος των γαλακτοπαραγωγών ζώων στη διατροφή του ανθρώπου, άρχισε ταυτόχρονα σχεδόν με την εξημέρωσή τους. Από τους χρόνους εκείνους (προϊστορία) πρέπει επίσης ο άνθρωπος να πέτυχε και την παρασκευή ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως του βουτύρου, του ξινογάλακτος, της γιαούρτης και των τυριών.

Η αξιοποίηση όμως του γάλακτος και η μεταποίησή του σε άλλα προϊόντα γινόταν για χιλιετίες με εμπειρικές μεθόδους στα πλαίσια της οικογενειακής οικονομίας.

Η γαλακτοκομία άρχισε να αναπτύσσεται ως επιστήμη μετά τον 13^ο αιώνα και ειδικότερα μετά τον 19^ο, όταν άρχισαν να αναπτύσσονται και οι άλλες θετικές επιστήμες και κυρίως η Χημεία, η Βιοχημεία και η Μικροβιολογία. Τον 20^ο όμως αιώνα η Γαλακτοκομία σημειώνει, από τεχνολογική άποψη, αλματώδη εξέλιξη. Παράλληλα αυξάνεται και η παραγωγή του γάλακτος, ως συνέπεια της ανάπτυξης της επιστήμης της Ζωοτεχνίας.

Οι χώρες της Ε.Ε. παράγουν το 1/4 περίπου της παγκόσμιας ποσότητας γάλακτος. Η μεγάλη αυτή παραγωγή έχει οδηγήσει σε σημαντικό πλεόνασμα γαλακτοκομικών προϊόντων, η στήριξη της τιμής των οποίων επιβαρύνει σημαντικά τον Κοινοτικό Προϋπολογισμό.

Η χώρα μας, παρά το γεγονός ότι πέτυχε μεταξύ των ετών 1955 και 1983 αύξηση της παραγωγής συνολικού γάλακτος κατά 112% περίπου, είναι ελλειμματική σε γαλακτοκομικά προϊόντα και εισάγει κυρίως γάλα συμπυκνωμένο, γαλακτόσκονη, τυρί και βούτυρο, σε ποσότητα που αναλογεί στο 30% περίπου της εθνικής παραγωγής συνολικού γάλακτος (Μάντης 2005).

Απαιτείται συνεπώς ενίσχυση των εθνικών προγραμμάτων αύξησης της παραγωγής, τόσο του αγελαδινού, όσο και του αιγοπρόβειου γάλακτος, με παράλληλη βελτίωση της υγιεινής στάθμης και της ποιότητάς του.

Η έρευνα που αφορά στην ποιότητα του γάλακτος των μικρών μηρυκαστικών (αίγες- πρόβατα) είναι ελάχιστη συγκριτικά με εκείνη που έχει γίνει για το γάλα των αγελάδων. Αυτό ήταν απόρροια του γεγονότος ότι παλαιότερα τα μικρά μηρυκαστικά θεωρούνταν ως μια μικρογραφία της αγελάδας, πέρα για πέρα εσφαλμένη ή υπεραπλουστευμένη αντίληψη, αν κανείς λάβει υπ' όψη τη διαφορετικότητα στην ανατομία, τη φυσιολογία, τη διατροφή και την παθολογία ανάμεσα σ' αυτά τα ζώα (Haenlein 2001).

2.4.1.1. Χημική σύσταση γάλακτος

2.4.1.1.1. Χημική σύσταση του γάλακτος αγελάδας

α) Λίπος

Το λίπος του γάλακτος αποτελείται σε ποσοστό 98-99% από τριγλυκερίδια. Το υπόλοιπο ποσοστό του λίπους αποτελούν διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, φωσφολιποειδή, καροτινοειδή και οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E και K (Haug et al 2007).

β) Πρωτεΐνες

Το πρωτεϊνικό κλάσμα του γάλακτος αποτελείται από ετερογενές μίγμα πρωτεϊνών. Από το γάλα είναι δυνατόν να απομονωθούν τρία κυρίως κλάσματα, η καζεΐνη, η γαλακταλβουμίνη και η γαλακτογλοβουλίνη. Τα κλάσματα αυτά αρχικά θεωρήθηκαν ως καθαρές πρωτεΐνες. Νεότερες μέθοδοι εξέτασης των παραπάνω κλασμάτων έδειξαν ότι το καθένα από αυτά αποτελείται από περισσότερες πρωτεΐνες. Εκτός από τα τρία παραπάνω πρωτεϊνικά κλάσματα, στο γάλα απαντούν και άλλες αζωτούχες ενώσεις (μη πρωτεϊνικό άζωτο 5%) π.χ. κρεατίνη, κρεατινίνη, ουρία, αμινοξέα, αμμωνία κ.τ.λ.

γ) Υδατάνθρακες - Λακτόζη

Η λακτόζη ή γαλακτοσάκχαρο είναι το κύριο σάκχαρο που απαντά στο γάλα των θηλαστικών και αποτελείται από 1 μόριο γαλακτόζης και 1 μόριο γλυκόζης. Η περιεκτικότητα της λακτόζης στο γάλα ποικίλλει από 1,0% (στο γάλα του ποντικού) μέχρι 7,0% (στο γάλα της γυναίκας). Η λακτόζη απαντά σε δύο ισομερείς μορφές, την α- και β- λακτόζη. Οι δύο αυτές μορφές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη γλυκύτητα και τις άλλες φυσικές ιδιότητες (στροφική ικανότητα, διαλυτότητα κ.τ.λ.).

δ) Ένζυμα

Τα ένζυμα στο γάλα απαντούν, είτε ελεύθερα ως πρωτεΐνες, είτε δεσμευμένα σε σύμπλοκα όπως τις λιποπρωτεΐνες. Από αυτά τα σπουδαιότερα είναι: η αλκαλική φωσφατάση, η λιπάση και η πρωτεάση.

ε) Ανόργανα συστατικά και τέφρα

Η τέφρα αποτελείται από τα οξείδια του Na, K, Ca, Mg, Fe, P και S. Τα ανόργανα άλατα είναι τα φωσφορικά, χλωριούχα, κιτρικά καθώς και εκείνα του K, Na, Ca, Mg.

στ) Βιταμίνες

Οι μεν λιποδιαλυτές βιταμίνες είναι συστατικά του λίπους στο γάλα (A, D, E, K), ενώ η βιταμίνες B και C απαντούν στην υδατική φάση του γάλακτος (Meurant 1995).

2.4.1.1.2. Χημική σύσταση γάλακτος προβάτου

Όσα αναφέρθηκαν στα προηγούμενα για τη σύσταση του γάλακτος της αγελάδας, ισχύουν σε μεγάλο ποσοστό και για το γάλα των άλλων ειδών ζώων και κυρίως των μηρυκαστικών. Όμως υπάρχουν σημαντικές διαφορές ιδιαίτερα ως προς την εκατοστιαία αναλογία των βασικών συστατικών μεταξύ του γάλακτος των διαφόρων ειδών ζώων.

Σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα, το πρόβειο είναι πλουσιότερο σε στερεά συστατικά, αλλά η εκατοστιαία αναλογία των συστατικών του παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις ανάλογα με τη φυλή, τη γαλακτική περίοδο και τη διατροφή. Η σύσταση του πρόβειου γάλακτος κατά την διάρκεια της γαλακτικής περιόδου παρουσιάζει αξιόλογη διακύμανση στην εκατοστιαία αναλογία ιδιαίτερα του λίπους και των πρωτεϊνών. Το λίπος παρουσιάζει σχετική μείωση μέχρι την 3η εβδομάδα και στη συνέχεια αυξάνεται. Κατά τη μετάβαση όμως από τα 3 στα 2 αρμέγματα ανά 24ωρο, παρατηρείται απότομη πτώση της λιποπεριεκτικότητάς του (2-3%) και απαιτούνται 3-4 εβδομάδες για να ανέλθει και πάλι στα προηγούμενα επίπεδα (Meurant 1995).

Την ίδια πορεία δείχνει και το κλάσμα των συνολικών στερεών, ενώ οι πρωτεΐνες (ολικό άζωτο) ύστερα από μια μικρή μείωση κατά την 1η – 3η εβδομάδα, αυξάνονται στα κανονικά τους επίπεδα (5,5-6,5%) για να παραμείνουν σχεδόν σταθερές για την υπόλοιπη γαλακτική περίοδο. Η λακτόζη, μετά από μια μικρή άνοδο στην αρχή της γαλακτικής περιόδου (2η εβδομάδα) μειώνεται ελαφρά και παραμένει σταθερή σε όλη την υπόλοιπη περίοδο. Το πρόβειο γάλα είναι πλουσιότερο σε πρωτεΐνες και λίπος σε σχέση με το αγελαδινό ενώ στα υπόλοιπα συστατικά δεν υπάρχουν ουδιώσεις διαφορές. Έτσι το πρόβειο αποδίδει περισσότερο κατά την τυροκόμηση και παράγει γιαούρτη με μεγαλύτερο ιξώδες.

2.4.2. Το γάλα ως τρόφιμο

Το γάλα έχει σημαντική συνεισφορά στη διαίτα του ανθρώπου σε διαφορετικές χώρες από αρχαιοτάτων χρόνων. Αποτελεί τη μοναδική και πλήρη τροφή κατά τα πρώτα στάδια της ζωής του νεογέννητου των θηλαστικών. Στον άνθρωπο, μετά από τους πρώτους μήνες της ζωής του, δεν επαρκεί για να καλύψει όλες τις ανάγκες του σε θρεπτικά συστατικά. Όμως αποτελεί μία άριστη τροφή και μία από τις σημαντικότερες πηγές πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, ασβεστίου, φωσφόρου, καθώς και ορισμένων βιταμινών (Alais and Blanc 1975). Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντικά στη διατροφή του ανθρώπου, λόγω του ότι αποτελούν πηγή πολλών σημαντικών θρεπτικών συστατικών όπως πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες, βιταμίνες και ανόργανα άλατα (van Hooijdonk and Hettinga 2015). Σημαντικό ποσοστό στην παγκόσμια παραγωγή γάλακτος αντιπροσωπεύει το γάλα των μηρυκαστικών και συγκεκριμένα των βοοειδών (85,4%), βουβαλιών (11,1%), αιγών (2,1%), προβάτων (1,4%) και καμήλων (0,2%) (Gerosa and Skoet 2012), ενώ η παραγωγή γάλακτος άλλων ειδών ζώων όπως άλογα και όνοι εκτιμάται ότι είναι μικρότερη από το 0,1% της παγκόσμιας παραγωγής γάλακτος. Η συνολική κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων είναι υψηλή και αυξάνεται στα περισσότερα κράτη παγκοσμίως, ιδίως στις αναπτυσσόμενες χώρες (Kearney 2010, Gerosa and Skoet 2012). Η κατανάλωση γάλακτος σε βιομηχανικές χώρες σταθεροποιήθηκε με πτωτικές τάσεις όμως τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς η ζήτησή του μειώθηκε επειδή οι καταναλωτές αγοράζουν αθρακούχα αναψυκτικά και χυμούς. Διαφαίνεται ότι δεν θα υπάρξουν αισθητές αλλαγές στην κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων (βούτυρο και τυρί) σε παγκόσμιο επίπεδο στο μέλλον. Η τάση αυτή ανταποκρίνεται στις αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών για υγιεινότερα και πιο φυσικά ζωικά προϊόντα (Egger-Danner et al 2015). Ένα από τα προϊόντα που χαρακτηρίζονται ως «υγιεινά τρόφιμα – health food» είναι το νωπό, μη παστεριωμένο γάλα. Το νωπό γάλα ορίζεται από τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης ως: "το έκκριμα του μαστικού αδένου των εκτρεφόμενων ζώων το οποίο δεν έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία άνω των 40°C ή που δεν έχει υποστεί οποιαδήποτε επεξεργασία ισοδύναμου αποτελέσματος" (Regulation EC 2004). Σήμερα η κατανάλωση νωπού γάλακτος στον γενικό πληθυσμό είναι μάλλον χαμηλή, ενώ παρουσιάζεται αυξημένη στις περιπτώσεις καταναλωτών οι οποίοι επιθυμούν να καταναλώνουν φυσικά μη επεξεργασμένα τρόφιμα και πιστεύουν ότι το νωπό, μη παστεριωμένο γάλα χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερες ιδιότητες, μειωμένες πιθανότητες πρόκλησης αλλεργιών, αυξημένη θρεπτική αξία και καλύτερη γεύση (Oliver et al. 2009, Claeys et al 2014). Η προσέγγιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την

κατανάλωση γάλακτος από άτομα με ιδιαίτερες διατροφικές απαιτήσεις, όπως ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς, άτομα με ειδικές διατροφικές ανάγκες και συνήθειες καθώς και από άτομα τρίτης ηλικίας και παιδιά. Στην Ευρώπη, το νωπό γάλα μπορεί να διατίθεται στον καταναλωτή με πολλούς τρόπους μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται η άμεση πώληση στους καταναλωτές στο αγρόκτημα και η πώληση μέσω αυτόματων μηχανημάτων. Στη Γερμανία, τη Γαλλία, το Βέλγιο, τη Δανία, την Ιταλία την Ιρλανδία και σε κάποιες περιοχές του Ηνωμένου Βασιλείου, το νωπό αγελαδινό γάλα είναι δυνατόν να φτάσει στον καταναλωτή με άμεση αγορά από αγροκτήματα, ενώ στην Πολωνία, την Ισπανία και τη Νορβηγία η παραπάνω διαδικασία απαγορεύεται. Η πώληση μέσω μηχανών αυτόματης πώλησης δεν εφαρμόζεται ή απαγορεύεται στη Δανία, την Ιρλανδία, την Ελλάδα, την Ισπανία, την Ολλανδία και το Ηνωμένο Βασίλειο (EFSA 2015b). Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής η άμεση πώληση γάλακτος, ή η αγορά του μέσω προγραμμάτων χρηματοδοτικής μίσθωσης και η πώλησή του ως "ζωοτροφή ή τροφή για ζώα συντροφιάς" χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα για την προμήθεια νωπού γάλακτος από τους καταναλωτές (Oliver et al. 2009). Το ενδιαφέρον για κατανάλωση νωπού μη παστεριωμένου γάλακτος ή προϊόντων που παρασκευάζονται από αυτό, συνεχώς αυξάνεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (EFSA 2015b) και στις Ηνωμένες Πολιτείες, παρά το γεγονός ότι η πρακτική αυτή ενέχει μικροβιολογικούς κινδύνους οι οποίοι σχετίζονται με την υγεία του καταναλωτή. Πολλές έρευνες κατέγραψαν την παρουσία τροφιμογενών παθογόνων σε νωπό γάλα από δεξαμενές συγκέντρωσης καθώς και την πρόκληση επιδημιών στον άνθρωπο, μέσω της κατανάλωσης νωπού γάλακτος, οφειλόμενων στα βακτηριακά γένη και είδη όπως *Campylobacter*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* και STEC), επισημαίνοντας τις απειλές για την ανθρώπινη υγεία που προκαλεί η κατανάλωση νωπού γάλακτος και των παραγόμενων από αυτό γαλακτοκομικών προϊόντων.

2.4.3. Η προέλευση των μικροοργανισμών που απαντούν στο γάλα

Η μεγάλη βιολογική αξία του γάλακτος ως τροφής, που αποδεικνύεται από το γεγονός ότι αποτελεί τη μοναδική τροφή για την ανάπτυξη των νεογνών αλλά και των νεαρών ζώων, είναι η αιτία για την απρόσκοπτη ανάπτυξη σ' αυτό διαφόρων μικροοργανισμών. Επομένως, όταν υπάρχουν ευνοϊκές συνθήκες, κυρίως θερμοκρασίας, σε σύντομο χρονικό διάστημα τα συστατικά του αλλοιώνονται σε βαθμό που η παραγωγή προϊόντων ποιότητας είναι αδύνατη.

Δεδομένου ότι, όπως και για κάθε άλλο προϊόν η ποιότητα της πρώτης ύλης αποτελεί βασική προϋπόθεση επιτυχίας, απαιτείται καλή γνώση: 1) των πηγών μόλυνσής του, 2) των τρόπων προστασίας και 3) των ειδών των μικροοργανισμών και των ιδιοτήτων τους. Το γάλα θεωρείται στείρο καθώς εκκρίνεται στις κυψελίδες του μαστού (Tolle 1980). Ωστόσο, η υψηλή περιεκτικότητά του σε ποικίλα θρεπτικά συστατικά και νερού σε συνδυασμό με το σχεδόν ουδέτερο pH, το καθιστούν άριστο μέσο ανάπτυξης πολλών μικροοργανισμών (Quigley et al 2013). Η μικροβιακή μόλυνση του γάλακτος μπορεί να συμβεί από τρεις κύριες πηγές: α) από το μαστό του ζώου, β) από το εξωτερικό του μαστού και γ) από τις επιφάνειες και τον εξοπλισμό κατά το χειρισμό από τους παραγωγούς και τους χειρισμούς κατά την αποθήκευσή του (Murphy and Boor 2000, Skoufos et al 2006)).

Η ενδογενής μόλυνση του γάλακτος μπορεί να οφείλεται σε συστηματικές λοιμώξεις των γαλακτοπαραγωγών ζώων ή σε εντοπισμένες λοιμώξεις όπως η μαστίτιδα, φλεγμονή του μαστικού αδένου. Το γάλα που παράγεται από ζώα που παρουσιάζουν κλινική μαστίτιδα έχει συνήθως αλλοιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (μπορεί να περιέχει πήγματα ή αίμα ή μπορεί ακόμη να παρουσιάζει αλλαγές του χρώματος) και συνεπώς αυτό το προϊόν είναι ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση. Από την άλλη πλευρά, το γάλα από ζώα με υποκλινική μαστίτιδα δεν παρουσιάζει οργανοληπτικές διαφορές σε σχέση με εκείνο που παράγεται από ζώα που δεν νοσούν και στην περίπτωση που αναμειχθεί στις δεξαμενές συγκέντρωσης των εκτροφών, εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα και αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία (EFSA 2015b). Η μαστίτιδα είναι δυνατό να προκληθεί από περισσότερους από 150 διαφορετικούς μικροοργανισμούς, στους οποίους περιλαμβάνονται βακτηρίδια, μυκοπλάσματα και ζυμομύκητες (Kuang et al 2009). Μερικά από τα τροφιμογενή παθογόνα, τα οποία αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες μαστίτιδας εκκρίνονται απευθείας στο γάλα.

Τα περισσότερα τροφιμογενή παθογόνα όπως η *Salmonella*, το *Campylobacter* και η STEC δεν απομονώνονται συχνά από το μαστιτικό γάλα, αν και βρίσκονται στον γαστρεντερικό σωλήνα των μηρυκαστικών. Η παρουσία τέτοιων βακτηρίων σε νωπό γάλα προερχόμενο από δεξαμενές συγκέντρωσης φαίνεται να προκύπτει από κοπρανώδη μόλυνση που λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία του αρμέγματος (Oliver et al. 2005). Για παράδειγμα, μελέτη που εκπονήθηκε από ορισμένους ερευνητές (Beutin and Martin 2012) έδειξε ότι το μικροβιακό προφίλ και οι ορότυποι της εντεροτοξινογόνου *E. coli* (STEC) ήταν αξιοσημείωτα παρόμοια με τα αντίστοιχα που απομονώθηκαν από τα κόπρανα αυτών των ζώων. Οι ερευνητές αυτοί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα παραγωγικά ζώα αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή STEC στην τροφική αλυσίδα.

Επιπλέον, η μικροβιακή μόλυνση του νωπού γάλακτος μπορεί επίσης να προκληθεί μέσω των μολυσμένων αρμεκτικών μηχανών ή των χεριών των αρμεκτών και λόγω κακών συνθηκών χειρισμού και αποθήκευσης του γάλακτος πριν από την κατανάλωση. Γενικά, εάν δεν υπάρχει ενδομαστική λοίμωξη ή συστηματική ασθένεια του ζώου, το γάλα στον μαστικό αδένα στο σημείο της παραγωγής του, δεν πρέπει να περιέχει μικροοργανισμούς ή τοξίνες τους. Ωστόσο, παρά τις προσπάθειες ελαχιστοποίησης της εμφάνισης παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο νωπό γάλα, δεν είναι δυνατόν αυτοί να εξαλειφθούν εξ ολοκλήρου (Murphy and Boor 2000, EFSA 2015b). Έχει δηλωθεί ότι όλοι οι παράγοντες, δηλαδή η υγεία και η υγιεινή του ζώου, το περιβάλλον της εκμετάλλευσης, οι διαδικασίες που ακολουθούνται για τον καθαρισμό και την εξυγίανση του εξοπλισμού αρμέγματος, η θερμοκρασία και η διάρκεια αποθήκευσης επηρεάζουν το επίπεδο της μικροβιακής μόλυνσης και τα είδη των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο νωπό γάλα.

Στη μικροβιακή χλωρίδα των γαλακτοπαραγωγών ζώων, συνήθως κυριαρχούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), τα οποία περιλαμβάνουν τα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* και *Enterococcus*. Το γάλα ως πηγή παθογόνων μικροοργανισμών του ανθρώπου εξετάστηκε από τους Quigley et al. 2013. Παθογόνα βακτήρια που κυριαρχούν στο νωπό γάλα, τα οποία δυνητικά μεταδίδονται στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης αυτού και μπορεί να αποτελέσουν αιτία σοβαρών τροφολοιμώξεων περιλαμβάνουν τα γένη: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus suis subsp. zooepidemicus* και τα παράσιτα *Toxoplasma gondii* και *Cryptosporidium parvum* (Oliver et al. 2005). Μεγάλη συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης νωπού γάλακτος και ανθρώπινων λοιμώξεων βρέθηκε επίσης στην περίπτωση των βακτηρίων των γενών *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, STEC, *Brucella melitensis*, *Mycobacterium bovis* και TBEV. Άλλοι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από νωπό γάλα ανήκουν στην οικογένεια των εντεροβακτηριακών, στο γένος *Micrococcaceae*, στις ζύμες και τους ζυμομύκητες (Lagneau et al 1996, Fotou et al 2011, Bezirtzoglou et al 2013, Quigley et al. 2013). Οι ζύμες που έχουν ταυτοποιηθεί στο νωπό γάλα από υγιή ζώα ή από ζώα που παρουσίασαν μαστίτιδα περιλαμβάνουν τα γένη *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon* και *Cryptococcus*. Οι μύκητες συνήθως υπάρχουν στο νωπό γάλα σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους ζυμομύκητες και τα κυρίαρχα γένη αυτών, τα οποία απομονώνονται συχνότερα είναι τα: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* και *Cladosporium*

(Malinowski et al 2001, Delavenne et al 2011, Lavoie et al 2012, Ksouri et al 2015). Ένας ακόμη σημαντικός μικροοργανισμός προερχόμενος από το νοπό γάλα ανήκει στο γένος *Prototheca*. Σε πρόσφατη μελέτη είδη αυτού του γένους (*P. zopfii*, *P. blaschkeae*, *P. stagnora* και *P. wickerhamii*) απομονώθηκαν σε ποσοστό 29% σε σύνολο 200 εξετασθέντων δειγμάτων νοπού γάλακτος και σε ποσοστό 55% σε σύνολο 100 δειγμάτων τυριού. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα είδη του γένους *Prototheca spp.* και κυρίως το *P. zopfii*, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στα περισσότερα αντιβιοτικά (AbdelHameed 2016). Όσον αφορά στους βιολογικούς κινδύνους στο σύνολό τους στην ΕΕ, η ομάδα εμπειρογνομών της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), πρόσφατα προσδιόρισε στους κύριους μικροβιολογικούς κινδύνους που σχετίζονται με την κατανάλωση γάλακτος διαφορετικών ειδών ζώων και τη δημόσια υγεία στην ΕΕ (EFSA 2015b). Η παρουσία αυτών των παθογόνων μικροοργανισμών που ταυτοποιήθηκαν από δείγματα νοπού γάλακτος διαφορετικών ειδών ζώων παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8: Μικροβιολογικοί κίνδυνοι που ανευρίσκονται στο νοπό γάλα διαφόρων ειδών ζώων, οι οποίοι είναι δυνατό να μεταφερθούν στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης αυτού (Zastempowska et al 2016).

Microbiological hazards	Animal species	Reference
<i>Brucella melitensis</i>	goat	Ramos et al. (2008)
<i>Campylobacter</i> spp. (thermophilic)	cow	Bianchi et al. (2013) Jay-Russell et al. (2013)*
	goat	Harris et al. (1987)*
	sheep	FSA (1999)
<i>Mycobacterium bovis</i>	cow	Doran et al. (2009)* Passchyn et al. (2012)
	cow	Bianchi et al. (2013) Tacket et al. (1985)*
<i>Salmonella</i> spp.	sheep	Fotou et al. (2011)
	camel	Abeer et al. (2012) Al-Tofaily and Al rodhan (2011)
	cow	Martin and Beutin (2011) Solomakos et al. (2009)
Shigatoxin-producing <i>E. coli</i> (STEC)	goat	Bielaszewska et al. (1997)* FSA (1999) Martin and Beutin (2011) Solomakos et al. (2009)
	sheep	Martin and Beutin (2011) Solomakos et al. (2009)
	buffalo	Şeker and Yardimci (2008)
	camel	Abeer et al. (2012)
	cow	Caini et al. (2012)* Cisak et al. (2010)
Tick-borne encephalitis virus (TBEV)	goat	Cisak et al. (2010) Hudopisk et al. (2013)* Kohl et al. (1996)* Matuszczyk et al. (1997)*
	sheep	Cisak et al. (2010)

2.4.4. Μαστίτιδες – Αντιβιοτικά

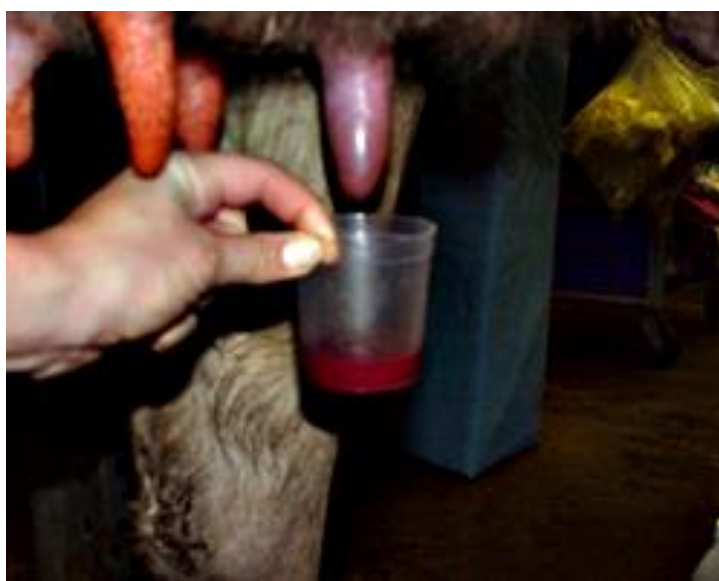
Σε όλες τις χώρες του κόσμου, ζώα υποφέρουν από μαστίτιδες, ενώ εκείνο που διαφέρει είναι οι μορφές και το ποσοστό προσβολής τους.

Μαστίτιδα είναι η φλεγμονή του μαστικού αδένου, η οποία οφείλεται σε διάφορους αιτιολογικούς παράγοντες και χαρακτηρίζεται από αύξηση των λευκοκυττάρων στο γάλα και από παθολογικές αλλαγές στο μαστικό ιστό. Η μαστίτιδα παρατηρείται σε όλα τα είδη θηλαστικών ζώων και έχει σημαντικές οικονομικές συνέπειες. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η μαστίτιδα είναι το αποτέλεσμα της εισόδου βακτηρίων στο μαστικό αδένου από τη θηλή του. Εάν το εσωτερικό περιβάλλον του μαστικού αδένου είναι ευνοϊκό, τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται, “ερεθίζουν” το μαστικό ιστό και επακολουθεί

φλεγμονώδης αντίδραση. Η μαστίτιδα είναι η πιο σημαντική ασθένεια του μαστικού αδένος (Fthenakis 1994).

2.4.4.1. Κλινική εκδήλωση Μαστίτιδας

Στις προβατίνες παρουσιάζεται κλινική μαστίτιδα η οποία εμφανίζεται με ποικιλία κλινικών συμπτωμάτων (εικόνα 4) και υποκλινική μαστίτιδα στην οποία η φλεγμονή του μαστικού αδένος δεν συνοδεύεται από κλινικές εκδηλώσεις (Tzora and Fthenakis 1998). Στην υποκλινική μαστίτιδα κανένα κλινικό σύμπτωμα δεν παρουσιάζεται. Τα σημαντικότερα ευρήματα στην υποκλινική μαστίτιδα είναι η αύξηση των λευκοκυττάρων στο γάλα και η μείωση της γαλακτοπαραγωγής. Επίσης παρατηρείται μείωση της % περιεκτικότητας του γάλακτος σε λακτόζη, αύξηση της % περιεκτικότητας του γάλακτος σε ολικές πρωτεΐνες και μείωση της % περιεκτικότητας του γάλακτος σε καζεΐνες. Εκδηλώνεται δε συνήθως με χρόνια μορφή, διότι δεν αντιμετωπίζεται επειδή δεν διαγιγνώσκεται έγκαιρα. Είναι δυνατόν η υποκλινική μαστίτιδα να μεταπέσει σε κλινική (Fthenakis and Jones 1990, Tzora et al 2016).



Εικόνα 4: Τυπική κλινική εικόνα γαγγραινώδους Μαστίτιδας με την αποβολή γάλακτος με τη μορφή αίματος και νερού.

Όπως είναι φανερό οι μαστίτιδες προκαλούν αλλοιώσεις στη σύνθεση του γάλακτος με αποτέλεσμα, ανάλογα με το βαθμό προσβολής, η σύνθεσή του να πλησιάζει εκείνη του αίματος, επειδή ο μαστός παύει να ενεργεί ως ένα εργαστήριο παραγωγής και μετατρέπεται σε φίλτρο. Επίσης με τη μαστίτιδα συνδέονται χημικές αλλοιώσεις στη σύνθεση του παραγόμενου «μαστιτικού» γάλακτος.

Για τους παραγωγούς το πρόβλημα έγκειται στη μείωση των αποδόσεων των ζώων και του εισοδήματός τους (Reneau and Packard 1991). Η αυξημένη τιμή του pH, εμποδίζει την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών καλλιεργείων και αλλοιώνεται η φυσικοχημική δομή του γάλακτος, με δυσμενή αποτέλεσμα στην τεχνολογία του γάλακτος όπως: βραδεία ανάπτυξη της οξύτητας, μείωση του αρώματος και κακή γεύση στα γιαούρτια, μείωση της ικανότητας συντήρησης και της αντοχής στη θέρμανση κ.α. Η τυχόν παρουσία αντιβιοτικών δεν επιτρέπει την ανάπτυξη των καλλιεργείων και αποτελεί απαγορευτικό παράγοντα για την παραγωγή προϊόντων από νωπό γάλα (Allison 1985).

2.4.4.2. Μέθοδοι διαπίστωσης των μαστίτιδων

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος διαπίστωσης μαστίτιδων είναι η αρίθμηση των σωματικών κυττάρων στο γάλα. Πρόβλημα αποτελεί ο προσδιορισμός του ορίου πέραν του οποίου ένα γάλα θα θεωρείται «μαστιτικό».

Το συνηθέστερο όριο είναι αυτό των 500.000 κυττάρων /ml αλλά υπάρχουν χώρες που κάνουν αποδεκτό και αυτό των 1.000.000 κυττάρων /ml (Barbano et al 1991). Στο παρελθόν, η αρίθμηση σωματικών κυττάρων (Somatic Cell Count - SCC) στο γάλα δεν είχε τη βαρύτητα που έχει σήμερα για την τεχνολογία γάλακτος. Η αυξημένη τιμή σωματικών κυττάρων στο γάλα σχετίζεται με αυξανόμενα ποσά θερμοσταθερών πρωτεασών και λιποπρωτεϊνών σ' αυτό. Όταν το νωπό γάλα έχει μικρό μικροβιακό φορτίο και στο παστεριωμένο γάλα δεν υπάρχει μικροβιακή ανάπτυξη, τα ένζυμα που συνδέονται με υψηλό SCC θα προκαλέσουν τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την υποβάθμιση του λίπους κατά τη συντήρηση σε συνθήκες κατάψυξης. Δεδομένου ότι οι δυνατότητες θανάτωσης, απομάκρυνσης ή ελέγχου της ανάπτυξης των βακτηρίων του παστεριωμένου κατεψυγμένου γάλακτος βελτιώνονται, ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στο νωπό γάλα είναι ο παράγοντας που συνδέεται με το χρόνο αποθήκευσης του κατεψυγμένου γάλακτος πριν από την αλλοίωσή του. Ο αριθμός σωματικών κυττάρων στο γάλα υγιών αγελάδων γαλακτοπαραγωγής είναι <50.000 κύτταρα/ml. Ο αυξημένος αριθμός σωματικών κυττάρων γάλακτος δεξαμενών συλλογής (200.000 κύτταρα /ml) αποδίδεται συνήθως σε γάλα με αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων, το οποίο προέρχεται από μικρό αριθμό νοσούντων αγελάδων της εκτροφής. Ο εντοπισμός των ζώων αυτών καθώς και η μη ανάμειξη του γάλακτος που παράγουν, με το γάλα των υγιών ζώων, θα αυξήσει αισθητά την ποιότητα του υπόλοιπου γάλακτος για την περαιτέρω χρήση του. Για να επιτευχθεί παράταση του χρόνου ζωής του κατεψυγμένου προϊόντος στο ράφι (από 60 έως 90 ημέρες) πρέπει να δοθούν στους ασχολούμενους με την τεχνολογία του γάλακτος οικονομικά κίνητρα που θα τους

επιτρέψουν να παράγουν γάλα με τον αριθμό σωματικών κυττάρων που απαιτείται για την παράταση του χρόνου ζωής των προϊόντων γάλακτος που συντηρούνται σε συνθήκες κατάψυξης (Barbano et al 2006). Εάν ο συνολικός αριθμός βακτηρίων στο νωπό γάλα είναι κάτω από 25.000 cfu/ml, τότε ο αριθμός των σωματικών κυττάρων του νωπού γάλακτος αποτελεί το σημαντικότερο καθοριστικό παράγοντα για τη διάρκεια διατήρησης του παστεριωμένου γάλακτος στο ράφι όσον αφορά την ανάπτυξη οσμών. Παραγωγή νωπού γάλακτος με αριθμό σωματικών κυττάρων 100.000 / ml είναι επιτεύξιμη σε επίπεδο γεωργοκτηνοτροφικής εκμετάλλευσης, αν δοθούν τα κατάλληλα οικονομικά κίνητρα στους παραγωγούς. Το υψηλής ποιότητας νωπό γάλα με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων είναι κρίσιμο σημείο κατά τη διαδικασία παραγωγής παστεριωμένου γάλακτος (Boor 2001).

Η διάταξη για το παστεριωμένο γάλα (pasteurized milk ordinance - PMO) στις Η.Π.Α. απαιτεί στο γάλα πρώτης ποιότητας, ο συνολικός αριθμός των βακτηρίων κατά την έξοδό του από την εκτροφή να είναι μικρότερος από 100.000 cfu/ml. Η ίδια διάταξη επίσης απαιτεί ο αριθμός των σωματικών κυττάρων του γάλακτος πρώτης ποιότητας να είναι μικρότερος από 750 κύτταρα/ml. Οι απαιτήσεις του PMO που αφορούν στο ανώτατο όριο συνολικού αριθμού βακτηρίων και σωματικών κυττάρων στο γάλα θεσπίστηκαν για να διασφαλιστεί η δημόσια υγεία και δεν αποτελούν πρότυπα ποιότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Τα δυσμενή αποτελέσματα της χρήσης γάλακτος με αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων που προορίζεται για τυροκόμηση, συνδέονται με τη μειωμένη παραγωγή τυριού (Politis and Ng-Kwai-Hang 1988, Barbano et al. 1991, Klei et al 1998), την αύξηση της απώλειας πρωτεΐνης και λίπους στον ορό του γάλακτος και τέλος το συμβιβασμό σε ότι αφορά την ποιότητα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Για αυτούς τους λόγους, η γαλακτοβιομηχανία δίνει οικονομικά κίνητρα στους αγρότες, ώστε να ενθαρρύνει την παραγωγή γάλακτος με μικρό αριθμό σωματικών κυττάρων. Τα προγράμματα που δίνουν οικονομικά κίνητρα για τη διασφάλιση της ποιότητας του γάλακτος περιλαμβάνουν εκτός από τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα και άλλα κριτήρια, όπως η μη ανίχνευση αντιβιοτικών και η αποφυγή νοθείας.

2.4.4.3. Αντιμετώπιση μαστίτιδων - αντιβιοτικά

Ανάλογα με τον αιτιολογικό παράγοντα της μαστίτιδας είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ένα από τα πολλά αντιμικροβιακά φάρμακα που διατίθενται στο εμπόριο.

Επιλογή του κατάλληλου αντιμικροβιακού φαρμάκου

Μετά την αξιολόγηση του αιτιολογικού παράγοντα πρόκλησης της μαστίτιδας και την αξιολόγηση των κλινικών συμπτωμάτων του ζώου πρέπει να σχεδιαστεί το κατάλληλο θεραπευτικό σχήμα. Κατά τον σχεδιασμό ενός θεραπευτικού σχήματος λαμβάνονται υπόψη ποικίλοι παράμετροι όπως, το είδος του αντιμικροβιακού φαρμάκου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, η δοσολογία του, η οδός και η συχνότητα χορήγησής του, η διάρκεια της χρήσης του και οι χρόνοι αναμονής πριν την κατανάλωση κρέατος και γάλακτος προερχόμενα από το υπό θεραπευτική αγωγή ζώο.

Ενδομαστική έγχυση αντιμικροβιακού φαρμάκου

Για τις περιπτώσεις ήπιας έως μέτριας μαστίτιδας (μη φυσιολογικό γάλα με ή χωρίς οίδημα του μαστικού αδένου), η αντιμικροβιακή αγωγή χορηγείται συνήθως ενδομαστικά. Τα κύρια αντιβιοτικά που έχουν ενδομαστική χρήση στις ΗΠΑ είναι η amoxicillin, το ceftiofur, η cepharirin, η cloxacillin, η erythromycin, η hetacillin, η penicillin και η pirlimycin. Η χρήση φαρμάκων ή σκευασμάτων μη ειδικών για ενδομαστική χρήση δεν συστήνεται καθότι υπάρχει ο κίνδυνος ερεθισμού του μαστικού αδένου και προαγωγής της υπάρχουσας φλεγμονής. Το φάσμα δράσης αποτελεί βασικό παράγοντα επιλογής ενός αντιμικροβιακού φαρμάκου για την ενδομαστική θεραπεία της μαστίτιδας. Η ερυθρομυκίνη (η οποία ανήκει στα μακρολίδια) και η πιρλιμυκίνη (η οποία ανήκει στις λινκοσαμίδες) είναι τα μόνα διαθέσιμα αντιμικροβιακά φάρμακα τα οποία χορηγούνται ενδομαστικά και τα οποία δεν ανήκουν στην κατηγορία των β-λακταμών. Τα δυο αυτά αντιμικροβιακά φάρμακα δρουν κατά κύριο λόγο έναντι των κατά Gram θετικών-βακτηρίων, ενώ δεν δρουν έναντι παθογόνων αιτιολογικών παραγόντων μαστίτιδων της κατηγορίας των *coliforms*. Ένα από τα τελευταία αντιμικροβιακά φάρμακα της κατηγορίας των β-λακταμών που διατίθεται για ενδομαστική χρήση είναι η benzathine penicillin G. Θεωρείται δραστική έναντι πολλών στρεπτοκόκκων και έναντι σταφυλοκόκκων, οι οποίοι δεν παράγουν πενικιλινάση ενώ δεν είναι δραστική έναντι βακτηρίων της οικογένειας των εντεροβακτηριακών. Παρόμοιο φάσμα δράσης έχουν οι αμινοπενικιλίνες (αμοξυκιλλίνη). Δρουν έναντι ορισμένων βακτηρίων της οικογένειας των εντεροβακτηρίων όπως η *E. coli* αν και πολλά στελέχη της *E. coli* είναι πλέον ανθεκτικά στις αμινοπεπικιλίνες. Η κλοξακιλλίνη (cloxacillin) είναι πενικιλίνη δραστική έναντι στελεχών *S. aureus* που παράγουν πενικιλινάση, τα οποία είναι ανθεκτικά στις φυσικές πενικιλίνες και αμινοπενικιλίνες, αλλά είναι λιγότερο δραστική έναντι άλλων ευαίσθητων στην πενικιλίνη μικροοργανισμών. Η ουσία κεφαπιρίνη (cepharirin) (μια πρώτης γενεάς

κεφαλοσπορίνη), είναι δραστική έναντι των σταφυλόκοκκων και στρεπτόκοκκων, ορισμένων εντεροβακτηριακών όπως η *E. coli* και η *Klebsiella spp* αλλά όχι έναντι των εντεροκόκκων. Οι κεφαλοσπορίνες «τρίτης γενιάς» όπως το ceftiofur είναι λιγότερο δραστικές από αυτές της «πρώτης γενιάς» έναντι των Gram-θετικών κόκκων, αλλά πιο δραστικές έναντι των εντεροβακτηριακών (Prescott and Dowling 2013).

Συστηματική χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων

Η συστηματική χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων αποτελεί κατάλληλο μέσο θεραπείας για τις σοβαρές περιπτώσεις μαστίτιδας (αυτές που περιλαμβάνουν εκτός από μη φυσιολογικό γάλα και διόγκωση του μαστού, συστηματικά κλινικά σημεία όπως πυρετό ή κατάθλιψη). Η μαστίτιδα που συνοδεύεται από συστηματική νόσο προκαλείται συνήθως από κολοβακτηρίδια όπως η *E. coli* και είδη του γένους *Klebsiella spp*, αλλά μπορεί επίσης να προκληθεί από Gram-θετικά παθογόνα όπως ο *S. aureus* (Erskine et al 2002). Λόγω του ότι η έκδοση των αποτελεσμάτων των μικροβιακών καλλιιεργειών απαιτεί διάστημα τουλάχιστον 24 ωρών, η θεραπεία της σοβαρής μαστίτιδας πρέπει αρχικά να βασίζεται στη δυνατότητα αναστολής τόσο των κατά Gram-θετικών όσο και των κατά Gram-αρνητικών βακτηριακών αιτιολογικών παραγόντων αυτής. Μια ορθολογική λοιπόν προσέγγιση της θεραπείας περιπτώσεων σοβαρών μαστίτιδων οξείας μορφής, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν έως και βακτηραιμία, θα ήταν η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων ευρέως φάσματος δράσης, σε συνδυασμό με τη χρήση ενδομαστικού σκευάσματος (Prescott and Dowling 2013).

2.4.4.4. Φαινοτυπικές μέθοδοι ελέγχου της in vitro ευαισθησίας παθογόνων μικροοργανισμών στους αντιμικροβιακούς παράγοντες - Δοκιμή ευαισθησίας (αντιβιογράμμα)

Η αλόγιστη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στη θεραπεία λοιμώξεων των ζώων μπορεί να ελεγχθεί με την εφαρμογή της in vitro δοκιμής ευαισθησίας παθογόνων μικροοργανισμών – αιτιολογικών παραγόντων λοιμωδών νοσημάτων των ζώων, στους αντιμικροβιακούς παράγοντες (αντιβιογράμμα). Στόχος είναι ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας των διάφορων αντιμικροβιακών φαρμάκων σε έναν συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό, προκειμένου να συνταγογραφηθεί η καταλληλότερη θεραπευτική αγωγή με σκοπό την εξάλειψη της νόσου (Balows 1974, Madigan et al 2000).

α) Μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικού σε άγαρ (Kirby-Bauer)

Πρόκειται για μια από τις απλούστερες τεχνικές προσδιορισμού της *in vitro* ευαισθησίας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Περιλαμβάνει την τοποθέτηση δίσκων αντιβιοτικών προκαθορισμένης συγκέντρωσης σε στερεό θρεπτικό υλικό στο οποίο έχει προηγηθεί η επίστρωση του υπο μελέτη μικροοργανισμού συγκεκριμένης πυκνότητας, την αερόβια επώαση αυτού και τη μέτρηση της διαμέτρου των ζωνών αναστολής σε mm. Ως όριο της ζώνης αναστολής θεωρείται το σημείο όπου δεν παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη με γυμνό μάτι (Wayne 2002). Τα όρια των ζωνών αναστολής για την έκφραση του αποτελέσματος όσον αφορά το χαρακτηρισμό της ευαισθησίας των βακτηριακών στελεχών για τα κτηνιατρικά δείγματα ορίζονται και επικαιροποιούνται από επιτροπές εμπειρογνομόνων των τομέων της κτηνιατρικής μικροβιολογίας και φαρμακολογίας, σε συνεργασία με Ινστιτούτα Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων σύμφωνα με τους κανόνες του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Wikler 2006a, Balouiri et al 2016).

β) Μέθοδοι αραιώσεων των αντιβιοτικών σε ζωμό ή άγαρ

Η μέθοδος αυτή γίνεται σε ζωμό είτε σε σωληνάρια (μακρομέθοδος), είτε σε πλάκες τιτλοποίησης (μικρομέθοδος) η οποία περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος (Κεφ. 4.2.3.6.) (Coyle 2005, Thornsberry 2016). Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration- MIC) που ορίζεται ως χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού, που αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, καθώς επίσης και η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (Minimal Bactericidal Concentration – MBC) η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που απαιτείται για την θανάτωση του μικροοργανισμού. Η χρήση του MIC και όχι του MBC για την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα συνάδει με τον θεραπευτικό στόχο ο οποίος σχετίζεται και με την συνεργατική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος του ζώου προκειμένου να επέλθει ίασή του (Wikler 2006b).

Τέλος, προκειμένου οι τιμές MIC να αποτελέσουν δείκτες μικροβιακής ευαισθησίας ή αντοχής χρησιμοποιούνται τα «breakpoints». Μετά την ανάγνωση του αντιβιογράμματος λοιπόν, ένας μικροοργανισμός μπορεί να χαρακτηριστεί ως «ευαίσθητος», «ανθεκτικός», ή «ενδιάμεσα ευαίσθητος» στον υπό εξέταση αντιμικροβιακό παράγοντα. Ο έλεγχος ευαισθησίας βασίζεται στη θεωρία ότι το εργαστηριακό εύρημα όσον αφορά την ευαισθησία του βακτηρίου στο εργαστήριο δείχνει ότι είναι πιθανό ένα ευνοϊκό αποτέλεσμα μετά τη χρήση της αντιμικροβιακής

φαρμακευτικής αγωγής, ενώ ένα εργαστηριακό εύρημα αντοχής σχετίζεται με κακή πρόγνωση όσον αφορά το θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Τα κτηνιατρικά «breakpoints» είναι ειδικά για κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα και για κάθε βακτηριακό είδος. Ορίζονται και επικαιροποιούνται από επιτροπές εμπειρογνομόνων των τομέων της κτηνιατρικής μικροβιολογίας και φαρμακολογίας, σε συνεργασία με Ινστιτούτα Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Reller et al 2009, Prescott and Dowling 2013).

γ) E-test

Μια εναλλακτική μέθοδος για τη μελέτη της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, στηρίζεται στη χρησιμοποίηση ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (μέθοδος E test) (Jacobs et al 1992). Πρόκειται για συνδυασμό των μεθόδων διάχυσης δισκίων αντιβιοτικών σε άγαρ και προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC). Ταινίες εμποτισμένες με το αντιβιοτικό, οι οποίες έχουν τυπωμένη κλίμακα συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού, χρησιμοποιούνται όπως ακριβώς και οι δίσκοι αντιβιοτικών. Τοποθετούνται σε στερεό θρεπτικό υλικό (MHA), επωάζονται για 18-24 ώρες και στη συνέχεια διαβάζεται το αποτέλεσμα. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) προσδιορίζεται ως το σημείο που η ζώνη αναστολής τέμνει την αριθμητική κλίμακα της ταινίας.

δ) Αυτοματοποιημένα συστήματα

Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο αυτοματοποιημένο σύστημα ελέγχου ευαισθησίας μικροβίων σε αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι το VITEK (bioMerieux, France). Πρόκειται για αυτοματοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης και ελέγχου ευαισθησίας το οποίο επιτυγχάνει τον γρήγορο προσδιορισμό της MIC ενός βακτηρίου μέσω της ανάπτυξης (growth kinetics). Όταν προκύψουν τα αποτελέσματα MIC, το σύστημα VITEK τα ερμηνεύει βάση των κριτηρίων ερμηνείας του National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) τα οποία περιλαμβάνονται στο λογισμικό του, ώστε να καταταχθούν τα στελέχη στις κλινικές κατηγορίες Susceptible, Intermediate και Resistant.

3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν διτός:

(α) Διερεύνηση και αξιολόγηση της επίδρασης διαφόρων θεραπευτικών σχημάτων για μαστίτιδα, που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κτηνιατρική πρακτική σε συγκεκριμένες βακτηριακές ομάδες (*E. coli* με έμφαση στον ορότυπο O157:H7, *S. aureus*, *Salmonella spp*, *Bacillus spp*, *C. perfringens*) που απομονώνονται από δείγματα μαστικού εκκρίματος και κόπρανα, τα οποία ελήφθησαν κατά τη διάρκεια δύο χρονικών περιόδων (τη χρονική στιγμή που αντιστοιχεί στο ήμισυ του συνολικού χρόνου θεραπείας και μετά το πέρας του ενδεδειγμένου χρόνου αναμονής για κάθε εφαρμοζόμενο φαρμακευτικό σκεύασμα).

(β) Τη χαρτογράφηση της ευαισθησίας/ανθεκτικότητας των απομονωθέντων βακτηριακών πληθυσμών του είδους *E. coli* και *S. aureus* έναντι μεγάλου αριθμού αντιβιοτικών σκευασμάτων.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. ΥΛΙΚΑ

4.1.1. Δείγματα

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν πεντακόσια (500) δείγματα νωπού γάλακτος και τετρακόσια (400) δείγματα κοπράνων (τα δείγματα γάλακτος και κοπράνων αντιστοιχούσαν στο ίδιο ζώο), τα οποία προέρχονταν από 75 εκτροφές προβάτων ορεινών περιοχών του Νομού Άρτας σε σύνολο περίπου 5.080 ζώων. Τα ζώα των εν λόγω εκτροφών είναι διασταύρωση Ελληνικών φυλών κυρίως της Ορεινής φυλής Ηπείρου (τύπου Μπούτσικο, Λάϊο, Μπέλο), Αγρινίου, Σαρακατσάνικη και Καραμάνικη – Κατσικά. Η γαλακτοπαραγωγή τους ανέρχεται στα 140 Kg / ζώο / έτος περίπου. Ο αριθμός των εκτροφών που μελετήθηκε αποτελεί το 2,5% των συνολικών εκτροφών προβάτων γαλακτοπαραγωγής των ορεινών περιοχών του Νομού Άρτας, ο δε αριθμός των ζώων ανά εκτροφή κυμαίνεται από 10 έως 80 ζώα.

Σημειώνεται ότι το γάλα που παραγόταν στις εκτροφές στην πλειονότητά του δινόταν στις γαλακτοβιομηχανίες για τυροκόμηση, ενώ μια μικρότερη ποσότητα προοριζόταν για την παραγωγή παραδοσιακά παρασκευασμένων τυριών από τις οικογένειες των παραγωγών προς ίδια κατανάλωση.

Τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν στις παρακάτω ομάδες (Πίνακας 9), ενώ ταυτόχρονα με τη λήψη μαστικού εκκρίματος (γάλα) γινόνταν και η λήψη αντίστοιχων δειγμάτων κοπράνων από τα ίδια ζώα:

A. Εκατό (100) δείγματα νωπού γάλακτος που συλλέχθηκαν από 25 εκτροφές κλινικά υγιών ζώων (προβάτων) ορεινών περιοχών του Νομού Άρτας, δηλαδή τέσσερα (4) δείγματα από κάθε εκτροφή τα οποία λαμβάνονταν σε τέσσερις μηνιαίες δειγματοληψίες ανά εκτροφή.

B. Διακόσια (200) δείγματα νωπού γάλακτος που συλλέχθηκαν από 25 εκτροφές προβάτων, στις οποίες υπήρξε εκδήλωση κλινικής μαστίτιδας και η δειγματοληψία έγινε κατά την περίοδο συστηματικής χορήγησης αντιμικροβιακών παραγόντων. Η διάγνωση της μαστίτιδας έγινε από Κτηνίατρο, ο οποίος έλαβε υπόψη τα κλινικά συμπτώματα, το ιστορικό της κάθε εκτροφής ζώου και τα ευρήματα μετά από επισκόπηση και ψηλάφηση του ζώου, ενώ δεν πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακές αναλύσεις για το σκοπό αυτό.

Τα δείγματα γάλακτος της ομάδας B κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με το είδος των αντιμικροβιακών παραγόντων και των αντίστοιχων σκευασμάτων αυτών, οι οποίοι επιλέχθηκαν για τη θεραπεία της μαστίτιδας ως εξής:

B1. Εκατό (100) δείγματα νωπού γάλακτος προερχόμενα από προβατίνες στις οποίες για τη θεραπεία της μαστίτιδας χορηγήθηκε πενικιλίνη και στρεπτομικίνη. Συγκεκριμένα χορηγήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Fortsipen της εταιρείας Virbec, στη δοσολογία των 5ml/ ημέρα, ενδομυϊκά. Η διάρκεια της θεραπείας ήταν 5 ημέρες, ενώ ο χρόνος αναμονής που τηρήθηκε για τη λήψη του δείγματος γάλακτος της παρακάτω κατηγορίας Γ ήταν 7-8 ημέρες.

B2. Πενήντα (50) δείγματα νωπού γάλακτος προερχόμενα από προβατίνες στις οποίες για τη θεραπεία της μαστίτιδας χορηγήθηκε τετρακυκλίνη. Συγκεκριμένα χορηγήθηκε το εμπορικό σκεύασμα terramycin-Log Active της εταιρείας Pfizer, στη δοσολογία του 1g/10Kg σωματικού βάρους μία φορά την ημέρα, ενδομυϊκά, για διάστημα τεσσάρων ημερών. Ο χρόνος αναμονής που τηρήθηκε για τη λήψη του δείγματος γάλακτος της παρακάτω κατηγορίας Γ ήταν 8 ημέρες.

B3. Πενήντα (50) δείγματα νωπού γάλακτος προερχόμενα από προβατίνες στις οποίες για τη θεραπεία της μαστίτιδας χορηγήθηκε κινολόνη. Συγκεκριμένα χορηγήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Baytril της εταιρείας Veterin, στη δοσολογία του 1g/10Kg σωματικού βάρους, μία φορά την ημέρα, για διάστημα πέντε ημερών, ενδομυϊκά. Ο χρόνος αναμονής που τηρήθηκε για τη λήψη του δείγματος γάλακτος της παρακάτω κατηγορίας Γ ήταν 13 ημέρες. Κατά την παραπάνω θεραπεία συμπληρωματικά και λόγω της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στο baytril, έγινε επίσης θεραπεία με ενδομαστική έγχυση του σκευάσματος Vetimast της εταιρείας Σεκιαρόγλου, στη δοσολογία του μισού σωληναρίου vetimast πρωί και βράδυ για διάστημα τεσσάρων ημερών.

Σε όλα τα ζώα που υποβλήθηκαν στις παραπάνω θεραπείες εφαρμόστηκε άδειασμα του μαστού και πλύσιμο με χλιαρό νερό και ήπιες μαλάξεις, όπως και καθαρισμός της θηλής με ήπιο αντισηπτικό.

Τα δείγματα αυτής της ομάδας συλλέχθηκαν κατά την περίοδο της θεραπείας [τέσσερα (4) δείγματα από κάθε εκτροφή].

Γ. Διακόσια (200) δείγματα νωπού γάλακτος από τα ίδια ζώα της ομάδας Β, μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής των χορηγούμενων αντιβιοτικών. Αναλυτικά όσον αφορά τα δείγματα της ομάδας Γ ισχύει η παρακάτω κατηγοριοποίηση:

Γ1. Εκατό (100) δείγματα νωπού γάλακτος, μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής από την χορήγηση πενικιλίνης και στρεπτομικίνης (Fortsipen).

Γ2. Πενήντα (50) δείγματα νωπού γάλακτος, μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής από την χορήγηση τετρακυκλίνης (terramycin -Log Active).

Γ3. Πενήντα (50) δείγματα νοπού γάλακτος, μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής από την χορήγηση κινολόνης (Baytril).

Τα δείγματα των ομάδων Β και Γ δεν είχαν ουδεμία σχέση με τα δείγματα της ομάδας Α τα οποία χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρες.

Τα ανωτέρω αναφερόμενα δείγματα νοπού γάλακτος και κοπράνων προβατίνων, υποβλήθηκαν σε μικροβιολογική εξέταση προκειμένου να γίνει:

α) Καταμέτρηση (cfu/ml) και απομόνωση των παθογόνων για τον άνθρωπο βακτηρίων *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Bacillus spp.*, βλαστικών και σπορογόνων μορφών του *Clostridium perfringens*.

β) Μελέτη της ανθεκτικότητας στελεχών των γενών *S. aureus* και *E. coli* σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Πίνακας 9: Δείγματα που μελετήθηκαν

α/α	Ομάδες δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων	
		ΓΑΛΑ	ΚΟΠΡΑΝΑ
A	Έκκριμα μαστικού αδένων υγιών προβατίνων από 25 εκτροφές ορεινών περιοχών της Ηπείρου (MARTYRES)	100	-
B	Έκκριμα μαστικού αδένων προβατίνων που παρουσίασαν μαστίτιδα, από 25 εκτροφές ορεινών περιοχών της Ηπείρου κατά την περίοδο της συστηματικής χορήγησης αντιβιοτικών.		
B1	Αντιβιοτικό: πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη (Fortsipen)	100	100
B2	Αντιβιοτικό: τετρακυκλίνη (Log Active)	50	50
B3	Αντιβιοτικό: κινολόνη (Baytril)	50	50
Γ	Έκκριμα μαστικού αδένων των προβατίνων της ομάδας Β μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής των χορηγούμενων αντιβιοτικών.		
Γ1	αντιβιοτικό: πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη (Fortsipen)	100	100
Γ2	αντιβιοτικό: τετρακυκλίνη (Log Active)	50	50
Γ3	αντιβιοτικό: κινολόνη (Baytril)	50	50
	ΣΥΝΟΛΟ	500	400

4.1.2. Θρεπτικά υποστρώματα

1. Buffered Peptone Water της εταιρείας Merck
2. Brain Heart Infusion Broth της εταιρείας Fluka
3. Nutrient Broth της εταιρείας Lab M
4. Nutrient Agar της εταιρείας Lab M
5. Columbia agar της εταιρείας Merck
6. Ringer's solution tablets της εταιρείας Merck
7. Baird – Parker Agar της εταιρείας Merck
8. Rappaport–Vassiliadis Soya Peptone Broth της εταιρείας Merck
9. Brilliant Green Agar, Modified της εταιρείας Fluka
10. Xylose Lysine Desoxycholate Agar της εταιρείας Merck
11. Peptone from casein της εταιρείας Merck
12. Yeast extract της εταιρείας Bacto™
13. Lactose monohydrate της εταιρείας Merck
14. Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) της εταιρείας Merck
15. Endo Agar της εταιρείας Merck
16. Mannitol Phenol Red Egg Yolk Polymixin Agar (MEYP) της εταιρείας Merck
17. Manitol Saly Agar
18. DNase Άγαρ
19. Mueller Hinton Broth
20. tryptic soy broth (TS broth)
21. MRSA2 Agar (MRSA2, Oxoid, UK)
22. BPLS Agar
23. tryticase soy broth (mTSB)
24. LS Broth
25. MacConkey agar (CT-SMAC), cefixime (0.05 mg L⁻¹) και potassium tellurite (2.5 mg L⁻¹)
26. Eosin methylen blue agar (EMB).

4.1.3. Χημικά αντιδραστήρια

1. Απόλυτη αλκοόλη (absolute ethanol) της εταιρείας Merck
2. Sodium chloride (NaCl) της εταιρείας Merck
3. L-cysteine hydrochloride της εταιρείας Merck
4. Anhydrous sodium metabisulphite (Na₂S₂O₂) της εταιρείας
5. Ferric ammonium citrate της εταιρείας Sigma

6. H₂O₂ της εταιρείας Poch
7. Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride της εταιρείας Merck
8. L-cysteinhydrochloride – monohydrate της εταιρείας Merck
9. Αντιδραστήριο Kovacs της εταιρείας Merck
10. Egg Yolk emulsion της εταιρείας Merck
11. API Staph της εταιρείας BioMerieux
12. API20E της εταιρείας BioMerieux
13. Πρότυπες ουσίες αντιβιοτικών υπό μορφή σκόνης της εταιρείας Difco Laboratories
14. Πρότυπες ουσίες αντιβιοτικών υπό μορφή σκόνης της εταιρείας Sigma
15. Phosphate Buffer 0.1M, pH 6
16. Διάλυμα 0.1 N HCl
17. Απόλυτη μεθανόλη
18. Διαλύτης dimethyl formamide
19. Διάλυμα 0.1 N NaOH
20. Ρυθμιστικό διάλυμα phosphate buffered saline (PBS)
21. Aztreonam AZT
22. Cefoxitin CXT
23. Αντιοροί του σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7 (Murex Wellcolex, UK).
24. (α) Δοκιμή της Indole, (β) Methyl red, (γ) Voges-Proskauer, (δ) Citrate, (ε) Urease, (στ) Ζύμωση cellobiose, (η) β-glucuronidase παραγωγή και (θ) Έλεγχος θολερότητας – ανάπτυξης σε θρεπτικό υπόστρωμα KCN broth
25. Αντιβιοτικά.

4.1.4. Λοιπά υλικά

1. Στείροι πλαστικοί περιέκτες χωρητικότητας 150 ml
2. Δείκτες υγρής αποστείρωσης
3. Δείκτες ξηρής αποστείρωσης
4. Τρυβλία petri πλαστικά διαμέτρου 90 mm μιας χρήσης
5. Μικροπλάκα τιτλοποίησης 96 φρεατίων από πολυστυρένιο
6. Πιπέτες Pasteur 230 mm
7. Αντικειμενοφόροι πλάκες 76x26 mm
8. Καλυπτρίδες 24x50 mm

9. Στείρες ευρύστομες φιάλες ή στείρα ποτήρια ζέσης χωρητικότητας 50-1000 ml κατασκευασμένες από βιοπυριτικό γυαλί.
10. Φιάλες αραίωσης με βιδωτό πώμα κατασκευασμένες από βιοπυριτικό γυαλί βαθμολογημένες για όγκο 100 ml -1000 ml.
11. Σιφόνια, κατασκευασμένα από βιοπυριτικό γυαλί ή πλαστικά μιας χρήσης βαθμολογημένα και χωρητικότητας από 0,1ml έως 11ml.
12. Δοκιμαστικοί σωλήνες Φ16x160 mm και Φ16x100 mm κατασκευασμένοι από βιοπυριτικό γυαλί.
13. Σωλήνες durham
14. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (socorex 10-100 μl)
15. Πλαστικά ρύγγη μιας χρήσης αποστειρωμένα, κίτρινα τύπου erpendorf για τις παραπάνω πιπέτες
16. Πώματα από υδρόφοβο βαμβάκι για γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες
17. Πουάρ
18. Λαβίδες ανοξειδωτες στείρες
19. Ψαλίδια ανοξειδωτα στείρα
20. Στατό μεταλλικά για γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες
21. Μετρητής της τιμής του pH εταιρείας Sentron
22. Αναδευτήρας τύπου Vortex
23. Ζυγός ακριβείας με ευαισθησία 0,1 g
24. Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμενόμενη πλάκα
25. Υδατόλουτρο
26. Επωαστικός θάλαμος
27. Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής
28. Υγρός κλίβανος (αυτόκαυστο)
29. Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης
30. Ψυγεία
31. Στήλη απιονισμένου νερού
32. Μικροσκόπιο
33. Θολοσίμετρο.

4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1. Μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας σωματικών κυττάρων στο νοπό γάλα

Τα ζώα των αναφερθέντων ομάδων του πίνακα 9, εκτός των ζώων της Ομάδας Α, στην αρχική φάση της παρούσας μελέτης, έπρεπε να δίνουν αμέσως μετά την άμελξη στον τόπου δειγματοληψίας, σε έλεγχο του εκκρίματος του μαστικού τους αδένα αποτέλεσμα CMT (California mastitis test) πάνω από 2.

Τα ζώα της ομάδας Α (κοπάδι ζώων μάρτυρας) σε έλεγχο του εκκρίματος του μαστικού τους αδένα έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα CMT.

Μέθοδος: Κύριος παράγοντας που επηρεάζει την ποιότητα του γάλακτος είναι τα σωματικά κύτταρα στο γάλα. Τα σωματικά κύτταρα κατά 97-98% είναι λευκά αιμοσφαίρια, προερχόμενα από το αίμα του εξεταζόμενου ζώου και κατά 2-3% είναι μαστικά εκκριτικά κύτταρα ή επιθηλιακά κύτταρα.

Στη παρούσα μελέτη η έμμεση καταμέτρηση των σωματικών κυττάρων που υπάρχουν στα εξεταζόμενα δείγματα γάλακτος έγινε με τη χρήση της δοκιμής του Καλιφόρνια τέστ (California mastitis test – CMT) (Zafalon et al 2016).

Κατά την εκτέλεση της δομικής του Καλιφόρνια τέστ γίνεται ανάμιξη 2 ml γάλακτος (από κάθε ημιμόριο μαστικού αδένα) με ίση ποσότητα αντιδραστήριου 3% λαουρυλοθειικού νατρίου. Η ανάμιξη πραγματοποιείται σε ειδικό σκεύος (εικόνα 5) το οποίο αποτελείται από τέσσερις κυκλικούς υποδοχείς διαμέτρου 7,5cm και βάθος 2 cm. Πρώτα στους ειδικούς κυκλικούς υποδοχείς τοποθετείται το δείγμα γάλακτος και στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο και με κυκλικές κινήσεις αναμιγνύεται με το γάλα. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο διαλύει το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των λευκοκυττάρων του γάλακτος, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του DNA του πυρήνα, με το οποίο στη συνέχεια αντιδρά και σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα (πήγμα) Το αποτέλεσμα της παρατηρούμενης αντίδρασης, δηλαδή ο σχηματισμός πήγματος βαθμολογείται και συσχετίζεται αντίστοιχα με τον αριθμό σωματικών κυττάρων στο γάλα.

Η βαθμολόγηση και περιγραφή των παρατηρούμενων αντιδράσεων στο γάλα (El-Masannat 1987, Fthenakis 1995, Zafalon et al 2016) φαίνονται στον πίνακα 10.

Βαθμολόγηση η οποία χαρακτηρίζεται ως αρνητική και ίχνη, υποδηλώνει γάλα απαλλαγμένο από μαστίτιδα, ενώ βαθμολόγηση από 1 και πάνω είναι ενδεικτική μαστίτιδας.



α



β

Εικόνα 5: α) California Mastitis Test (CMT), β) Ανάγνωση αποτελέσματος

Πίνακας 10: Βαθμολόγηση τιμών αποτελεσμάτων του California mastitis test – CMT

Βαθμολόγηση	Περιγραφή της αντίδρασης
Αρνητική	Δεν παρατηρείται καμιά αλλαγή στο εξεταζόμενο δείγμα γάλακτος
Ίχνη	Μικρή κολλώδης μάζα, που παρατηρείται ευκρινέστερα στο λεπτό στρώμα υγρού στην περιφέρεια του υποδοχέα.
1	1+: Μεγάλη κολλώδης μάζα, που όμως δεν συγκεντρώνεται καθώς το μίγμα ανακινείται.
2	2+: Μεγάλη κολλώδης μάζα ή ημιστερεά πηκτή μάζα, που συγκεντρώνεται στο κέντρο του υποδοχέα ή κινείται ολόκληρη προς την περιφέρεια καθώς το μίγμα ανακινείται.
3	3+: Στερεά και κολλώδης πηκτή, που σχηματίζει ομοιογενή μάζα, προσκολλημένη στον πυθμένα του υποδοχέα.

4.2.2. Τεχνική δειγματοληψίας

Μαστικό έκκριμα: Αρχικά αρμέγονταν οι προβατίνες με το χέρι. Το γάλα συλλέγονταν σε στείρους περιέκτες των 150 ml και στη συνέχεια διενεργούνταν επιμελής ανάμειξη του για να εξασφαλισθεί ομοιογένεια σε ολόκληρη τη μάζα του δείγματος.

Κόπρανα: Ποσότητα κοπράνων, βάρους περίπου 100g τοποθετήθηκε σε πλαστικούς αποστειρωμένους περιέκτες.

Μετά από τη δειγματοληψία, τα δείγματα τοποθετούνταν αμέσως σε φορητό ψυγείο και μεταφέρονταν στο εργαστήριο, όπου αναλύονταν την ίδια ημέρα. Όταν αυτό δεν ήταν εφικτό, διατηρούνταν σε θερμοκρασία 2-4⁰C, προκειμένου να αναλυθούν την επόμενη ημέρα.

4.2.3. Προετοιμασία δειγμάτων

4.2.3.1. Τεχνική χειρισμού και ομοιογενοποίησης των δειγμάτων

Μαστικό έκκριμα: Το κάθε δείγμα αναμειγνυόταν καλά μέσα στο φιαλίδιο δειγματοληψίας, με 20-25 αναστροφικές κινήσεις. Η ανακίνηση ήταν ταχεία και έντονη (25 αναστροφές σε χρόνο 7 sec). Από το δείγμα αυτό και μέσα σε 3 min από τη στιγμή της ανακίνησης, λήφθηκαν με στείρο σιφώνιο 10ml και μεταφέρθηκαν σε φιάλη αραιώσης που περιείχε 90ml υγρού ομοιογενοποίησης (πεπτονούχο νερό G- Peptone Water). Ακολουθούσε έντονη ανακίνηση της φιάλης με το χέρι σε τόξο 30-35 cm επί 1 min. Η ομοιογενοποίηση του δείγματος με το μέσο ομοιογενοποίησης γινόταν με τέτοιες αναλογίες, ώστε να προκύπτει αραιώση του δείγματος 1:10. Με αυτό τον τρόπο παρασκευάστηκε η πρώτη αραιώση του δείγματος (10^{-1}).

Κόπρανα: Από κάθε δείγμα κοπράνων τοποθετήθηκαν 10 g αυτών σε γυάλινο αποστειρωμένο σωλήνα που περιέχει 90 ml PBS, pH:7,5. Ακολούθησε μετάγγιση της ποσότητας του δείγματος σε αποστειρωμένους γυάλινους σωλήνες και ανάδευση αυτών με τη βοήθεια Vortex για 1 min. Στη συνέχεια οι γυάλινοι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές για 10 λεπτά. Στο πέρας της διαδικασίας της φυγοκέντρησης συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό.

4.2.3.2. Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

- Μετά την ομοιογενοποίηση του δείγματος και την παρασκευή της πρώτης δεκαδικής αραιώσης (1:10), έγιναν οι υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις (1:100, 1:1000 κ.λ.π.) με μεταφορά 1 ml δείγματος σε 9 ml Ringer's solution. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις μέχρι την αραιώση 10^{-4} .
- Η μεταφορά της ποσότητας του δείγματος από τον ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον επόμενο έγινε με το κατάλληλο ογκομετρικό σιφώνιο, με κατάλληλους χειρισμούς, ώστε να μην έρθει σε επαφή με το αραιωτικό υγρό του δοκιμαστικού σωλήνα στον οποίο μεταφέρθηκε το δείγμα ούτε να αδειάζει η τελευταία σταγόνα με φύσημα του σιφωνίου.
- Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας, αμέσως με τη μεταφορά του δείγματος από τον προηγούμενο ανακινήθηκε με την χρήση κυκλομίκτη (Vortex).

Όλες οι αραιώσεις παρασκευάστηκαν εντός χρόνου 15 min από τη στιγμή της ομοιογενοποίησης του δείγματος.

4.2.4. Μέθοδοι καλλιέργειας των δειγμάτων γάλακτος, ανάπτυξης μικροοργανισμών, απομόνωσης και ταυτοποίησής τους.

4.2.4.1. Μέθοδος απομόνωσης των στελεχών του είδους *Staphylococcus aureus* (National Standard Method-F 12 Health Protection Agency 2004, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th Edition, 1986) και σύμφωνα με τις συστάσεις του National mastitis Council

Στη μελέτη για την απομόνωση του γένους *Staphylococcus* και ειδικότερα του είδους *Staphylococcus aureus* από τα δείγματα γάλακτος εφαρμόστηκε η National Standard Method-F 12 Health Protection Agency 2004, η οποία χρησιμοποιεί ως αρχικό στάδιο την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα Baird – Parker Agar και Manitol Saly Agar.

Από όλες τις δεκαδικές αραιώσεις του κάθε δείγματος σε Ringer' s solution, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.3.2, γινόταν απευθείας επιφανειακή σπορά, με τη βοήθεια κεκαμένης γυάλινης ράβδου, 0,5ml εξεταζόμενου υλικού σε τρυβλία που περιείχαν ως υπόστρωμα Baird – Parker Agar (εικόνα 6) και Manitol Saly Agar (διπλή σειρά τρυβλίων για κάθε αραιώση). Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37⁰C για 48 ώρες.

Η ταυτοποίηση και απομόνωση των στελεχών του γένους *Staphylococcus* έγινε σύμφωνα με τις δικλείδες του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (9th Edition, 1986). Μετά την επώαση εξετάζονταν όλες οι τυπικές αποικίες. Οι χαρακτηριστικές αποικίες του *S. aureus* (εικόνα 6) που αναπτύχθηκαν από κάθε δείγμα γάλακτος καταμετρούνταν.

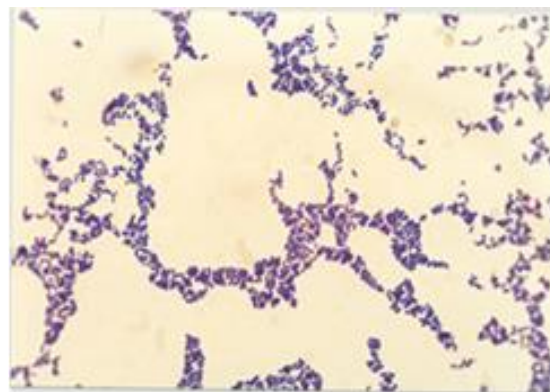
Οι τυπικές αποικίες υποβάλλονταν στα παρακάτω: 1) Gram χρώση, 2) δοκιμή καταλάσης, 3) δοκιμή οξειδάσης και 4) δοκιμή παραγωγής DNase με τη χρήση του DNase Άγαρ. Επίσης 5 από τις τυπικές αποικίες ανακαλλιεργούνταν στον brain heart infusion broth, επωάζονταν για 24-48 ώρες στους 37⁰C και συντηρούνταν στους -20 ⁰C.

Για την επιβεβαίωση εναλλακτικά των επιβεβαιωτικών δοκιμών της μεθόδου National Standard Method-F 12 Health Protection Agency 2004, διεξήχθη βιοχημική ταυτοποίηση με τη χρήση του βιοχημικού συστήματος ταυτοποίησης API Staph της BioMerieux, το οποίο σχετίζεται επαρκώς με τις εν λόγω δοκιμές. Στις παραπάνω βιοχημικές δοκιμές υποβλήθηκαν: α) οι τυπικές αποικίες του *S. aureus*, που αναπτύχθηκαν από κάθε δείγμα γάλακτος, β) αυτές που μικροσκοπικά κατά την κατά Gram χρώση εμφανίζονταν ως gram-θετικοί κόκκοι, διάταξης τσαμπιού σταφυλιού, γ) αυτές που ήταν θετικές στη δοκιμασία της καταλάσης και δ) αρνητικές στη δοκιμασία της οξειδάσης.

Προκειμένου να διεξαχθούν οι ανωτέρω βιοχημικές δοκιμασίες ενοφθαλμίζονταν οι επιλεγμένες αποικίες σε τρυβλία με nutrient agar με τρόπο ώστε να αναπτυχθούν μεμονωμένες αποικίες. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C για 24±3 ώρες. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνταν καθαρές καλλιέργειες για την ταυτοποίηση με το σύστημα API Staph, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρείας.



α



β

Εικόνα 6: α) Τυπικές αποικίες *S. aureus* σε Baird – Parker Agar (BP), β) Gram χρώση: *S. aureus*

Επιπλέον για τα δείγματα κοπράνων, εκτός από τις ανωτέρω τεχνικές απομόνωσης:

5 ml από το υπεκείμενο υγρό φυγοκέντρησης των δειγμάτων (παράγραφος 4.2.3.1) τοποθετείται σε 5 ml salty broth (SB, Mueller Hinton Broth + 6 5% NaCl, Merck, Germany) και ακολουθεί επώαση στους 36 ± 1 °C για 24 h και μετέπειτα 1 ml από τον προαναφερόμενο επωαζόμενο ζωμό τοποθετείται σε 9 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος tryptic soy broth (TS broth), το οποίο φέρει αντιβιοτικά ως εμπλουτιστικούς παράγοντες την aztreonam AZT και την cefoxitin CXT. Γίνεται ξανά επώαση στους 36 ± 1 °C για 24 h και μετέπειτα ακολουθεί επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MRSA2 Agar και επώαση στους 36 ± 1 °C / 24 h (Klimešová et al 2017).

4.2.4.2. Μέθοδος απομόνωσης στελεχών του γένους *Salmonella spp* (FDA/CFSAN-BAM 2003 και ISO 6579:2002).

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί μέθοδος αρκετά ευαίσθητη ώστε να μπορεί να χρησιμοποιείται για την απομόνωση όλων των στελεχών των ορότυπων του γένους *Salmonella spp* τόσο από το γάλα όσο και από άλλα είδη τροφίμων.

Για την απομόνωση και την καταμέτρηση των στελεχών του γένους *Salmonella spp* στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι δικλείδες του σχήματος που περιγράφεται

στο Bacteriological Analytical Manual, έκδοση του 2003 καθώς και η Διεθνής πρότυπη μέθοδος ISO 6579:2002.

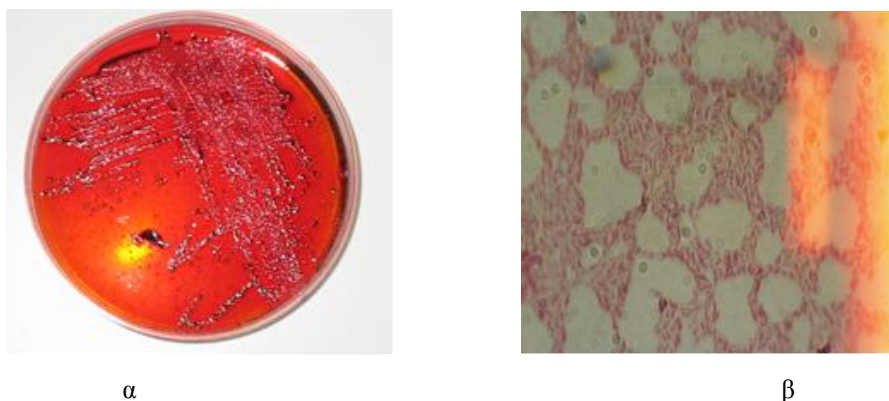
Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για την αναζήτηση στελεχών του γένους *Salmonella spp* στα δείγματα περιλαμβάνει τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο του μη εκλεκτικού εμπλουτισμού (προεμπλουτιστική φάση), το δεύτερο στάδιο του εκλεκτικού εμπλουτισμού και τέλος το τρίτο στάδιο της απομόνωσης.

Κατά το πρώτο στάδιο, από κάθε δείγμα λαμβάνεται αντιπροσωπευτική ποσότητα του 1ml και μεταφέρεται σε σωλήνα που περιέχει 9 ml Buffered Peptone Water. Όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε μεταλλικό στατό και επώάζονται αερόβια στους 37° C για 16-18h. Η παραπάνω διαδικασία αναφέρεται ως μη εκλεκτικός προεμπλουτισμός και κρίνεται απαραίτητη διότι διασφαλίζει την ανίχνευση ακόμη και μικρού αριθμού κυττάρων σαλμονελλών ή ακόμη και κυττάρων σαλμονελλών που έχουν υποστεί βλάβη. Μετά το πέρας των 18 ωρών πραγματοποιείται το δεύτερο στάδιο του εκλεκτικού εμπλουτισμού, κατά το οποίο γίνεται ενοφθαλμισμός 100 μl από το προηγούμενο υγρό σε σωλήνες που περιέχουν ως υγρό υπόστρωμα 10ml Rappaport–Vassiliadis Soya Reptone Broth και στη συνέχεια γίνεται επώαση στους 42⁰ C για 24 h.

Μετά το πέρας της επώασης του δεύτερου σταδίου γίνεται ενοφθαλμισμός με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης 0,3 ml από το προαναφερόμενο υγρό (ενοφθαλμούμενου υποστρώματος Rappaport–Vassiliadis Soya Reptone Broth) σε τρυβλία που περιέχουν Brilliant Lactose Green Agar και Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD agar) (εικόνα 7) και επώαση των τρυβλίων για 24 – 36 h στους 37⁰C. Στη συνέχεια εξετάζονται τα τρυβλία για την παρουσία τυπικών αποικιών του γένους *Salmonella spp*. Οι τυπικές αποικίες του γένους *Salmonella spp* στο XLD agar είναι κόκκινες με μαύρα κέντρα. Οι τυπικές αποικίες των γενών *Shigella* και *Providencia* στο XLD agar είναι κόκκινες, των γενών *Escherichia* και *Citrobacter* είναι κίτρινες (Difco Manual 1984, Detroit and Power 1988). Επίσης μη τυπικές αποικίες του γένους *Salmonella spp* αναπτύσσονται στο XLD είτε με ρόζ χρωματισμό ή χωρίς μαύρα κέντρα (π.χ *S. paratyphi* A), είτε με κίτρινο χρωματισμό χωρίς εμφάνιση μαύρου χρώματος (στελέχη του γένους *Salmonella spp*). Οι αποικίες του γένους *Salmonella spp* στο BPLS Agar εμφανίζουν κόκκινο χρώμα ενώ οι τυπικές αποικίες του γένους *E.coli* έχουν χρώμα κίτρινο. Στη συνέχεια καταμετρούνται οι τυπικές αποικίες.

Τέλος συλλέγονται οι τυπικές αποικίες του γένους για περαιτέρω βιοχημικές αναλύσεις. Για την επιβεβαίωση εναλλακτικά του συμβατικού βιοχημικού συστήματος ταυτοποίησης των ειδών του γένους *Salmonella spp* χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό βιοχημικό σύστημα ταυτοποίησης API20 E το οποίο συσχετίζεται επαρκώς με το

συμβατικό βιοχημικό σύστημα ταυτοποίησης (FDA/CFSAN-BAM 2003). Από κάθε τρυβλίο λαμβάνονταν αποικίες που θεωρούνταν ότι είναι τυπικές, ενοφθαλμίζονταν σε τρυβλία με Nutrient Agar με τρόπο ώστε να αναπτυχθούν μεμονωμένες αποικίες. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επωάζονταν στους 37⁰C για 24±3 h. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνταν καθαρές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή της κατά Gram χρώσης (εικόνα 7), των δοκιμών καταλάσης, οξειδάσης και την ταυτοποίηση με το σύστημα API20 E, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρείας.



Εικόνα 7: α) Τυπικές αποικίες *Salmonella spp.* σε XLD agar και β) Gram χρώση: *Salmonella spp*

4.2.4.3. Μέθοδος απομόνωσης στελεχών του είδους *Clostridium perfringens* (ISO 7937: 1997)

Στη μελέτη για την απομόνωση στελεχών του είδους *Clostridium perfringens* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ISO 7937:1997 η οποία στο πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την καλλιέργεια του υπό εξέταση δείγματος στο θρεπτικό υπόστρωμα Lactose – Sulfite (L.S.) Broth. Η χρήση στην παρούσα έρευνα του υπερεκλεκτικού θρεπτικού υλικού για την απομόνωση του *C. perfringens*, L.S. ζωμού, έδωσε τη δυνατότητα διαπίστωσης της ύπαρξης στελεχών του βακτηρίου (βλαστικές και σπορογόνες μορφές), ακόμη και σε πολύ μικρή συγκέντρωση κυττάρων ανά γραμμάριο δειγμάτων.

Από το αρχικό ομογενοποιημένο δείγμα, σύμφωνα με τα αναφερόμενα στην παράγραφο 4.2.3.1, λαμβάνεται με τη βοήθεια σιφωνίου μιας χρήσης 1ml υγρού, το οποίο τοποθετείται σε γυάλινο σωλήνα που περιέχει 9 ml L.S. Broth (10⁻¹ αραίωση). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δεκαδικές αραιώσεις σε σωλήνες που περιέχουν L.S. Broth μέχρι τη 10⁻³ αραίωση. Επίσης από το αρχικό ομογενοποιημένο δείγμα λαμβάνεται 1 ml υγρού και μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα, στη συνέχεια θερμαίνεται στους 80⁰C για 20 min ώστε να απομονωθούν σπορογόνες μορφές στο εξεταζόμενο δείγμα. Τέλος το θερμαινόμενο υλικό μεταφέρεται σε σωλήνα που περιέχει 9 ml L.S. Broth.

Όλοι οι σωλήνες με τον L.S. Broth, στη συνέχεια επωάζονται σε υδατόλουτρο κάτω από αερόβιες συνθήκες στους 46⁰C για 24- 36 h.

Ανάγνωση αποτελέσματος

Για την εξαγωγή του αποτελέσματος εκτιμήθηκε για κάθε αραιώση δείγματος σε υλικό L.S. Broth, η θόλωση από ζύμωση λακτόζης, η παραγωγή H₂S και ο σχηματισμός αερίου.

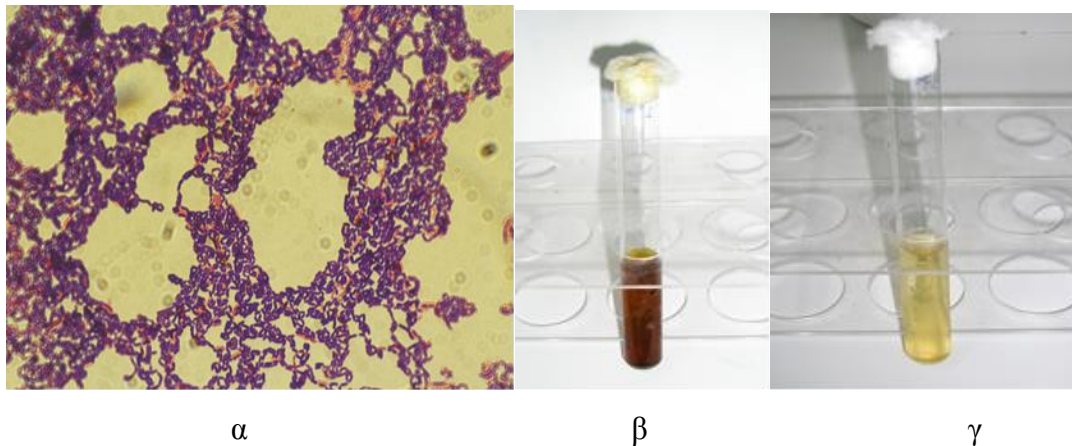
Θολερότητα: Αναγνωρίζεται από την απώλεια της διαύγειας του θρεπτικού υλικού, λόγω ζύμωσης της λακτόζης (αξιολογείται με έναν σταυρό).

Παραγωγή H₂S: Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη μαύρου χρώματος στον πυθμένα του γυάλινου σωλήνα ή σε όλη τη μάζα του υγρού λόγω παραγωγής H₂S (αξιολογείται με έναν σταυρό).

Σχηματισμός αερίου: Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη φυσαλίδων στο εσωτερικό του σωληναρίου Durham και απώθηση αυτού προς την επιφάνεια του υγρού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της λακτόζης (αξιολογείται με έναν σταυρό).

Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία 46⁰ C για τον διαχωρισμό από άλλα βακτήρια που δίνουν επίσης την αντίδραση της ζύμωσης της λακτόζης θετική.

Η κάθε αραιώση του εξεταζόμενου δείγματος σε υλικό L.S. Broth κρίνεται θετική ως προς την ύπαρξη στελεχών του είδους *C. perfringens* αν συνυπάρχει ή όχι θολερότητα, παραγωγή H₂S και σχηματισμός αερίου. Το ίδιο ισχύει και για την ανάδειξη θετικού ή όχι αποτελέσματος για την ύπαρξη σπορογόνων μορφών στο εξεταζόμενο δείγμα (εικόνα 8).



Εικόνα 8: α) Gram χρώση: *Clostridium perfringens*, β) Εμφάνιση ανάπτυξης *Clostridium perfringens* σε Lactose – Sulfite (L.S.) Broth, γ) Lactose – Sulfite (L.S.) Broth μη ανάπτυξη *Clostridium perfringens*.

4.2.4.4. Μέθοδος απομόνωσης στελεχών του είδους *Escherichia coli* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th Edition, 1986)

Στη μελέτη για την απομόνωση κολοβακτηριοειδών εντερικής προέλευσης με κύριο αντιπρόσωπο την *Escherichia coli*, το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης σε Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) και σε Endo Agar τα οποία παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των προμηθευτών του υλικού.

Από όλες τις δεκαδικές αραιώσεις του κάθε δείγματος γάλακτος σε Ringer' s solution, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.3.2, γίνεται απευθείας επιφανειακή σπορά, με τη βοήθεια κεκαμένης γυάλινης ράβδου 0,5ml εξεταζόμενου υλικού σε τρυβλία που περιέχουν ως υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (διπλή σειρά τρυβλίων για κάθε αραιώση). Τα τρυβλία επωάζονται στους 37⁰C για 24 h.

Καταμετρούνται και αξιολογούνται όλες οι αποικίες κόκκινου ή πορφυρού χρώματος, με μέγεθος $\geq 0,5$ mm. Μη τυπικές αποικίες πρέπει επίσης να μελετηθούν. Από τις χαρακτηριστικές ή μη αποικίες κάθε τρυβλίου γίνονται παρασκευάσματα Gram χρώσης και πραγματοποιούνται δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης. Οι αποικίες που παρουσιάζουν κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση Gram-αρνητικά βακτηρίδια μέσου μήκους και διαμέτρου, μεμονωμένα ενοφθαλμίζονται επιφανειακά με κρίκο σε τρυβλία που περιέχουν ως υπόστρωμα Endo Agar και επωάζονται στους 37⁰C για 24-48 h. Ο σχηματισμός μαύρων με μεταλλική απόχρωση αποικιών υποδηλώνει θετικότητα για κολοβακτηριοειδή και κυρίως *E. coli* στην αντίστοιχη αραιώση του δείγματος του γάλακτος (εικόνα 9).

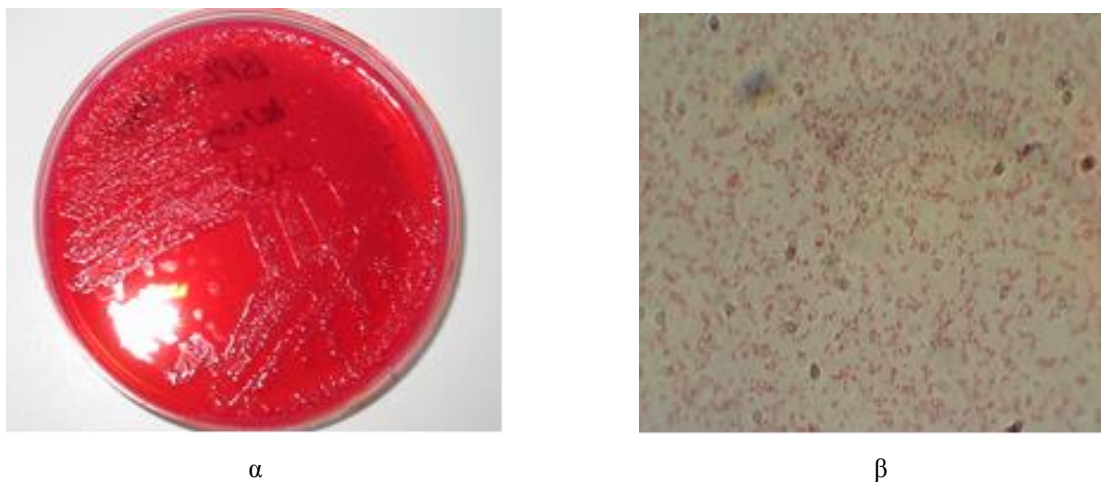
Οι χαρακτηριστικές αποικίες της *E. coli* που αναπτύχθηκαν στα υπό εξέταση δείγματα γάλακτος διατηρήθηκαν σε ζωμό στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20⁰C.

Για την επιβεβαίωση, από κάθε χαρακτηριστική αποικία που αναπτύχθηκε στο Endo agar γινόταν ενοφθαλμισμός σε σωλήνες που περιείχαν Peptone Water, μέσο το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστικού του οίκου. Οι σωλήνες τοποθετούνταν αμέσως σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 44,5±0,2 ⁰C και επωάζονταν για 24-48 h. Στη συνέχεια εκτελούνταν η δοκιμή της ινδόλης στους σωλήνες με Peptone water.

Ανάγνωση αποτελέσματος: Θετικό για *E. coli* αναγνωρίζεται το δείγμα γάλακτος του οποίου οι αποικίες της προκαταρκτικής δοκιμής σε Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) και Endo Agar δίδουν θετική δοκιμασία ινδόλης.

Εναλλακτικά των επιβεβαιωτικών δοκιμών IMViC (Indole, Methyl red, Voges-Proskauer, and Citrate) για την ταυτοποίηση των στελεχών του είδους *E. coli*

χρησιμοποιήθηκε, ακολουθώντας τις οδηγίες του προμηθευτή, το εμπορικό βιοχημικό σύστημα ταυτοποίησης API20E (FDA/CFSAN –BAM 2002).



Εικόνα 9: α) αποικίες *E. coli* σε VRBGA, β) Gram χρώση: *E. coli*

Απομόνωση στελεχών *E. coli* 157:H7 (Gundogan and Avcı 2014, Al-Gburi 2016, Adhikari et al 2017).

25 ml αντιπροσωπευτικής ποσότητας δείγματος μεταφέρεται σε αποστειρωμένο περιέκτη που περιέχει 225 ml θρεπτικού υποστρώματος τροποποιημένο trypticase soy broth (mTSB) με προσθήκη 20 mg / L novobiocin και στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στους 37°C για 24 h. Έπειτα από το προαναφερόμενο προεμπλουτισμένο υλικό πραγματοποιείται επιφανειακή επίστρωση σε θρεπτικό υπόστρωμα sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC), που διαθέτει εμπλουτιστικούς παράγοντες την cefixime (0.05 mg L⁻¹) και potassium tellurite (2.5 mg L⁻¹) και επώαση στους 37°C για 24 h. 5 αντιπροσωπευτικές αποικίες που δεν μεταβολίζουν την sorbitol επιλέγονται και ανακαλλιεργούνται με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης σε τρυβλία που περιέχουν ως θρεπτικό υπόστρωμα eosin methylen blue agar (EMB) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 24 h.

Οι απομονωθείσες αποικίες ελέγχθηκαν με βιοχημικές δοκιμασίες: (α) δοκιμή της Indole, (β) methyl red, (γ) voges-proskauer, (δ) citrate, (ε) urease, (στ) ζύμωση cellobiose, (η) β-glucuronidase παραγωγή και (θ) έλεγχος θολερότητας – ανάπτυξης σε θρεπτικό υπόστρωμα KCN broth.

Οροτύπηση: Χαρακτηριστικές αποικίες *Escherichia coli* που δίνουν τους παρακάτω τύπους δοκιμών: μη ζύμωση sorbitol, cellobiose (-), β-glucuronidase (-) και KCN (-) εισήλθαν σε έλεγχο οροτύπησης, με τη χρήση αντιορών του σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7 (Murex Wellcolex, UK).

4.2.4.5. Μέθοδος απομόνωσης και ταυτοποίησης στελεχών του γένους *Bacillus spp* (National Standard Method – enumeration of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species F15) .

Η προετοιμασία και η παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων του εξεταζόμενου δείγματος πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στις παραγράφους 4.2.2.1 και 4.2.2.2.

Στη μελέτη για την απομόνωση στελεχών του γένους *Bacillus spp* με κύριο αντιπρόσωπο τον *Bacillus cereus* χρησιμοποιήθηκε η National Standard Method – enumeration of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species F15, η οποία στο πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης στο Mannitol phenol red egg yolk polymixin agar (MEYP). Από όλες τις δεκαδικές αραιώσεις του κάθε δείγματος γάλακτος σε Ringer's solution, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.3.2, γίνεται απευθείας επιφανειακή σπορά, με τη βοήθεια κεκαμένης γυάλινης ράβδου 0,5ml εξεταζόμενου υλικού σε τρυβλία με MEYP.

Τα τρυβλία (Petri) εξετάζονται μετά από 18–24 h επώαση στους 30⁰C, όπως επίσης και μετά από 42-48 h για την εμφάνιση χαρακτηριστικών αποικιών. Τα στελέχη του είδους *Bacillus cereus* εμφανίζουν μεγάλες αποικίες, ιώδες προς το κόκκινο χρώμα (είναι μανιτόλη αρνητικά), ακανόνιστου σχήματος και περιβάλλονται από ζώνη υδρόλυσης της λεκιθίνης. Τα περισσότερα υπόλοιπα είδη του γένους *Bacillus spp* παρουσιάζουν μεγάλες, ακανόνιστες, κίτρινες αποικίες (λόγω της παραγωγής οξέος από τη ζύμωση της μανιτόλης) και είναι λεκιθινάση αρνητικά. Καταμετρούνται οι τυπικές αποικίες (εικόνα 10).

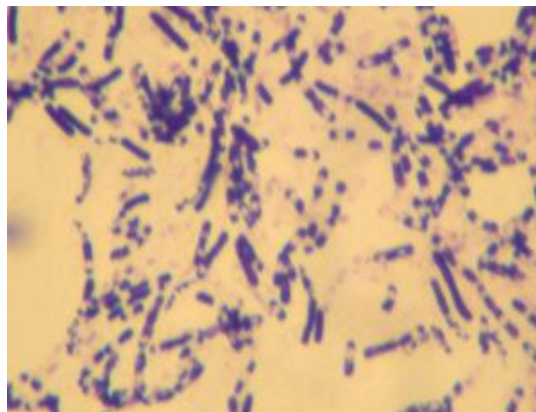
Από τις χαρακτηριστικές ή μη, αποικίες κάθε τρυβλίου γίνονται παρασκευάσματα Gram χρώσης και διεξάγονται οι βιοχημικές δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης.

Πρέπει να δοθεί προσοχή στο ότι κάποια μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* όπως *Proteus* και αρκετά στελέχη του είδους *Staphylococcus aureus*, παρουσιάζουν ανάπτυξη στο προαναφερόμενο θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας. Όμως η χαρακτηριστική εμφάνιση των αποικιών των στελεχών του γένους *Bacillus spp*, όπως και η χαρακτηριστική εμφάνισή τους μετά την εκτέλεση χρώσης Gram, δεν επιτρέπει κάποια λάθη στη μέθοδο.

Οι χαρακτηριστικές αποικίες του γένους *Bacillus spp* που αναπτύχθηκαν στα μελετώμενα δείγματα γάλακτος διατηρούνταν σε ζωμό Brain Heart Infusion στην κατάψυξη σε θερμοκρασία –20⁰C.



α



β

Εικόνα 10: α) Τυπικές αποικίες *Bacillus cereus* σε MEYP agar, β) Χρώση Gram

4.2.4.6. Έλεγχος ευαισθησίας στελεχών του είδους *S. aureus* στα χημειοθεραπευτικά

Σε αρχική φάση κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών του είδους *S. aureus* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά με κύριο αντιπρόσωπο αυτών τη μεθικιλίνη, προκειμένου να ταυτοποιηθούν μεθικιλίνη ανθεκτικά στελέχη (MRSA) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης του αντιβιοτικού στο άγαρ – μέθοδος του εμποτισμένου δίσκου που φέρει αντιβιοτικό cefoxitin (30mg), το οποίο έχει αποδειχθεί ως ο καλύτερος επαγωγέας της έκφρασης της πρωτεΐνης PBP2a στις συνήθεις συνθήκες του αντιβιογράμματος και επομένως εφαρμόζεται ως δείκτης ανίχνευσης των MRSA στελεχών (Clsi 2013, Eucast 2013, Adhikari et al 2017).

Τεχνική: Τα εξεταζόμενα στελέχη καλλιεργούνται σε Mannitol Salt Agar και γίνεται επώαση στους 37°C για 18 h. Ακολουθεί παρασκευή βακτηριακού εναιωρήματος σε 1 ml Tryptic Soy Broth (TSB) θολερότητας ίσης με το 0.5 του προτύπου θολοσιμετρικού διαλύματος της κλίμακας McFarland. Πραγματοποιείται επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλίο με Mueller Hinton άγαρ, με τη βοήθεια αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στυλεού. Οι δίσκοι των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη μέθοδο αποτελούνται από διηθητικό χαρτί και έχουν διάμετρο 6 mm. Οι δίσκοι τοποθετούνται με αποστειρωμένη λαβίδα, 5-15 min μετά τον ενοφθαλμισμό του βακτηρίου, ώστε να απορροφηθεί η υγρασία και σε απόσταση όχι μικρότερη των 24 mm από κέντρο σε κέντρο των δίσκων, ώστε να μην αλληλεπικαλύπτονται οι ζώνες αναστολής. Η επώαση των τρυβλίων που φέρουν τους δίσκους των αντιβιοτικών γίνεται στους 37 °C για 18-24 h. Όρια παρατηρηθέντων ζωνών αναστολής ≤ 21 mm χαρακτηρίζουν τα αντίστοιχα εξεταζόμενα στελέχη ως Μεθικιλίνη Ανθεκτικά στελέχη (MRSA).

Στην παρούσα μελέτη μόνο ένα στέλεχος χαρακτηρίστηκε ως Μεθικιλίνη Ανθεκτικό (MRSA).

Ο έλεγχος ευαισθησίας του συγκεκριμένου Μεθικιλίνη Ανθεκτικό (MRSA) στελέχους έγινε με τη μέθοδο διάχυσης του αντιβιοτικού στο άγαρ – μέθοδος των δίσκων εμποτισμένων σε αντιβιοτικό.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν και τα όρια των ζωνών αναστολής δίνονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Ερμηνευτικός πίνακας των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν και τα όρια των ζωνών αναστολής

Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση αντιβιοτικού (μg / ml)	Όρια ζωνών αναστολής (mm)	
		Ανθεκτικό ≤	Ευαίσθητο ≥
Tetracycline	30	14	19
Gentamicin	10	12	15
Erythromycin	15	13	23
Clindamycin	2	14	21
Fusidic acid	10	24	24
Kanamycin	30	18	13
Ciprofloxacin	5	15	21
Rifampin	5	16	20
chloramphenicol	30	12	18
Teicoplanin	30	10	14

4.2.4.7. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας με τη μέθοδο αραιώσης των αντιβιοτικών σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα (Ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του φαρμάκου - Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

Η ανίχνευση ανθεκτικότητας των απομονωθέντων στελεχών του είδους *S. aureus* MSSA (μεθικιλίνη ευαίσθητα στελέχη) και του είδους *E. coli* στα αντιβιοτικά προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου αραιώσης των αντιβιοτικών σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα («Broth microdilution method»), σύμφωνα με τα δεδομένα του Eucast 2003. Όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη ήταν πρότυπες ουσίες. Στην ετικέτα αναγραφόταν η περιεκτικότητά τους σε δραστική ουσία (συνήθως εκφράζεται σε μg ή σπανιότερα σε IU ανά mg ουσίας) και η προμήθειά τους έγινε από τη Difco Laboratories, USA και τη Sigma, St Louis, MO, USA, υπό τη μορφή σκόνης.

Προετοιμάστηκαν μητρικά διαλύματα (stock solutions) των αντιβιοτικών και η αποστείρωσή τους πραγματοποιήθηκε με διήθηση αυτών των διαλυμάτων με τη χρήση φίλτρων με διάμετρο 0,2 μm. Τα παρασκευασμένα διαλύματα διατηρήθηκαν σε συνθήκες

κατάψυξης στους -20°C και παρέμεναν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση τους. Στην αντίθετη περίπτωση γίνεται συμπύκνωση υδρατμών με αποτέλεσμα να καταστρέφονται (β -λακταμικά αντιβιοτικά) ή να αυξάνεται το βάρος τους (υγροσκοπικές ουσίες όπως οι αμινογλυκοσίδες) (Lennette and Balows 1985). Για την προετοιμασία των μητρικών διαλυμάτων, η πλεοψηφία των αντιβιοτικών διαλύθηκε σε αποστειρωμένο νερό. Όταν χρειάζεται επιπλέον διάλυση τότε χρησιμοποιούνται ως μέσο διάλυσης, σε όσο το δυνατόν μικρότερη συγκέντρωση, διαλύτες: 0.1 N HCl, methanol, dimethyl formamide και στην περίπτωση του αντιβιοτικού sulfamethoxazole ως διαλυτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,1 N NaOH.

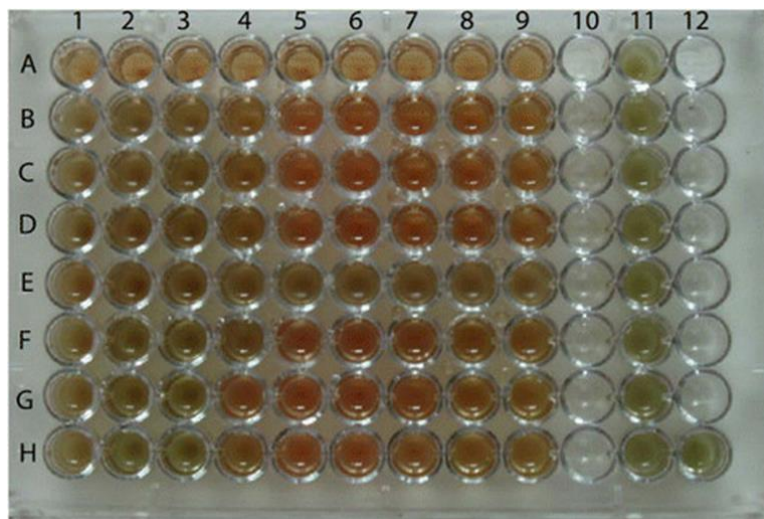
Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων ελέγχθηκαν ταυτόχρονα με τα εξεταζόμενα στελέχη και πρότυπα στελέχη

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή στην οποία στηρίζεται η μέθοδος αραιώσεων των αντιβιοτικών είναι η έκθεση καθορισμένης πυκνότητας μικροβιακού εναιωρήματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού (Barry 1976). Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού καλείται ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του αντιβιοτικού (Minimum Inhibitory Concentration, MIC). Η τιμή της MIC θεωρείται ως κριτήριο αναφοράς ώστε να ορισθεί η ευαισθησία ενός μικροοργανισμού. Με βάση τις πυκνότητες των αντιβιοτικών που επιτυγχάνονται στον ορό του αίματος των ζώων και των τιμών της MIC καθορίζονται 3 κατηγορίες ευαισθησίας μικροοργανισμών: Ευαίσθητοι (Susceptible), Μέτρια ευαίσθητοι (Intermediate) και Ανθεκτικοί (Resistant).

Στη παρούσα μελέτη το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Mueller-Hinton Broth (MHB) (Difco), που αποτελεί καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των περισσότερων παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης έχει μικρή περιεκτικότητα σε ουσίες που αναστέλλουν τη δράση των σουλφοναμιδών, τετρακυκλινών και αμινογλυκοσιδών. Στην περίπτωση ελέγχου της ευαισθησίας στην οξακιλλίνη έγινε προσθήκη 2% NaCl στο υλικό ώστε να ανιχνεύονται και τα οριακής αντοχής στελέχη, με μεγάλη ετερογένεια πληθυσμού (Lennette and Balows 1985, Nccls, Nccls 2000).

Η χρησιμοποιούμενη επιφάνεια, στη παρούσα μελέτη, για την εκτέλεση της δοκιμής αραιώσεων των αντιβιοτικών, ήταν η μικροπλάκα τιτλοποίησης 96 φρεατίων από πολυστυρένιο (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Απεικόνιση μικροπλάκας τιτλοποίησης 96 φρεατίων από πολυστυρένιο

Τεχνική της μεθόδου

Γίνονται υποδιπλάσιες αραιώσεις του μητρικού διαλύματος του αντιβιοτικού (1 mg/ml) σε αποστειρωμένο νερό. Συνήθως στο μητρικό διάλυμα η συγκέντρωση του αντιβιοτικού είναι 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Από κάθε αραιώση, γίνεται προσθήκη σε υγρό άγαρ σε αναλογία 1:10 mg/ml. Τα διαλύματα των αραιώσεων των εξεταζόμενων αντιβιοτικών δίνονται από τους τύπους:

Όγκος (mL) = ποσότητα που ζυγίστηκε (mg) X συγκέντρωση σε δραστική ουσία ($\mu\text{g}/\text{mg}$) / επιθυμητή συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (1)

Βάρος (mg)= όγκος (mL) X συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$) συγκέντρωση σε δραστική ουσία ($\mu\text{g}/\text{mg}$) (2)

Η πυκνότητα του καλλιεργήματος, που πρόκειται να ενοφθαλιστεί στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton Broth, πρέπει να είναι σταθερή, ώστε να μην έχει μεγάλες παρεκκλίσεις.

Με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου συλλέγονται 4-5 αποικίες καθαρής καλλιέργειας του εξεταζόμενου στελέχους και εμβολιάζονται σε 5 ml TSB. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰ C για 6-8 h.

Ρυθμίζεται η θολερότητα του προαναφερόμενου διαλύματος ώστε να είναι ίση με 0,5 της κλίμακας Mc Farland και αραιώνεται στη συνέχεια κατά 10 φορές με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό. Το μικροβιακό αυτό εναιώρημα περιέχει περίπου 10⁶ – 10⁷ cfu/ml (βακτηριακά κύτταρα ανά ml).

Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που μελετήθηκαν ήταν: 0,03, 0,06, 0,12, 0,25, 0,50, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 και 512 µg/ml σε Mueller-Hinton Broth.

Τοποθετήθηκε ποσότητα 50µl, διαλύματος των διαφόρων συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων αντιβιοτικών σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροτιτλοποίησης.

Λαμβάνεται ποσότητα 1 µl βακτηριακού εναιωρήματος με αποστειρωμένη πιπέτα και τοποθετείται σε κάθε φρεάτιο, όπου ήδη έχουν τοποθετηθεί οι διάφορες αριώσεις των αντιβιοτικών.

Ακολουθεί η επώαση υπό αερόβιες συνθήκες στους 37⁰ C για 24-32 h.

Καταγράφεται η MIC ως η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροβίου.

Στους πίνακες 12 και 13 παρουσιάζονται τα MICs που ισχύουν για τα στελέχη *S. aureus* και *E. coli*.

Πίνακας 12: Συνοπτικός ερμηνευτικός πίνακας που παρουσιάζει τα MICs, που ισχύουν για τα στελέχη του βακτηριακού είδους *S. aureus* (NCCLS 2000, CIPARS 2006, Health Canada 2012, CLSI 2013, EUCAST 2013).

Αντιμικροβιακοί παράγοντες	E ^a	M	A
	≤		≥
Penicillin G	0.12	-	0.25
Ampicillin	2	8	16
Oxacillin	2	-	4
Vancomycin	2	4-8	16
Teicoplanin	8	16	32
Erythromycin	0.5	1-4	8
Clindamycin	0.5	1-2	4
Tetracycline	4	8	16
Chloramphenicol	8	16	32
Gentamicin	4	8	16
Streptomycin	16	-	32
Fucidic acid	0.5	-	1
Cethalotin	4 -8	-	32
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	2/38	-	4/76
Enrofloxacin			4
Cethalexin	4	8	16
Ciprofloxacin	1	2	4
Tobramycin	4	8	16

^a: E: Ευαίσθητοι (Susceptible), M: Μέτρια ευαίσθητοι (Intermediate) και A: Ανθεκτικοί (Resistant)

Πίνακας 13: Συνοπτικός ερμηνευτικός πίνακας που παρουσιάζει τα MICs, που ισχύουν για τα στελέχη του βακτηριακού είδους *E. coli* (NCCLS 2000, CIPARS 2006, Health Canada 2012, CLSI 2013, EUCAST 2013).

Αντιμικροβιακοί παράγοντες	E ^a	M	A
	≤		≥
Ampicillin	8	16	32
Amicacin	-	-	64
Tetracycline	4	8	16
Chloramphenicol	8	16	32
Gentamicin	4	8	16
Streptomycin	16	32	64
Trimethoprim/Sulfamethanzole	2/38	-	4/76
Nalidixic acid	16	-	32
Cethalothin	4	8	32
Cefotaxime	2	-	4
Sulfathiozole	256	-	512
Ciprofloxacin	1	2	4

^a: E:Ευαίσθητοι (Susceptible), M: Μέτρια ευαίσθητοι (Intermediate) και A: Ανθεκτικοί (Resistant)

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής παρουσιάζονται μέσω συγκεντρωτικών πινάκων που απεικονίζουν την ανίχνευση και ποσοτική καταμέτρηση (cfu/ml) σε δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) και κοπράνων, τα οποία λήφθηκαν από πρόβατα ορεινών περιοχών του Νομού Άρτας (από 75 εκτροφές, σε σύνολο περίπου 5.080 ζώων), όπως περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος.

Στους πίνακες 14 έως και 25 δίνονται τα αποτελέσματα των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητα του φαρμάκου, έναντι των απομονωθέντων στελεχών *E. coli* και *S. aureus* (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα), από πρόβατα που αντιστοιχούν σε ομάδες που περιγράφονται στις ενότητες Πειραματικό Μέρος – 4.1 Δείγματα.

Στους πίνακες 26 έως και 37 καταγράφεται η κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) έναντι των απομονωθέντων στελεχών *E. coli* και *S. aureus*.

Πίνακας 14: Καταμέτρηση (cfu/ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νοπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Α (μάρτυρες)

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
					Βλαστικές Μορφές	Σπορογόνες μορφές
1	-	-	-	2,78	-	+++
2	-	-	-	-	-	+
3	-	-	<1,00	-	-	++
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	2,90	+	++
7	-	-	-	-	-	++
8	3,38	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	2,76	-	+
11	-	-	-	-	+	-
12	-	1,70	-	-	-	++
13	-	-	-	2,04	+	++
14	-	-	-	1,95	++	+++
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	<1,00	-	-	+
17	-	-	1,95	-	-	+
18	-	-	-	2,11	-	+
19	-	-	-	-	-	+
20	-	-	1,78	-	-	+

21	-	-	1,00	-	-	+
22	-	-	-	-	-	+
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	2,20	-	-	++
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	+++
29	-	-	2,45	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	4,40	1,90	-	2,30	-	-
32	-	-	-	2,70	-	+
33	-	-	-	-	-	+
34	-	-	-	-	-	+
35	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	+
38	-	-	-	-	-	-
39	4,26	2,00	2,30	-	-	++
40	-	-	-	2,08	-	-
41	-	-	1,00	-	+	+
42	-	-	-	2,08	-	+
43	-	-	-	-	-	+
44	-	-	2,08	2,60	-	++
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	++
48	-	-	-	-	-	+++
49	-	-	-	2,08	-	-
50	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	+
52	-	-	-	-	-	+
53	-	-	-	-	-	+
54	-	-	-	2,20	-	+
55	3,48	-	1,60	2,26	-	+
56	-	-	-	2,28	-	-
57	-	-	1,00	-	-	++
58	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	+	+
60	-	-	-	-	-	+
61	-	-	2,08	2,30	-	+
62	-	-	-	-	-	+
63	-	-	-	1,90	-	+
64	-	-	-	-	-	+
65	-	-	2,26	-	-	+
66	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-

69	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	+	-
71	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	+
73	-	-	-	-	-	+
74	3,30	2,41	-	2,08	+	++
75	-	-	2,08	-	-	+
76	-	-	-	-	-	+
77	-	-	-	-	-	+
78	-	-	<1,00	2,40	-	-
79	-	1,78	-	1,90	++	-
80	-	-	1,00	-	-	+
81	-	-	2,04	-	-	+
82	-	-	-	-	-	+
83	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-
87	-	-	-	2,26	-	+
88	-	-	-	1,20	-	+
89	-	-	-	-	++	-
90	-	-	-	-	-	+++
91	-	-	2,08	2,45	++	+
92	-	-	2,48	2,69	-	+
93	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	1,90	+	++
95	-	-	1,00	1,78	-	++
96	-	-	1,00	1,90	-	-
97	-	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	-	-
99	-	-	2,53	2,15	-	+
100	-	-	-	-	+	+

Πίνακας 15: Καταμέτρηση (cfu/ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νοπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας B1 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη)

- *: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.
Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>		
					Βλαστικές Μορφές	Σπορογόνες μορφές	
1	-	-	-	-	-	+	
2	-	-	-	-	-	+	
3	2,15	-	-	2,70	-	-	
4	-	-	-	2,40	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	
6	-	2,41	-	-	-	+	
7	-	-	<1,00	-	-	+	
8	-	-	<1,00	-	-	+	
9*	1,90	-	2,53	2,08	-	++	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
10	-	-	-	-	+	+	
11	-	-	-	-	-	++	
12	-	-	-	1,90	-	+	
13	-	-	-	2,08	-	+	
14	-	-	2,26	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	+	+++	
17	-	-	-	-	-	-	
18*	2,38	2,49	-	-	-	+	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
19	-	-	<1,00	2,61	+	-	
20	2,08	-	2,32	-	-	+	
21	-	-	-	-	-	+	
22*	1,90	-	-	-	-	+	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
23	-	-	-	-	+	+	

24	-	-	<1,00	2,32	-	+
25	2,08	-	2,45	-	-	+
26	-	-	2,76	-	-	-
27	-	-	-	-	+	-
28	2,39	-	-	2,41	-	-
29	-	-	-	-	-	+
30	-	-	2,08	-	-	++
31	-	-	-	-	-	++
32	2,53	-	-	-	+	+
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	+
35	2,08	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-
37	2,74	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	+
39	-	-	2,38	-	+	-
40	-	-	<1,00	-	-	+
41	-	-	-	-	++	+
42	-	-	-	-	+	-
43	-	-	-	-	+	++
44	-	2.06	-	<1,00	-	+++
45	2.10	-	-	-	-	-
46	3.10	-	-	2.4	-	-
47	-	-	-	-	+++	-
48	-	-	-	3.6	+	-
49	-	-	<1,00	1.98	-	+
50	-	-	3.40	<1,00	-	+
51	-	-	2.56	<1,00	-	+
52	2.56	-	-	-	+	-
53	-	-	-	-	++	-
54	-	-	-	-	+	+
55	<1,00	-	3.56	-	-	+
56	-	-	2.58	<1,00	-	-
57	-	-	3.10	1.98	-	++
58	3.10	<1,00	-	2.10	+	-
59	2.56	-	-	-	-	-
60	<1,00	-	-	-	+	-
61	<1,00	-	-	2.54	-	-
62	-	-	-	2.10	-	+++

63	-	-	-	-	+	-
64	-	<1,00	<1,00	-	-	-
65	-	-	2.54	-	-	-
66	-	-	-	2.54	-	+++
67	-	-	-	<1,00	-	++
68	2.56	1.45	-	-	+	-
69	1.90	<1,00	-	-	-	-
70	1.86	<1,00	-	-	+	-
71	-	-	3.56	-	-	-
72	-	-	2.45	<1,00	-	++
73	-	-	-	<1,00	-	+
74	-	-	-	<1,00	-	-
75	-	-	-	-	-	-
76	-	-	3.78	-	-	-
77	<1,00	-	3.5	1.54	+	-
78	<1,00	-	-	-	+	-
79	-	-	-	-	+	-
80	-	-	-	2.54	-	+
81	2.45	-	-	-	+	+
82	1.96	-	<1,00	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	<1,00	-	+
85	-	-	3.4	<1,00	-	+
86	-	-	2.12	<1,00	-	+
87	-	<1,00	-	-	+	-
88	-	-	-	-	-	+
89	-	-	-	<1,00	-	-
90	-	-	-	-	-	-
91*	<1,00		-	-	-	++
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	-				
92	-	-	-	-	-	-
93	-	-	3.10	<1,00	-	-
94	-	-	1.85	1.58	-	-
95	<1,00	-	-	-	+	-
96	1.98	-	-	-	-	-
97*	2.54		-	-	-	-
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	+				
98	-	-	-	<1,00	-	++

99	-	-	2.45	2.54	-	++
100	<1,00	-	-	-	-	-

Πίνακας 16: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νοπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Γ1 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.
Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
					Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές
1	-	-	-	-	+	+
2	-	-	-	2,26	+	+
3	<1,00	-	-	2,59	+	+
4	-	-	-	2,49	-	+
5	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	+
7	-	-	-	2,26	++	-
8	-	-	-	1,90	+	+
9	-	<1,00	-	2,30	-	+
10	-	-	-	-	++	+
11	-	-	-	-	-	++
12	-	-	-	2,45	+	++
13	-	-	-	2,48	-	-
14	-	-	2,66	-	-	+
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	2,30	++	+
17	-	-	-	-	-	+
18	-	1,30	-	-	+	-
19	-	-	-	2,60	+	+
20	-	-	<1,00	-	-	-
21	-	-	-	-	-	+
22	-	-	-	2,00	+	+
23	-	-	-	-	-	+
24	-	-	-	2,30	-	+
25	-	-	-	2,00	+	+
26	-	-	<1,00	-	+	+
27	-	-	-	-	+	+

28	1,30	2,00	-	-	-	+
29	-	-	-	-	-	++
30	-	-	-	-	-	++
31	-	-	-	-	+	+
32	-	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	+
35	-	-	<1,00	-	-	-
36	-	-	-	1,78	+	-
37	<1,00	1,48	-	-	+	+
38	-	-	-	-	-	+
39	-	-	2,60	-	-	-
40	-	-	<1,00	-	-	-
41	-	-	1,56	-	+	++
42	-	-	-	-	+	+
43	-	-	-	-	-	+++
44	<1,00	-	1,58	-	+	-
45	-	-	-	-	+	+
46	-	-	-	-	-	++
47	-	-	1,28	-	+	+++
48	-	-	-	-	-	+
49	-	-	-	-	-	++
50	-	-	-	-	-	+
51	-	-	-	-	-	+
52	-	<1,00	-	1,90	+	-
53	-	-	2,10	-	+	+++
54	-	-	<1,00	-	+	++
55	-	-	<1,00	-	+	++
56	-	-	-	-	-	+++
57	-	-	1,98	2,54	-	+
58	<1,00	-	-	-	-	-
59	<1,00	-	-	1,68	-	-
60	-	-	-	-	-	++
61	-	-	-	-	-	++
62	-	-	2,54	-	+	-
63	-	-	-	2,54	-	-
64	-	-	-	-	-	-
* 65	1,98	-	-	-	-	++
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	-				
66	-	-	2,54	-	+	++
67	-	-	<1,00	-	-	+

68	-	-	-	2.54	-	+
69	-	1.96	-	3.10	-	-
70	-	<1,00	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-
* 72	1,90	-	2.68	-	+	+++
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	-				
73	-	-	-	-	-	+
74	-	-	-	-	-	-
75	<1,00	-	-	<1.00	-	-
76	-	-	<1.00	2.54	-	++
77	-	1.98	-	-	-	-
78	-	-	-	-	+	-
79	-	-	-	-	++	-
80	-	-	-	-	+	+
81	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	++	-
84	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	3.10	-	-
86	-	-	-	<1.00	-	-
87	-	-	<1.00	<1.00	+	+
88	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	2.10	-	-
91	-	<1,00	2.10	-	-	-
92	<1,00	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	++	-
95	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-
97	-	-	-	-	-	-
98	-	-	2.54	3.10	-	+
99	-	-	1.58	1.85	-	-
100	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 17: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νωπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Β2 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.
Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
						Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές
* 1	2,36		-	<1,00	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	+					
2	-		-	<1,00	-	-	+
3	-		-	-	-	-	++
4	-		-	-	-	-	+
5	-		<1,00	-	-	+	-
* 6	2,79		-	-	2,40	-	++
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	-					
7	-		-	2,36	2,81	-	-
8	-		-	-	-	-	-
9	-		-	-	-	-	+
10	-		-	-	-	-	-
11	-		-	-	-	-	+
12	2,38		-	2,79	2,08	-	-
13	-		-	-	-	+	+
14	-		-	<1,00	2,00	-	-
15	2,04		-	-	-	-	-
16	-		-	-	-	+	+
17	-		-	-	-	+	+
18	-		-	-	-	-	+
19	-		-	1,30	-	-	+
20	2,69		-	-	2,48	-	-
21	-		-	-	-	+	-
22	2,26		-	-	2,45	-	+
23	-		-	-	-	+	-
* 24	1,90		-	-	2,69	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	+					

25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	+
27	-	-	-	-	+	-
* 28	2,30		-	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	-				
29	-	-	2,00	1,95	+	-
30	-	-	2,38	-	-	-
31	<1,00	-	-	-	-	-
32	<1,00	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-
36	-	<1,00	-	1.85	+	-
37	-	1.98	-	-	-	-
38	1,98	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	<1,00	<1,00	-	+
41	-	-	-	-	-	-
42	-	<1,00	-	-	-	-
43	2,5	-	-	-	-	-
44	-	-	-	2.95	-	-
45	-	-	-	<1,00	-	-
46	-	-	2.95	<1,00	+	+
47	<1,00	-	-	-	-	-
48	-	2.10	-	-	+	-
49	-	-	<1,00	-	-	+
50	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 18: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα ναπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Γ2 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.

Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>psp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
						Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές
* 1	1,30		<1.00	-	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	+					
2	-		-	-	-	-	+
3	-		-	-	-	+	+
4	-		-	-	2,08	-	+
* 5	2,00		-	<1.00	2,00	++	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	+					
6	2,70		-	-	-	-	+
7	-		-	2,48	2,54	-	+
8	-		-	-	-	-	-
9	-		-	-	1,90	-	+
10	-		-	2,30	-	-	+
11	-		-	-	-	+	+
12	-		-	-	2,30	+	+
13	-		-	-	-	-	+
14	-		-	-	2,26	+	-
* 15	2,53		<1.00	<1.00	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	-					
16	-		-	<1.00	-	-	++
17	2,49		-	<1.00	2,08	-	++
18	-		-	-	-	-	++
19	-		-	-	1.00	+	+
20	-		-	<1.00	-	+	+
21	-		-	-	2,32	-	+
22	-		<1.00	-	-	++	+

23	-	-	-	-	+	+	
24	-	-	-	2,41	-	+	
25	-	-	-	-	-	+	
26	-	-	-	-	-	+	
27	1,00	-	-	-	-	+	
28*	2,49		2,08	-	2,08	++	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	-					
29	-	-	-	-	-	-	
30	-	-	2,83	1,00	-	-	
31	-	-	-	2,50	-	+	
32	-	-	-	3,10	-	+	
33	-	-	-	2,54	-	-	
34	-	-	-	2,10	-	-	
35	-	-	-	1,58	-	-	
36	-	-	1,58	-	++	-	
37	-	-	-	-	++	-	
38	-	-	-	-	++	-	
39	-	-	-	-	+++	-	
40	-	-	-	-	++	-	
41	-	-	-	-	+	+	
42	-	-	-	-	-	+++	
43	2,10	-	-	<1,00	-	-	
44	-	-	-	-	-	+++	
45	-	-	-	-	-	+++	
46	-	-	2,95	-	+	-	
47	-	-	-	1,98	-	+	
48	-	-	1,98	-	-	+	
49	<1,00	-	-	-	+	+	
50	-	-	-	-	+	+	

Πίνακας 19: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νοπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας B3 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.
Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>Spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
					Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές
1	-	-	1,00	-	-	+
2	-	-	-	-	+	-
3	2,08	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	2,64	-	-	+
6	2,08	-	-	-	-	-
7	2,00	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	++
9	-	-	-	-	+	-
10	2,56	-	2,49	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	-
13	-	-	1,00	-	+	+
14*	2,73		-	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	-				
15	-	-	-	-	++	-
16*	2,28		-	-	+	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	+				
17	2,00	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	+	-
20	2,32	-	-	-	-	+
21	-	-	2,08	-	-	+
22	-	-	-	-	+	+
23*	2,28		-	-	++	-
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				

	+	+					
24	-		-	-	2,00	-	+
25	-		-	1,90	-	-	-
26	-		-	1,00	-	-	+
27	2,08		-	2,00	-	-	-
28*	2,04		-	-	-	+	-
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	+					
29	-		-	-	-	-	-
30	-		-	1,00	-	-	+
31	-		-	-	-	-	+
32	-		-	-	-	-	-
33	-		-	-	-	+	-
34	-		-	-	-	-	-
35	-		-	<1,00	<1,00	-	-
36	-		<1,00	-	-	-	-
37	<1,00		-	-	-	+	-
38*	1,96		-	-	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	-					
39	-		-	1,98	-	-	+
40	-		<1,00	-	-	+	-
41	-		-	-	-	-	
42	-		-	-	-	+	-
43	2,54		-	-	-	-	-
44	-		-	-	1,18	+	-
45	-		-	-	-	-	-
46	-		1,54	-	-	++	-
47	<1,00		-	-	-	-	+
48	<1,00		-	<1,00	-	-	-
49	-		-	-	-	-	+
50	-		-	-	-	-	-

Πίνακας 20: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα νωπού γάλακτος προβατίνων της ομάδας Γ3 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.
Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>Spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>		
					Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές	
1	-	-	<1.00	-	-	+	
2	-	-	-	-	-	+	
* 3	1,00	-	-	-	-	+	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
4	-	-	<1.00	-	-	-	
5	-	-	-	-	+	+	
6	-	-	-	-	-	-	
7	1,00	-	-	-	-	-	
* 8	1,00	-	-	-	+	+	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
9	-	-	-	-	-	-	
10	1,90	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	-	+	
* 12	1,00	-	-	-	-	+	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
13	-	-	-	-	-	-	
* 14	2,60	-	-	-	-	+	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
* 15	<1,00	-	-	-	+	+	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
16	-	-	-	-	-	+	
* 17	2,32	-	-	-	-	+	

	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	-					
18	-		-	1.98	-	-	+
19	-		-	<1.00	-	-	+
20*	<1,00		-	-	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	-					
21	-		<1.00	-	-	-	+
22	-		-	-	-	-	+
23	-		-	-	<1,00	+	-
24	-		-	-	2,30	-	+
25	-		-	2,32	-	-	-
26	-		-	-	-	-	+
27	-		-	-	-	-	-
28*	2,61		-	-	-	-	++
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	+					
29	-		-	-	-	-	+
30	-		-	-	-	-	+
31	-		-	2.56	-	-	+
32	-		-	1.98	-	-	+
33	-		-	-	-	-	+++
34	-		-	2.10	-	-	+
35*	<1,00		-	-	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	-					
36	-		-	-	-	-	+++
37*	<1,00		-	-	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση					
	+	-					
38	-		-	-	-	-	++
39	-		-	-	-	-	+
40	-		<1.00	-	2.68	+	-
41	-		-	2.22	<1.00	-	++
42	-		--	-	-	-	+++
43	-		-	-	-	-	+
44	-		-	-	-	-	+
45	-		-	1.54	-	-	-
46	-		-	-	-	-	++

47	<1,00	-	-	-	-	+
48	<1,00	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	++

Πίνακας 21: Καταμέτρηση (cfu/ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας B1 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.

Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
					Βλαστικές Μορφές	Σπορογόνες μορφές
1	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	+
3	<1,00	-	-	-	-	+
4	<1,00	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	+
13	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	-
16	1,45	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	<1,00	-	-	-	-	+
19	-	-	-	-	-	+
20	<1,00	-	-	-	-	+
21	-	-	-	-	-	+
22*	2,55	-	-	-	-	+
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				

	+	+					
23	-		-	-	-	-	+
24	-		-	-	-	-	+
25	-		-	-	-	-	+
26	-		-	-	-	-	-
27	-		-	-	-	-	-
28	<1,00		-	-	-	-	-
29	<1,00		-	-	-	-	+
30	-		-	2,95	-	-	+
31	-		-	-	-	-	+
32	-		-	-	-	-	+
33	-		-	-	-	-	+
34	-		-	-	-	-	+
35	-		-	-	-	-	-
36	-		-	-	-	-	-
37			-	-	-	-	-
38	-		-	-	<1,00	-	+
39	<1,00		-	-	-	-	-
40	<1,00		-	<1,00	-	-	+
41	-		-	-	-	-	+
42	-		-	-	-	-	-
43	-		-	-	-	-	+
44	-		-	-	-	-	+
45	-		-	<1,00	-	-	-
46	-		-	-	-	-	-
47	-		-	-	-	-	+
48	-		-	-	-	-	-
49	-		-	-	-	-	+
50	-		-	<1,00	-	-	+
51	-		-	<1,00	<1,00	-	+
52	1,45		-	-	-	-	-
53	-		-	-	-	-	-
54	-		-	<1,00	-	+	+
55	<1,00		-	<1,00	-	-	+
56	-		-	-	-	-	-
57	-		-	-	-	-	+
58	-		-	-	-	-	-
59	1,10		-	-	-	-	-
60	-		-	-	<1,00	-	+

61	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	+
63	-	-	-	-	-	-
64	-	-	<1,00	-	-	-
65	-	-	-	-	-	+
66	-	-	-	-	-	+
67	-	-	-	<1,00	-	+
68	-	-	-	<1,00	-	-
69	<1,00	-	-	<1,00	-	-
70	<1,00	-	<1,00	-	-	-
71	1,35	-	<1,00	-	-	-
72	-	-	1,30	<1,00	-	+
73	-	-	-	-	-	+
74	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-
76	-	-	4,80	-	-	-
77	-	-	<1,00	-	-	+
78	<1,00	-	-	-	-	+
79	<1,00	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	+
81	-	-	-	-	-	+
82	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	<1,00	-	+
85	-	-	<1,00	<1,00	-	+
86	-	-	<1,00	<1,00	-	+
87	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	+
89	-	-	-	<1,00	-	+
90	-	-	-	-	-	-
91	-	-	-	-	-	+
92	-	-	-	-	-	-
93	-	-	3,60	<1,00	-	-
94	-	-	<1,00	<1,00	-	-
95	-	-	-	-	-	-
96	<1,00	-	-	-	-	-
* 97	1,10		-	-	-	++
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	+				

98	-	-	-	<1,00	-	+
99	-	-	4,60	<1,00	-	+
100	<1,00	-	-	-	-	-

Πίνακας 22: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας Γ1 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.

Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
					Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές
1	-	-	-	-	+	++
2	-	-	-	-	+	++
3	<1,00	-	-	-	+	+
4	-	-	-	1.58	+	+++
5	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	1.30	+	-
8	-	-	-	1,90	+	+++
9	-	-	-	-	+	+++
10	-	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	-	++
12	-	-	-	<1,00	+	++
13	-	-	-	<1,00	-	++
14	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	+	+
16	-	-	-	<1,00	+	+
17	-	-	-	-	-	+
18	-	-	-	-	+	+
19	-	-	-	<1,00	+	+
20	-	-	-	<1,00	+	-
21	-	-	-	-	-	+
22	2,30	-	-	-	++	++
23	-	-	-	-	-	+
24	-	-	-	-	-	+
25	-	-	-	-	+	+

26	-	-	-	-	+	+
27	-	-	-	-	+	+
28		-	-	-	-	+
29	-	-	-	-	-	++
30	-	-	-	-	-	++
31	-	-	-	-	+	+
32	-	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	-	+
34	-	-	-	-	-	++
35	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	1.40	+	++
37	<1,00	-	-	-	+	+
38	-	-	-	1.90	-	+
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	+	++
42	-	-	-	-	+	+
43	-	-	-	-	+	+++
44	<1,00	-	-	-	+	-
45	-	-	-	-	+	+
46	-	-	-	-	-	++
47	-	-	-	-	+	+++
48	-	-	-	-	-	+
49	-	-	-	-	-	++
50	-	-	-	-	-	+
51	-	-	-	-	-	+
52	-	-	-	1.90	+	+
53	-	-	-	-	+	+++
54	-	-	-	-	+	++
55	-	-	-	-	+	++
56	-	-	-	-	-	+++
57	-	-	-	2.54	-	+
58	<1,00	-	-	-	+	-
59	<1,00	-	-	1.68	-	-
60	-	-	-	2.54	-	++
61	-	-	-	-	-	++
62	-	-	-	-	+	-
63	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-
66	<1,00	-	-	-	+	++
67	-	-	-	-	-	+
68	-	-	-	-	-	+
69	-	-	-	-	-	-

70	-	-	-	-	+	-	
71	-	-	-	-	-	-	
* 72	2,54		-	-	2.45	+	+++
	Φ.X.	-					
	+	-					
73	-	-	-	-	+	+	
74	-	-	-	-	-	+	
75	<1,00	-	-	-	-	-	
76	-	-	-	-	-	++	
77	-	-	-	-	-	-	
78	-	-	-	-	+	-	
79	-	-	-	-	++	-	
80	-	-	-	-	+	+	
81	-	-	-	-	-	++	
82	-	-	-	-	-	-	
83	-	-	-	-	++	+++	
84	-	-	-	-	-	++	
85	-	-	-	-	-	-	
86	-	-	-	-	-	++	
87	-	-	-	-	+	+	
88	-	-	-	-	-	-	
90	-	-	-	-	-	-	
91	-	-	-	-	-	+	
92	<1,00	-	-	<1,00	-	-	
93	-	-	-	<1,00	-	+	
94	-	-	-	-	++	+	
95	-	-	-	-	-	-	
96	-	-	-	-	-	-	
97	1,30	-	-	-	-	-	
98	-	-	-	-	-	+	
99	-	-	-	-	-	++	
100	-	-	-	-	-	+	

Πίνακας 23: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας B2 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη)

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
					Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές
1		-	-	-	-	+++
2	-	-	-	-	-	-
3	-	<1,00	-	-	-	-
4	-	<1,00	-	-	-	-
5	-	<1,00	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	+
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	-	-
12	<1,00	-	-	-	-	-
13	<1,00	-	-	-	-	-
14	<1,00	-	<1,00	-	-	+
15	<1,00	-	<1,00	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	+
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	<1,00	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	<1,00	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	<1,00	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	<1,00	<1,00	-	-	-	+++
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	<1,00	-	-	-	-	-

32	<1,00	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	<1,00	-	-	-	+
35	-	<1,00	-	-	-	-
36	-	<1,00	-	-	-	-
37	-	3.10	<1,00	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	-	<1,00	-	-	-	-
42	-	<1,00	1.30	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	+
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	+
48	-	<1,00	-	-	-	-
49	-	-	1.10	-	-	+
50	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 24: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας Γ2 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.
Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>psp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>		
					Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές	
1	<1,00	<1,00	-	-	-	+	
2	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	+	
5 *	1,35	-	-	-	+	+	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
6	2,70	-	-	-	-	-	
7	-	2,10	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	+	
9	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	+	
11	-	-	-	<1.00	-	-	
12	-	-	-	-	+	-	
13	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	+	+	
15 *	2,53	1,35	-	-	+	-	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
16	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	++	
18	-	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	
20	-	-	<1.00	-	-	-	
21	-	<1.00	-	-	-	-	
22	-	<1.00	-	-	-	-	
23	-	-	-	<1.00	-	-	

24	1,45	-	-	<1.00	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	<1,00	-	-	-	-	-
28		2,08	-	-	-	+
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	+	-
32	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	+
35	-	<1.00	-	-	-	-
36	-	<1.00	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	+
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-
43	<1,00	-	-	-	+	-
44	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-
48	-	-	2.54	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 25: Καταμέτρηση (cfu /ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατινών της ομάδας B3 (γάλα από προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.

Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

a/a	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>Spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>		
					Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές	
1	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	+	
9	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	<1.00	-	-	
12	-	-	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	+	-	
14*	3,4	-	-	-	-	-	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						+
15	-	-	-	-	-	-	
16*	2,85	-	-	-	-	-	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						+
17	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	-	
21	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	-	
23*	1,10	-	-	-	+	-	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-

24	-	-	-	<1.00	+	+
25	-	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	-	++
27	-	-	-	-	-	-
28 *	<1,00		-	-	-	-
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	-				
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	+++
31	-	-	-	-	-	++
32	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-
37	<1,00	-	-	-	-	-
38		-	-	-	-	+
39	-	-	-	-	-	++
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	
42	-	-	-	-	-	-
43	<1,00	-	-	-	-	-
44	-	-	-	<1.00	-	-
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	+++
48	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 26: Καταμέτρηση (cfu/ml) και απομόνωση βακτηρίων από δείγματα κοπράνων προβατίνων της ομάδας Γ3 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής)

*: Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις περιπτώσεις φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών της *E. coli* O157:H7 με τη βοήθεια βιοχημικών δοκιμών και αποτελέσματα οροτύπησης με τη χρήση σωματικού αντιγόνου O157 και του βλεφαριδικού αντιγόνου H7.

Φ. Χ.: Ταυτοποίηση της *E. coli* O157:H7 βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

α/α	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>Spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>		
					Βλαστικές μορφές	Σπορογόνες μορφές	
1	-	-	<1.85	-	+	+	
2	-	-	-	-	-	+	
3		-	-	-	-	+	
4	-	-	<1.00	-	-	-	
5	-	-	-	-	++	+	
6	-	-	1.10	-	-	-	
7	1,00	-	-	-	-	-	
8		-	-	<1.00	+	+	
9	-	-	-	-	-	-	
10	1,90	-	1.35	-	+	-	
11	-	-	-	-		+	
12 *	1,00	-	-	<1.00	++	+	
	Φ.Χ.						Οροτύπηση
	+						-
13	-	-	<1.00	-	-	-	
14		-	<1.00	-	++	++	
15		-	<1.00	-	+	+	
16	-	-	-	-	-	+	
17		-	-	-	-	+	
18	-	-	2.50	-	-	+	
19	-	-	<1.00	-	++	*	
20		-	-	-	-	+	
21	-	-	-	-	-	+	
22	-	-	-	-	-	+	

23	-	-	-	-	++	++
24	-	-	-	<1.00	-	+
25	-	-	1.10	<1.00	-	-
26	-	-	-	-	-	+
27	-	-	-	-	-	-
28*	2,61		-	-	++	+++
	Φ.Χ.	Οροτύπηση				
	+	+				
29	-	-	-	-	-	+
30	-	-	-	-	-	+
31	-	-	2.85	-	-	+
32	-	-	2.10	-	-	+
33	-	-	-	-	++	+
34	-	-	1.85	-	-	+
35	-	-	-	-	-	+
36	-	-	-	-	++	++
37	3,65	-	1.10	-	+	+
38	-	-	-	-	-	++
39	-	-	-	-	-	+
40	-	-	-	-	++	-
41	<1,00	-	1.85	1.85	-	++
42	<1,00	--	-	-	++	++
43	-	-	-	-	-	+
44	-	-	-	-	-	+
45	-	-	1.10	-	+	-
46	-	-	-	-	-	++
47	<1,00	-	-	-	-	+
48	<1,00	-	-	-	++	-
49	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	++

Πίνακας 27: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (µg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας B1 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη) για τα απομονωθέντα στελέχη της *E. coli*

BI	Am	Amc	Te	Chl	Ge	St	Tr/ Sulf	Nl a	Ce	Cef	Cip	Sulf
<i>E. coli</i> 3*	16	4	32	32	8	64	1 ^a /19 ^b	8	16	1	0,5	64
<i>E. coli</i> 9 O157 - H7	16	8	4	8	4	8	2/38	32	32	4	2	64
<i>E. coli</i> 18 O157 - H7	16	4	32	4	2	8	2/38	32	4	1	1	128
<i>E. coli</i> 20	64	4	2	4	1	128	2/38	8	64	1	1	32
<i>E. coli</i> 22 O157 - H7	64	4	2	4	2	8	2/38	8	4	2	0,5	32
<i>E. coli</i> 25	64	4	4	32	2	32	1/19	16	4	2	0,25	64
<i>E. coli</i> 28	64	4	16	32	2	4	1/19	8	4	2	1	64
<i>E. coli</i> 32	8	8	4	4	1	4	1/19	4	4	1	1	32
<i>E. coli</i> 35	16	2	2	4	2	8	1/19	32	4	1	1	32
<i>E. coli</i> 37	64	4	8	4	4	64	2/38	32	4	1	0,5	64
<i>E. coli</i> 45	4	4	2	16	2	8	2/38	64	4	2	0,25	64
<i>E. coli</i> 46	8	4	2	4	2	8	2/38	8	2	2	0,25	128
<i>E. coli</i> 52	8	4	16	8	2	16	2/38	32	4	8	4	128
<i>E. coli</i> 55	16	4	2	8	2	16	1/19	32	4	1	1	128
<i>E. coli</i> 58	64	8	4	8	2	8	1/19	4	4	4	2	64
<i>E. coli</i> 59	64	8	2	4	2	64	2/38	4	16	1	0,5	64
<i>E. coli</i> 60	64	4	2	32	1	4	2/38	8	16	1	0,5	128
<i>E. coli</i> 61	64	8	2	32	1	4	2/38	8	4	2	0,5	64
<i>E. coli</i> 68	64	8	4	4	8	8	1/19	4	2	2	1	64
<i>E. coli</i> 69	8	8	2	8	4	8	1/19	32	2	1	1	64
<i>E. coli</i> 70	64	4	16	4	2	64	1/19	32	2	1	0,5	128
<i>E. coli</i> 77	4	4	32	2	1	32	2/38	32	4	1	0,25	64
<i>E. coli</i> 78	4	8	4	4	1	16	2/38	4	1	0,5	1	64
<i>E. coli</i> 81	4	4	2	4	1	8	2/38	4	2	0,5	1	128
<i>E. coli</i> 82	8	4	2	8	2	8	2/38	32	2	1	0,5	64
<i>E. coli</i> 91 O157 - H7	64	8	2	2	2	64	1/19	4	2	4	0,5	128
<i>E. coli</i> 95	8	4	4	8	2	8	2/38	8	4	0,5	1	64
<i>E. coli</i> 96	8	4	4	8	1	4	2/38	8	4	1	0,5	64
<i>E. coli</i> 97 - O157 - H7	128	2	16	32	8	128	1/19	4	4	4	1	64
<i>E. coli</i> 100	4	4	4	4	1	8	2/38	4	4	1	0,25	64

^a: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^b: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Συνομογραφίες:

Am: Ampicillin	Tr/Sulf: Trimethoprim/Sulfamethoxazole
Amc: Amicacin	Nl a: Nalidixic acid
Te: Tetracycline	Ce: Cethalotin
Chl: Chloramphenicol	Cef: Cefotaxime
Ge: Gentamicin	Cip: Ciprofloxacin
St: Streptomycin	Sulf: Sulfathiazole

Οι συνομογραφίες αναφέρονται στους πίνακες: 27 έως 32 και 61

Πίνακας 28: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας Γ1 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη και μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη της *E. coli*

Γ1	Am	Amc	Te	Chl	Ge	St	Tr/ Sulf	Nl a	Ce	Cef	Cip	Sulf
<i>E. coli</i> 3*	64	4	16	32	1	64	2 ^a /38 ^β	16	32	1	0,25	32
<i>E. coli</i> 28	64	4	32	32	1	64	1/19	32	4	1	0,5	32
<i>E. coli</i> 37	128	8	32	4	2	64	2/38	32	32	1	0,5	32
<i>E. coli</i> 44	64	4	4	8	2	16	1/19	4	4	8	1	64
<i>E. coli</i> 58	64	4	2	8	1	16	2/38	4	2	1	4	64
<i>E. coli</i> 59	16	4	4	8	1	128	2/38	16	16	1	0,25	64
<i>E. coli</i> 65 O157 - H7	64	16	16	8	2	128	1/19	8	4	2	0,5	32
<i>E. coli</i> 72 O157 - H7	64	16	4	4	1	32	1/19	8	16	2	0,5	64
<i>E. coli</i> 75	16	8	4	16	8	8	2/38	8	16	1	2	128
<i>E. coli</i> 92	8	4	8	16	2	16	2/38	16	2	1	2	128

^a: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^β: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Πίνακας 29: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας B2 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη) για τα απομονωθέντα στελέχη της *E. coli*

B2	Am	Amc	Te	Chl	Ge	St	Tr/ Sulf	Nl a	Ce	Cef	Cip	Sulf
<i>E. coli</i> 1-O157 - H7*	32	26	16	4	8	8	1 ^a /19 ^β	32	32	2	2	256
<i>E. coli</i> 6 O157 - H7	64	8	32	8	8	64	1/19	8	8	8	0,5	128
<i>E. coli</i> 12	32	8	2	8	2	8	1/19	32	32	1	2	256
<i>E. coli</i> 15	32	8	16	4	8	64	2/38	32	32	1	0,5	256
<i>E. coli</i> 20	32	4	8	16	2	8	2/38	8	8	0,5	0,25	256
<i>E. coli</i> 22	32	4	8	16	2	8	1/19	16	4	2	0,25	128
<i>E. coli</i> 24-157 - H7	64	8	32	16	4	128	1/19	32	4	1	0,5	256
<i>E. coli</i> 28 O157 - H7	32	16	16	4	8	32	1/19	32	2	1	2	256
<i>E. coli</i> 31	64	8	4	4	1	32	1/19	8	2	0,5	1	256
<i>E. coli</i> 32	64	8	4	8	1	8	1/19	32	4	1	1	128
<i>E. coli</i> 38	4	4	2	8	2	16	1/19	8	4	2	0,25	128
<i>E. coli</i> 43	64	16	4	4	2	64	2/38	16	2	1	0,5	256
<i>E. coli</i> 47	8	8	4	2	1	16	1/19	8	1	1	0,25	256

^a: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^β: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Πίνακας 30: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας Γ2 (από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη της *E. coli*

Γ2	Am	Amc	Te	Chl	Ge	St	Tr/ Sulf	Nl a	Ce	Cef	Cip	Sulf
<i>E. coli</i> 1-O157 - H7*	32	8	16	8	32	8	2 ^α /38 ^β	32	32	0,5	4	6
<i>E. coli</i> 5-O157 - H7	32	4	32	16	8	64	2/38	8	4	0,5	1	4
<i>E. coli</i> 6	64	4	32	4	8	128	1/19	8	2	4	2	128
<i>E. coli</i> 15 -O157 - H7	64	2	64	4	8	128	2/38	64	32	1	1	128
<i>E. coli</i> 17	8	8	32	16	16	64	2/38	8	2	0,5	1	64
<i>E. coli</i> 27	8	8	8	16	1	128	2/38	16	1	0,25	0,5	64
<i>E. coli</i> 28- O157 - H7	64	4	16	8	8	32	2/38	32	32	0,25	2	32
<i>E. coli</i> 43	32	4	4	4	0,5	64	2/38	8	2	0,5	1	64
<i>E. coli</i> 49	4	2	4	4	1	16	2/38	8	32	0,5	1	64

^α: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^β: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Πίνακας 31: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας Β3 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη) για τα απομονωθέντα στελέχη της *E. coli*

B3	Am	Amc	Te	Chl	Ge	St	Tr/ Sulf	Nl a	Ce	Cef	Cip	Sulf
<i>E. coli</i> 3*	32	8	2	4	2	64	2 ^α /38 ^β	32	4	1	2	64
<i>E. coli</i> 6	64	8	4	2	2	8	2/38	8	4	0,5	0,5	64
<i>E. coli</i> 7	32	4	16	16	4	32	2/38	32	16	0,25	4	64
<i>E. coli</i> 10	32	8	16	8	8	8	2/38	8	4	0,5	8	64
<i>E. coli</i> 14 - O157 - H7	32	2	32	16	8	64	1/19	8	16	1	2	128
<i>E. coli</i> 16- O157 - H7	64	2	16	16	1	64	2/38	16	2	1	1	64
<i>E. coli</i> 17	32	4	16	16	16	32	2/38	8	2	0,5	2	64
<i>E. coli</i> 20	64	4	32	4	32	64	2/38	4	4	0,25	2	64
<i>E. coli</i> 23- O157 - H7	64	8	2	2	16	32	2/38	8	2	1	0,5	64
<i>E. coli</i> 27	32	8	1	4	1	8	1/19	32	4	1	2	128
<i>E. coli</i> 28- O157 - H7	32	64	16	8	8	64	2/38	4	16	1	4	64
<i>E. coli</i> 37	32	4	8	16	1	16	1/19	32	32	0,25	2	64
<i>E. coli</i> 38- O157 - H7	32	8	2	4	1	16	2/38	8	16	0,5	1	128
<i>E. coli</i> 43	8	8	1	2	2	16	2/38	8	2	0,5	1	64
<i>E. coli</i> 47	8	4	16	32	8	32	2/38	4	4	1	0,5	64
<i>E. coli</i> 48	64	4	16	16	8	32	2/38	32	16	0,5	2	64

^α: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^β: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Πίνακας 32: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας Γ3 (προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη της *E. coli*

Γ3	Am	Amc	Te	Chl	Ge	St	Tr/ Sulf	Nl a	C e	Cef	Cip	Sulf
<i>E. coli</i> 3- O157 - H7*	64	16	2	4	2	128	1 ^a /19 ^b	32	4	2	2	128
<i>E. coli</i> 7	64	8	16	16	1	32	1/19	32	8	1	4	128
<i>E. coli</i> 8-O157 - H7	64	8	2	8	2	64	1/19	32	8	1	0,5	128
<i>E. coli</i> 10	128	16	16	8	8	128	1/19	8	2	1	8	128
<i>E. coli</i> 12-O157 - H7	64	16	16	4	4	16	1/19	32	32	2	2	256
<i>E. coli</i> 14-O157 - H7	64	16	32	8	8	128	1/19	8	4	0,5	4	128
<i>E. coli</i> 15-O157 - H7	8	8	2	4	1	16	1/19	4	2	1	2	128
<i>E. coli</i> 17 - O157 - H7	32	8	32	16	16	64	1/19	4	2	1	4	64
<i>E. coli</i> 20 - O157 - H7	64	16	16	4	16	64	1/19	4	1	1	4	128
<i>E. coli</i> 28- O157 - H7	32	64	16	4	8	64	2/38	8	16	2	4	128
<i>E. coli</i> 35 - O157 - H7	64	16	8	8	1	16	1/19	4	2	0,5	1	64
<i>E. coli</i> 37-O157 - H7	64	16	8	16	1	16	1/19	32	32	1	4	128
<i>E. coli</i> 47	64	16	16	4	8	32	1/19	8	4	1	1	64
<i>E. coli</i> 48	128	16	16	32	16	16	1/19	8	16	0,5	2	128

^a: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^b: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

** : *E. coli* O157 - H7, μη σκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί σε στέλεχος που δίνει μόνο φαινοτυπική ταυτοποίηση *E. coli* με τη βοήθεια των βιοχημικών δοκιμών, *E. coli* O157 - H7, σκιασμένη αντιστοιχεί σε στέλεχος που δίνει φαινοτυπική και οροτυπική ταυτοποίηση *E. coli*

Πίνακας 33: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας B1 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη) για τα απομονωθέντα στελέχη του *S. aureus*

BI	Pe G	Am	Ox	Vn	Tcp	Er	Cl	Te	Chl	Ge	St	Fc a	Ce	Tr/Sulf	En	Cet	Cip	Tob
<i>S. aureus</i> 7*	0,06	16	1	1	2	0,25	0	4	4	2	8	0,2	32	1 ^a /19 ^β	0,3	4	1	2
<i>S. aureus</i> 8	0,12	32	1	1	4	0,25	1	2	4	2	16	0,5	32	2/38	0,3	2	1	2
<i>S. aureus</i> 9	0,12	16	1	1	4	0,5	1	16	8	4	8	1	4	2/38	0,1	4	1	2
<i>S. aureus</i> 14	0,5	32	2	16	4	2	1	4	32	4	8	0,25	32	2/38	0,1	2	1	1
<i>S. aureus</i> 19	0,12	16	4	1	4	0,25	0	2	4	4	8	0,25	64	2/38	0,1	2	0,5	1
<i>S. aureus</i> 20	0,5	32	1	1	2	0,5	0	2	4	2	32	0,12	4	1/19	0,5	2	0,5	2
<i>S. aureus</i> 24	0,03	32	1	1	2	0,5	0	1	8	1	8	0,12	64	1/19	0,1	2	0,3	4
<i>S. aureus</i> 25	0,03	1	1	0,5	2	0,5	0	32	4	1	8	0,5	32	1/19	0,1	4	0,3	4
<i>S. aureus</i> 26	0,06	32	1	1	1	0,25	0	4	8	2	8	0,5	32	1/19	0,1	4	1	4
<i>S. aureus</i> 30	0,06	1	1	1	4	0,25	0	4	32	4	8	0,12	64	1/19	0,1	4	1	2
<i>S. aureus</i> 39	1	8	1	1	4	16	1	16	64	2	4	0,12	32	1/19	0,3	1	1	2
<i>S. aureus</i> 40	0,12	1	8	1	4	0,5	1	32	4	1	16	0,25	8	2/38	0,3	1	0,3	4
<i>S. aureus</i> 49	0,12	1	1	2	4	0,5	0	2	2	1	16	0,25	8	2/38	0,1	2	0,3	1
<i>S. aureus</i> 50	0,12	2	1	2	8	0,5	1	2	4	2	18	0,25	32	2/38	0,1	1	0,5	2
<i>S. aureus</i> 51	0,12	2	2	1	4	0,25	1	2	2	2	8	0,25	4	1/19	0,1	2	0,5	4
<i>S. aureus</i> 55	0,06	16	1	1	4	0,25	0	4	4	4	32	0,5	32	2/38	0,1	4	1	2
<i>S. aureus</i> 56	0,06	1	1	1	4	0,25	0	4	4	4	16	0,5	32	2/38	0,3	2	1	2
<i>S. aureus</i> 57	0,03	16	4	1	2	0,25	0	4	4	2	8	1	8	2/38	0,3	4	0,3	1
<i>S. aureus</i> 64	0,12	32	1	1	4	0,5	0	16	2	1	8	0,5	8	1/19	0,3	1	0,5	2
<i>S. aureus</i> 65	0,12	1	1	2	4	0,5	1	2	2	4	16	1	64	2/38	0,1	1	1	1
<i>S. aureus</i> 71	0,12	64	1	8	8	0,5	1	2	8	4	8	0,25	4	1/19	0,1	1	1	2
<i>S. aureus</i> 72	0,5	1	4	1	4	0,5	0	2	8	2	8	0,12	4	2/38	0,1	2	0,3	1
<i>S. aureus</i> 76	0,12	1	1	1	4	0,25	0	4	4	1	16	0,12	32	1/19	0,1	2	0,5	1
<i>S. aureus</i> 77	0,06	16	1	1	4	0,25	0	1	4	1	8	2	32	2/38	0,1	1	1,3	1
<i>S. aureus</i> 82	0,12	1	1	1	8	0,12	0	2	8	2	8	0,12	8	2/38	0,1	1	1	4
<i>S. aureus</i> 85	0,12	1	1	2	2	0,25	4	2	4	4	4	0,12	8	1/19	0,3	1	1	2
<i>S. aureus</i> 86	0,12	1	8	1	1	0,25	1	4	32	4	4	0,25	4	1/19	0,3	0,5	0,5	2

<i>S.aureus</i> 93	0,12	2	1	1	2	0,25	1	2	4	2	8	0,25	8	1/19	0,1	2	0,3	1
<i>S.aureus</i> 94	0,12	1	1	2	2	0,5	0	4	4	2	8	1	32	2/38	0,1	2	0,5	0,5
<i>S.aureus</i> 99	0,12	1	4	16	2	0,5	0	2	8	2	8	0,5	32	2/38	0,3	1	0,5	1

^α: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^β: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Συντομογραφίες:

Pe G: Penicillin G	Cl: Clindamycin	Ce: Cethalotin
Am: Ampicillin	Te: Tetracycline	Tr/Sulf: Trimethoprim/Sulfamethoxazole
Ox: Oxacillin	Chl: Chloramphenicol	En: Enrofloxacin
Vn: Vancomycin	Ge: Gentamicin	Cet: Cethalexin
Tcp: Teicoplanin	St: Streptomycin	Cip: Ciprofloxacin
Er: Erythromycin	Fc a: Fucidic acid	Tob: Tobramycin

Οι συντομογραφίες αναφέρονται στους πίνακες: 33 έως 38

Πίνακας 34: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας Γ1 (γάλα από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση των αντιβιοτικών πενικιλίνη + στρεπτομυκίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη του *S.aureus*

Γ1	Pe G	Am	Ox	Vn	Tcp	Er	Cl	Te	Chl	Ge	St	Fc a	Ce	Tr/Sulf	En	Cet	Cip	Tob
<i>S. aureus</i> 14*	2	16	1	1	4	0,25	0,1	2	4	2	4	0,06	4	2 ^a /38 ^b	0,3	1	1	4
<i>S. aureus</i> 20	4	32	1	16	4	0,12	0,1	2	64	2	32	0,03	32	2/38	0,1	2	1	4
<i>S. aureus</i> 26	0,12	16	4	1	4	0,12	0,1	4	4	2	8	0,12	4	1/19	0,1	2	1	4
<i>S. aureus</i> 35	0,25	35	1	1	4	0,5	0,3	2	2	1	8	1	2	1/19	0,1	2	2	4
<i>S. aureus</i> 39	2	64	1	1	2	0,5	0,3	1	2	4	8	0,5	4	1/19	0,3	1	2	4
<i>S. aureus</i> 40	0,25	2	4	1	2	0,12	0	2	2	1	8	0,12	32	2/38	0,1	1	1	2
<i>S. aureus</i> 41	2	16	2	0,5	4	0,12	0,3	1	4	1	16	0,25	4	2/38	0,3	4	0,5	2
<i>S. aureus</i> 44	2	16	2	1	2	0,25	0,3	4	4	1	8	2	2	2/38	0,3	4	1	4
<i>S. aureus</i> 47	4	32	2	2	4	0,5	0,1	1	2	2	8	0,5	2	2/38	0,1	1	1	4
<i>S. aureus</i> 53	0,25	32	4	2	2	0,25	0,1	2	4	2	32	0,5	4	2/38	0,1	2	1	4
<i>S. aureus</i> 54	0,25	64	4	1	2	0,5	0,1	2	1	4	32	0,25	32	1/19	0,1	2	0,5	2
<i>S. aureus</i> 55	0,12	64	2	8	8	0,12	0,3	2	2	4	8	0,25	32	1/19	0,3	1	0,3	2
<i>S. aureus</i> 57	0,12	64	4	1	4	0,12	0,5	1	2	1	8	1	4	1/19	0,1	0,5	1	2
<i>S. aureus</i> 62	0,25	2	1	1	2	0,5	0,5	4	1	2	8	0,12	32	1/19	0,1	1	1	4
<i>S. aureus</i> 66	0,25	64	4	0,5	2	0,25	0,5	4	0,5	2	4	0,25	32	2/38	0,3	1	1	4
<i>S. aureus</i> 67	0,25	2	1	1	2	0,12	0,1	2	1	2	8	0,25	2	1/19	0,1	1	0,3	2
<i>S. aureus</i> 72	4	1	4	2	4	0,12	0,3	2	0,5	4	8	0,25	2	1/19	0,1	2	1	4
<i>S. aureus</i> 76	0,25	2	8	1	1	0,5	0,3	1	4	1	8	0,5	4	1/19	0,3	4	0,5	2

<i>S. aureus</i> 87	0,25	64	1	1	2	0,5	0,1	1	4	1	4	0,12	4	2/38	0,3	4	0,5	4
<i>S. aureus</i> 91	0,25	2	1	1	2	0,5	0,3	2	2	4	8	1	2	2/38	0,3	4	1	4
<i>S. aureus</i> 98	4	2	1	2	4	0,25	0,3	1	1	2	16	0,25	4	1/19	0,1	0,5	1	2
<i>S. aureus</i> 99	0,25	1	4	16	4	0,25	0,5	2	4	2	16	0,12	8	1/19	0,1	1	0,5	2

^α: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^β: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Πίνακας 35: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας B2 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη) για τα απομονωθέντα στελέχη του *S. aureus*

B2	Pe G	Am	Ox	Vn	Tcp	Er	Cl	Te	Chl	Ge	St	Fc a	Ce	Tr/Sulf	En	Cet	Cip	Tob
<i>S. aureus</i> 1*	2	16	1	1	8	0,5	0,3	4	4	4	4	0,25	R	2 ^α /38 ^β	0,1	2	1	2
<i>S. aureus</i> 2	0,5	32	2	1	1	0,25	0,1	2	4	2	2	0,25	R	1/19	0,1	16	1	1
<i>S. aureus</i> 7	0,25	16	2	2	1	0,25	0,1	1	2	2	2	0,12	R	2/38	0,3	2	0,5	1
<i>S. aureus</i> 12	0,25	16	1	2	2	16	0,1	1	2	1	1	0,12	S	1/19	0,1	2	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> 14	0,25	32	1	1	2	0,5	0,3	0,5	1	2	4	0,12	R	2/38	0,1	1	0,3	0,5
<i>S. aureus</i> 19	0,25	32	2	1	4	0,25	0,5	16	4	1	2	0,12	S	1/19	0,1	2	0,3	1
<i>S. aureus</i> 29	4	32	1	0,5	2	8	0,5	32	8	4	0,5	0,25	R	2/38	0,1	2	0,3	1
<i>S. aureus</i> 30	0,25	64	1	2	2	16	0,3	32	8	1	1	0,12	S	2/38	0,1	2	1	0,25
<i>S. aureus</i> 40	0,25	32	1	2	1	0,25	0,3	1	4	1	1	1	S	1/19	0,3	1	1	0,25
<i>S. aureus</i> 46	1	32	1	16	1	0,25	0,1	64	8	1	1	0,25	R	1/19	0,1	2	1	0,12
<i>S. aureus</i> 49	0,5	32	21	2	2	0,5	0,5	0,5	4	2	2	0,12	R	2/38	0,1	4	0,5	1

^α: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^β: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Πίνακας 36: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας Γ2 (από προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη του *S. aureus*

Γ2	Pe G	Am	Ox	Vn	Tcp	Er	Cl	Te	Chl	Ge	St	Fc a	Ce	Tr/Sulf	En	Cet	Cip	Tob
<i>S. aureus</i> 5*	0,25	32	1	2	16	16	0,5	64	8	4	4	2	S	2 ^a /38 ^b	0,12	1	0,5	2
<i>S. aureus</i> 7	0,5	64	2	2	1	0,25	0,5	1	4	4	4	0,25	R	2/38	0,3	1	0,5	2
<i>S. aureus</i> 10	0,5	64	2	1	1	0,25	0,5	4	32	4	8	0,12	R	2/38	0,3	2	0,1	2
<i>S. aureus</i> 15	1	32	2	1	8	0,25	0,3	16	32	4	4	1	S	2/38	0,25	2	0,1	1
<i>S. aureus</i> 16	0,25	32	1	2	2	0,5	0,5	1	4	2	4	0,25	R	2/38	0,25	4	0,1	2
<i>S. aureus</i> 17	0,25	16	1	16	2	0,25	0,5	32	8	2	1	1	S	2/38	0,25	4	0,3	1
<i>S. aureus</i> 20	0,25	32	1	2	4	0,12	0,5	4	8	1	1	0,12	S	2/38	0,25	4	0,3	0,5
<i>S. aureus</i> 30	0,12	32	1	1	8	16	0,3	32	2	4	2	0,12	S	2/38	0,1	2	0,3	1
<i>S. aureus</i> 36	0,5	16	1	1	4	8	0,1	32	4	4	2	1	S	1/19	0,12	1	0,1	1
<i>S. aureus</i> 46	2	32	2	32	1	0,5	0,5	64	2	4	1	0,12	R	1/19	0,1	2	0,1	0,5
<i>S. aureus</i> 48	0,5	32	2	1	2	0,25	0,5	4	32	2	2	0,12	R	1/19	0,12	1	0,1	2

^a: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^b: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεγχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Πίνακας 37: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας B3 (προβατίνες που βρίσκονται σε διαδικασία θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη) για τα απομονωθέντα στελέχη του *S. aureus*

B3	Pe G	Am	Ox	Vn	Tcp	Er	Cl	Te	Chl	Ge	St	Fc a	Ce	Tr/Sulf	En	Cet	Cip	Tob
<i>S. aureus</i> 1*	0,5	32	1	1	4	0,25	0,3	16	4	2	4	1	S	2 ^α /38 ^β	0,3	S	8	2
<i>S. aureus</i> 5	1	32	1	2	1	0,12	0,3	4	2	4	8	1	S	2/38	0,25	S	1	2
<i>S. aureus</i> 10	1	64	2	2	1	0,5	0,3	32	1	4	8	0,5	S	1/19	0,1	S	1	1
<i>S. aureus</i> 13	2	4	4	0,5	0,5	0,5	0,1	4	2	4	7	0,5	S	1/19	0,12	S	0,5	2
<i>S. aureus</i> 21	2	32	1	1	1	0,5	0,1	4	2	1	32	0,25	S	2/38	0,1	S	1	2
<i>S. aureus</i> 25	4	64	8	1	1	0,25	0,1	16	4	2	4	1	S	2/38	4	S	4	1
<i>S. aureus</i> 26	2	32	1	1	0,5	12	0,5	16	2	2	4	0,25	S	2/38	0,3	S	0,5	4
<i>S. aureus</i> 27	4	64	1	0,5	0,25	0,12	0,5	2	1	4	8	0,12	R	2/38	0,25	S	0,5	4
<i>S. aureus</i> 30	2	32	2	2	0,25	0,12	0,1	2	1	4	16	0,12	S	2/38	0,3	S	0,3	2
<i>S. aureus</i> 35	4	8	4	1	0,12	0,25	0,3	16	2	2	4	1	R	1/19	0,25	S	0,3	2
<i>S. aureus</i> 39	2	32	1	1	1	0,5	0,3	4	4	1	32	0,25	S	2/38	0,1	S	1	4
<i>S. aureus</i> 48	0,5	64	1	8	1	0,25	0,5	64	2	2	8	1	R	2/38	0,25	S	1	4

^α: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^β: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Πίνακας 38: Αποτύπωση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) από δείγματα μαστικού εκκρίματος (γάλα) προβατίνων της ομάδας Γ3 (προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής) για τα απομονωθέντα στελέχη του *S. aureus*

Γ3	Pe G	Am	Ox	Vn	Tcp	Er	Cl	Te	Chl	Ge	St	Fc a	Ce	Tr/Sulf	En	Cet	Cip	Tob
<i>S. aureus</i> 1*	0,5	32	1	1	0,25	0,5	0,1	64	4	4	8	1	S	2 ^α /38 ^β	8	S	4	2
<i>S. aureus</i> 4	2	32	1	1	0,5	0,25	0,1	2	2	4	8	2	S	2/38	0,25	S	8	2
<i>S. aureus</i> 18	2	32	1	1	1	0,12	0,1	2	4	4	8	1	S	2/38	4	S	0,3	2
<i>S. aureus</i> 19	4	32	1	2	1	0,5	0,3	4	4	4	4	0,25	R	2/38	4	S	0,5	1
<i>S. aureus</i> 25	1	64	8	0,5	1	0,5	0,3	16	2	4	2	1	S	2/38	8	S	8	0,5
<i>S. aureus</i> 31	4	64	2	0,5	2	0,25	0,3	4	16	4	4	1	R	1/19	0,25	S	1	0,5
<i>S. aureus</i> 32	1	32	2	1	2	0,12	0,1	4	16	2	4	0,12	S	2/38	4	S	8	1
<i>S. aureus</i> 34	4	34	2	1	4	0,12	0,1	2	16	1	8	1	R	1/19	0,25	S	0,3	1
<i>S. aureus</i> 41	2	2	2	2	0,25	0,25	0,5	64	4	1	4	0,25	R	1/19	0,12	S	0,5	2
<i>S. aureus</i> 45	4	2	2	0,5	1	0,5	0,1	4	4	4	4	2	R	2/38	0,12	S	0,5	4

^α: Τιμή MIC για την Trimethoprim, ^β: Τιμή MIC για την Sulfamethoxazole

*: Η αρίθμηση των στελεχών ακολουθεί τον κωδικό του δείγματος – κωδικός ζώου

Πίνακας 39: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *E. coli* ομάδας B1 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC															
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256	≥512	n*
Ampicillin								5	7	5		12	1			
Amicacin							2	19	9							
Tetracycline							13	9	1	4	3					
Chloramphenicol							2	13	8	1	6					
Gentamicin						9	15	3	3							
Streptomycin								5	13	3	2	5	2			
Trimethoprim-Sulfamethoxazole						13	17									
Nalidixic acid								9	9	1	10	1				
Cethalothin						1	7	17		3	1	1				
Cefotaxime					3	15	7	4	1							
Ciprofloxacin				5	10	12	2	1								
Sulfathiazole											4	18	8			

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 40: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *E. coli* ομάδας Γ1 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC															
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256	≥512	n 10 ^a
Ampicillin									1	2		6	1			
Amicacin								6	2	2						
Tetracycline							1	4	1	2	2					
Chloramphenicol								2	4	2	2					
Gentamicin						5	4		1							
Streptomycin									1	3	1	3	2			
Trimethoprim-Sulfamethoxazole						5	5									
Nalidixic acid								2	3	3	2					
Cethalothin							2	3		3	2					
Cefotaxime						7	2		1							
Ciprofloxacin				2	4	1	2	1								
Sulfathiazole											4	4	2			

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 41: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *E. coli* ομάδας B2 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC														n ^a 13	
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256		≥512
Ampicillin								1	1		6	5				
Amicacin								3	7	3						
Tetracycline							2	4	2	3	2					
Chloramphenicol							1	5	4	3						
Gentamicin						3	5	1	4							
Streptomycin									5	2	2	3	1			
Trimethoprim-Sulfamethoxazole						10	3									
Nalidixic acid									5	2	6					
Cethalothin						1	3	4	2		3					
Cefotaxime					2	7	3		1							
Ciprofloxacin				4	4	2	3									
Sulfathiazole													4	9		

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 42: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *E. coli* ομάδας Γ2 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC															
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256	≥512	n ^a 9
Ampicillin								1	2		3	3				
Amicacin							2	4	3							
Tetracycline								2	1	2	3	1				
Chloramphenicol								4	2	3						
Gentamicin					1	2			4	1	1					
Streptomycin									1	1	1	3	3			
Trimethoprim-Sulfamethoxazole						1	8									
Nalidixic acid									5	1	2	1				
Cethalothin						1	3	1			4					
Cefotaxime				2	5	1		1								
Ciprofloxacin					1	5	2	1								
Sulfathiazole											1	6	2			

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 43: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *E. coli* ομάδας B3 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC															
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256	≥512	n ^a 16
Ampicillin									2		9	5				
Amicacin							2	6	7			1				
Tetracycline						2	3	1	1	7	2					
Chloramphenicol							3	4	2	6	1					
Gentamicin						4	3	1	5	2	1					
Streptomycin									3	3	5	5				
Trimethoprim-Sulfamethoxazole						3	13									
Nalidixic acid								3	7	1	5					
Cethalothin							4	6		5	1					
Cefotaxime				3	6	7										
Ciprofloxacin					3	3	7	2	1							
Sulfathiazole												13	3			

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 44: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *E. coli* ομάδας Γ3 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC														n ^a 14	
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256		≥512
Ampicillin									1		2	9	2			
Amicacin									4	9		1				
Tetracycline							3		2	7	2					
Chloramphenicol								6	4	3	1					
Gentamicin						4	2	1	4	3						
Streptomycin										5	2	4	3			
Trimethoprim-Sulfamethoxazole						13	1									
Nalidixic acid									4	5		5				
Cethalothin						1	4	3	2	2	2					
Cefotaxime					3	8	3									
Ciprofloxacin					1	2	4	6	1							
Sulfathiazole												3	10	1		

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 45: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *S. aureus* ομάδας B1 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC															n*
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256	≥512	
																30
Penicillin G	3	6	17	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ampicillin	-	-	-	-	--	13	3	-	1	6	6	1	-	-	-	
Oxacillin					3	19	2	4	2							
Vancomycin					1	21	5		1	2						
Teicoplanin						2	9	1	3							
Erythromycin			1	14	13		1			1						
Clindamycin			7	11	11			1								
Tetracycline						2	13	1		3	2					
Chloramphenicol							4	1	7		3	1				
Gentamicin						7	13	1								
Streptomycin								3	1	7	2					
Fucidic acid			8	10	7	4	1									
Cethalotin								6	7		13	4				
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole						16**	14									
Enrofloxacin		4	15	10	1											
Cethalexin					1	10	12	7								
Ciprofloxacin				8	9	13										
Tobramycin					1	10	13	6								

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 46: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *S. aureus* ομάδας Γ1 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC															n ^a 22
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256	≥512	
Penicillin G			3	11			4	4								
Ampicillin										4	4					
Oxacillin						9	4	8	1							
Vancomycin					2	13	4		1	2						
Teicoplanin						1	10	10	1							
Erythromycin			8	6	8											
Clindamycin		1	8	9	4											
Tetracycline						7	11	4								
Chloramphenicol					2	4	7	8				1				
Gentamicin						7	10	5								
Streptomycin								3	13	3	3					
Fucidic acid	1	1	5	7	4	3	1									
Cethalotin							6	9	1		6					
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole						12	10									
Enrofloxacin		2	11	9												
Cethalexin					2	9	6	5								
Ciprofloxacin				2	5	13	2									
Tobramycin							9	13								

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 47: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *S. aureus* ομάδας B2 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC															
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256	≥512	n ^a 11
Penicillin G				6	2	1	1	1								
Ampicillin										3	7	1				
Oxacillin				1	2	5	3									
Vancomycin					1	4	5			1						
Teicoplanin						4	5	1	1							
Erythromycin				5	3				1	2						
Clindamycin			4	4	3											
Tetracycline					2	3	1	1		1	2	1				
Chloramphenicol						1	2	5	3							
Gentamicin						5	4	2								
Streptomycin					1	4	4	2								
Fucidic acid				6	4	1										
Cethalotin								3	1		2	5				
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole						5**	6									
Enrofloxacin		2	7	2												
Cethalexin						2	7	1		1						
Ciprofloxacin				3	3	5										
Tobramycin			1	2	2	5	1									

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 48: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *S. aureus* ομάδας Γ2 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC															
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256	≥512	n ^a 11
Penicillin G			1	4	4	1	1									
Ampicillin										2	7	2				
Oxacillin					2	4	5									
Vancomycin						5	4			1	1					
Teicoplanin						3	3	2	2	1						
Erythromycin			1	5	2				1	2						
Clindamycin			1	2	8											
Tetracycline						2		3		1	3	2				
Chloramphenicol							2	3	3		3					
Gentamicin						1	3	7								
Streptomycin						3	3	4	1							
Fucidic acid			5	2		3	1									
Cethalotin							4	2			5					
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole						3	8									
Enrofloxacin			5	6												
Cethalexin						4	4	3								
Ciprofloxacin		2	4	3	2											
Tobramycin					2	4	5									

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 49: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *S. aureus* ομάδας B3 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC														n ^a	
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256		≥512
Penicillin G					2	2	5	3								12
Ampicillin								1	1		6	4				
Oxacillin						7	2	2	1							
Vancomycin					2	6	3		1							
Teicoplanin			1	2	2	6		1								
Erythromycin			4	4	4											
Clindamycin			4	5	3											
Tetracycline							2	4		4	1	1				
Chloramphenicol						3	6	3								
Gentamicin						2	5	5								
Streptomycin								4	5	1	2					
Fucidic acid			2	3	2	5										
Cethalotin							6	2	1		3					
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole						3		9								
Enrofloxacin			4	7				1								
Cethalexin							2	10								
Ciprofloxacin				2	3	5		1	1							
Tobramycin						2	6	4								

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 50: Κατανομή των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) (μg/ml) απομονωθέντων στελεχών *S. aureus* ομάδας Γ3 έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που ελέγχθηκαν

Αντιβιοτικό	MIC														n ^a	
	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1**	2**	4	8	16	32	64	128	256		≥512
Penicillin G				1	2	3	4									10
Ampicillin						2				5	3					
Oxacillin					4	5		1								
Vancomycin				3	5	2										
Teicoplanin			2	1	4	2	1									
Erythromycin		3	3	4												
Clindamycin		6	3	1												
Tetracycline						4	3		1		2					
Chloramphenicol						2	5		3							
Gentamicin					2	1	7									
Streptomycin						1	5	4								
Fucidic acid			1	2	5	2										
Cethalotin						2	3			5						
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole					3	7										
Enrofloxacin		2	3				3	2								
Cethalexin						9	1									
Ciprofloxacin			2	3	1		1	3								
Tobramycin				2	3	4	1									

*:n, Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

** : Trimethoprim- Sulfamethoxazole:

όπου τιμή 1 σημαίνει 1: Trimethoprim /19 για Sulfamethoxazole,

όπου τιμή 2 σημαίνει 2: Trimethoprim /38 για Sulfamethoxazole

Η έντονη γραμμή τοποθετήθηκε στην τιμή του breakpoint της MIC και η σκιασμένη περιοχή περιλαμβάνει τα ανθεκτικά στελέχη

Πίνακας 51: Αποτύπωση των ορίων ζωνών αναστολής κατά τον έλεγχο ευαισθησίας του μοναδικού απομονωθέντος Μεθικιλίνη Ανθεκτικό (MRSA) στελέχους *S. aureus*

Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση (μg)	Παρατηρηθέντα όρια ζωνών αναστολής (mm)	Χαρακτηρισμός
Tetracycline	30	10	A*
Gentamicin	10	10	A
Erythromycin	15	8	A
Clindamycin	2	9	A
Fusidic acid	10	25	E
Kanamycin	30	12	E
Ciprofloxacin	5	12	A
Rifampin	5	22	E
chloramphenicol	30	20	E
Teicoplanin	30	8	A

*: A: Ανθεκτικό

E: Ευαίσθητο

Πίνακας 52: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτύπωσης θετικών δειγμάτων νωπού γάλακτος προβατίνων (έξι ομάδες εξεταζόμενων δειγμάτων) ως προς την απομόνωση βακτηρίων

Κωδικός Ομάδας	Απομονωθέντα βακτήρια											
	<i>E.coli</i>		<i>Salmonella spp.</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus spp.</i>		<i>Clostridium perfringens</i> Βλαστικές μορφές		<i>Clostridium perfringens</i> Σπορογόνες μορφές	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ομάδα Α Μάρτυρας	5	5	5	5	23	23	28	28	13	13	62	62
B1	30	30	9	9	30	30	34	34	25	25	49	49
Γ1	10	10	9	9	22	30	28	28	35	35	57	57
B2	13	26	5	10	17	34	13	26	18	36	18	36
Γ2	9	18	4	8	11	22	19	38	19	38	36	72
B3	16	32	3	6	12	24	3	6	15	30	18	36
Γ3	14	28	2	4	10	20	4	8	5	10	37	74

n: αριθμός θετικών δειγμάτων

Πίνακας 53: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτύπωσης θετικών δειγμάτων κοπράνων προβατίνων (έξι ομάδες εξεταζόμενων δειγμάτων) ως προς την απομόνωση βακτηρίων

Κωδικός Ομάδας	Απομονωθέντα βακτήρια											
	<i>E.coli</i>		<i>Salmonella spp.</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus spp.</i>		<i>Clostridium perfringens</i> Βλαστικές μορφές		<i>Clostridium perfringens</i> Σπορογόνες μορφές	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ομάδα Μάρτυρας	Δεν εξετάστηκαν											
B1	21	21	-	-	18	18	15	15	-	-	54	54
Γ1	11	11	-	-	-	-	17	17	35	35	71	71
B2	8	16	2	4	6	12	-	-	-	-	11	22
Γ2	7	14	8	16	2	4	3	6	6	12	8	16
B3	6	12	-	-	-	-	3	6	3	6	7	14
Γ3	9	18	-	-	15	30	5	10	14	28	37	74

n: αριθμός θετικών δειγμάτων

Πίνακας 54: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτύπωσης θετικών δειγμάτων εκκρίματος μαστικού αδένος (γάλακτος) και κοπράνων προβατίνων (έξι ομάδες εξεταζόμενων δειγμάτων) ως προς την απομόνωση στελεχών *E. coli* O157:H7

Είδος δείγματος	Κωδικός εξεταζόμενων ομάδων προβατίνων											
	B1		Γ1		B2		Γ2		B3		Γ3	
	n		n		n		n		n		n	
	BX*	BX, OP+**	BX	BX, OP+	BX	BX, OP+	BX	BX, OP+	BX	BX, OP+	BX	BX, OP+
Έκκριμα μαστικού αδένος (γάλα)	5	1	2	-	4	2	4	2	5	3	10	1
Κόπρανα	2	2	1	-	-	-	2	-	4	2	2	1

n: αριθμός θετικών δειγμάτων

*: BX, Εμφανίζουν θετικότητα (+) στις βιοχημικές δοκιμές ως προς τον χαρακτηρισμό του στελέχους *E. coli* 157:H7 και αρνητική οροτύπηση (-)

** : BX, OP+, Εμφανίζουν θετικότητα (+) στις βιοχημικές δοκιμές ως προς τον χαρακτηρισμό του στελέχους *E. coli* 157:H7 και θετική οροτύπηση (+)

5.2. Συζήτηση

Στατιστική επεξεργασία

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το t τεστ, η χ^2 δοκιμή και ο λόγος των σχετικών συμπληρωματικών πιθανοτήτων (Odd Ratio - OR).

1. Μεταβολές στελεχών και πληθυσμών στις διαφορετικές εξεταζόμενες ομάδες ζώων, ως προς τα δείγματα του μαστικού εκκρίματος (γάλακτος)

Στον πίνακα 55 φαίνονται οι μεταβολές των απομονωθέντων στελεχών στις διαφορετικές ομάδες καθώς και οι πληθυσμιακές μεταβολές.

1^α. E. coli.

Σε ότι αφορά την *E. coli* ενώ ο αρχικός επιπολασμός (=συχνότητα απομόνωσης) του βακτηρίου ήταν σχετικά χαμηλός (5%) όπως άλλωστε φαίνεται από την Ομάδα Α (μάρτυρες), οι απομονώσεις αυξήθηκαν στις ομάδες Β (ζώα υπό θεραπεία αλλά με διαφορετικά αντιβιοτικά) και στη συνέχεια μειώθηκαν στις ομάδες Γ (μετά την πάροδο του χρόνου αναμονής). Συγκεκριμένα οι ομάδες Β1, Β2 και Β3 εμφανίζουν επιπολασμό του βακτηρίου 30%, 26% και 32% αντίστοιχα. Οι ομάδες Γ1, Γ2 και Γ3 εμφανίζουν επιπολασμό 10%, 18% και 28% αντίστοιχα. Οι μεταβολές αυτές της κατανομής των στελεχών *E. coli* στις ομάδες είναι στατιστικά σημαντικές (χ^2 δοκιμή της ανεξαρτησίας για $p < 0,05$), εύρημα το οποίο υποδηλώνει ότι οι μεταβολές (μείωση του επιπολασμού) από τις υπό θεραπεία ομάδες προς τις ομάδες στις οποίες η γαλακτοληψία έγινε μετά την πάροδο το χρόνου αναμονής, συσχετίζονται και δεν είναι ανεξάρτητες (τυχαίες) μεταξύ τους. Τα ευρήματα αυτά είναι βέβαια αναμενόμενα διότι κατά τη φάση της θεραπείας (πριν δηλαδή επιτευχθεί η κλινική ίαση) η λοίμωξη του μαστικού παρεγχύματος βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Με τη λήξη του χρόνου αναμονής (δηλαδή μετά τη λήξη της φαρμακευτικής αγωγής και την πάροδο μερικών ημερών) η λοίμωξη έχει υποχωρήσει, οπότε παρατηρείται η μείωση του επιπολασμού. Η αύξηση του επιπολασμού στις ομάδες Β σε σχέση με την ομάδα Α, συνδέεται ενδεχομένως με την ενεργητική συμμετοχή του συγκεκριμένου μικροοργανισμού στην αιτιοπαθογένεια του νοσήματος.

Πίνακας 55: Κατανομή των θετικών δειγμάτων γάλακτος (οι τιμές με 2 δεκαδικά είναι τα μεγέθη απομονωθέντων πληθυσμών εκφρασμένα σε cfu/ml).

Ομάδες δειγμάτων	Απομονωθέντα στελέχη					
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus spp</i>	<i>Clostridium perfringens</i> (βλαστικές μορφές)	<i>Clostridium perfringens</i> (σπορογόνες μορφές)
ΟΜΑΔΑ Α (n=100)	5 3,76 ± 0,52	5 1,96 ± 0,28	23 2,53 ± 1,62	28 2,21 ± 0,36	13	62
ΟΜΑΔΑ Β1 (n=100)	30 1,83 ± 0,88	9 1,21 ± 0,89	30 2,15 ± 1,12	34 1,55 ± 0,96	25	49
ΟΜΑΔΑ Β2 (n=50)	13 1,9 ± 0,64	5 1,12 ± 0,84	17 1,48 ± 1,02	13 1,03 ± 0,88	18	18
ΟΜΑΔΑ Β3 (n=50)	16 1,90 ± 0,73	3 0,84 ± 0,60	12 1,46 ± 0,79	3 1,22 ± 0,75	15	18
ΟΜΑΔΑ Γ1 (n=100)	10 0,67 ± 0,66	9 1,19 ± 0,70	22 1,46 ± 0,90	28 2,15 ± 0,70	35	57
ΟΜΑΔΑ Γ2 (n=50)	9 1,85 ± 0,90	4 0,90 ± 0,80	11 1,51 ± 1,03	19 2,01 ± 0,62	19	36
ΟΜΑΔΑ Γ3 (n=50)	14 1,17 ± 0,82	2 0,50 ± 0,00	10 1,62 ± 0,81	4 1,50 ± 1,16	5	37

Η στατιστική σημαντικότητα της κατανομής των απομονωθέντων στελεχών *E. coli* στις διάφορες ομάδες δείχνει και την διαφορετική αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών σχημάτων που εφαρμόστηκαν. Το θεραπευτικό σχήμα πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης (ομάδες Β1 και Γ1) ήταν το αποτελεσματικότερο, διότι εμφάνισε την μεγαλύτερη μείωση του επιπολασμού. Δεύτερο σε αποτελεσματικότητα ήταν το σχήμα της οξυτετρακυκλίνης (ομάδες Β2 και Γ2) και τρίτο σε θεραπευτική αποτελεσματικότητα, το σχήμα της ενροφλοξασίνης (ομάδες Β3 και Γ3). Όμως παρά την μείωση της συχνότητας απομόνωσης, σε καμία ομάδα της κατηγορίας Γ ο επιπολασμός δεν μειώθηκε στα επίπεδα της ομάδας Α (μάρτυρες). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει είτε μια νέα ισορροπία στο μικροβιακό οικοσύστημα του υγιούς πλέον μαστού, είτε την αντικατάσταση παθογόνων στελεχών από μη παθογόνα.

Παρόμοια είναι και η εικόνα σε ότι αφορά το μέγεθος των πληθυσμών. Αν και σε όλες τις ομάδες Γ (μετά το πέρας του χρόνου αναμονής) παρατηρείται μείωση των πληθυσμών σε σχέση με τις ομάδες Β (σε διαδικασία θεραπείας και λήψης αντιβιοτικού), οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές (t-test για $p < 0,05$) στις περιπτώσεις Β1-Γ1 και Β3-Γ3. Στην περίπτωση Β2-Γ2 η παρατηρούμενη μείωση είναι οριακή (μικρής κλίμακας) και δεν είναι στατιστικά σημαντική. Έτσι στις περιπτώσεις

B1-Γ1 και B3-Γ3, εκτός από μείωση του επιπολασμού, παρατηρήθηκε και μείωση του πληθυσμού μετά την θεραπεία. Στην περίπτωση B2-Γ2 στατιστικά σημαντική ήταν μόνο η μείωση του επιπολασμού αλλά όχι η μείωση του πληθυσμού *E. coli*. Όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στη συζήτηση για τη μεταβολή του επιπολασμού, έτσι ακριβώς και στη μεταβολή των πληθυσμών, οι μεταβολές από τη νόσο στη θεραπεία δεν αποκατέστησαν τους πληθυσμούς *E. coli* στα αρχικά επίπεδα της ομάδας A (μάρτυρες) (t-test, $p < 0,05$).

Εδώ πρέπει να γίνει μια παρατήρηση η οποία αφορά όλους τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν και όλες τις ομάδες. Η μαστίτιδα των αιγοπροβάτων είναι πολυσύνθετο κλινικό νόσημα με πολύπλοκη αιτιοπαθογένεια. Ενώ η κλινική διάγνωση είναι σχετικά εύκολη με βάση τα κλινικά σημεία του μαστού (διόγκωση, θερμότητα, ερυθρότητα δέρματος, πόνος και αλλοίωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εκκρίματος), η αιτιολογική διάγνωση είναι πολύ δύσκολη και απαιτεί ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις. Σκοπός της παρούσας μελέτης δεν ήταν η διερεύνηση των αιτιών της μαστίτιδας των αιγοπροβάτων και η θεραπεία αυτής και για αυτόν το λόγο δεν έγινε συστηματική εργαστηριακή προσπάθεια για την εξακρίβωση των αιτιών του νοσήματος. Οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν ενδεχομένως να μην ήταν τα μόνα ή τα κύρια αίτια εκδήλωσης του νοσήματος. Η παθογένεια της μαστίτιδας πρέπει να γίνει αντιληπτή κυρίως ως μεταβολή του μικροβιακού οικοσυστήματος του μαστού που με τη σειρά του οφείλεται σε διαφορετικές αιτίες (πχ σφάλματα διαχείρισης του ποιμνίου, κακή διατροφή, κακές συνθήκες σταβλισμού κλπ). Οι διαταραχές του μικροβιακού οικοσυστήματος του μαστού οι οποίες προκάλεσαν την μαστίτιδα στα ποιμνια που έγινε η δειγματοληψία στην παρούσα μελέτη, ασφαλώς και επηρέασαν σε κάποιο βαθμό και τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Η θεραπεία με αντιβιοτικά και μάλιστα με διαφορετικά αντιβιοτικά για κάθε πειραματική ομάδα είναι καταλυτικός παράγοντας διαμόρφωσης νέων ισορροπιών μεταξύ διαφορετικών ειδών. Η θεραπευτική δράση του κάθε αντιβιοτικού λόγω του διαφορετικού μηχανισμού δράσης εκδηλώνεται με διαφορετική ένταση σε κάθε μικροβιακό οικοσύστημα. Με τον τρόπο αυτό, παρόμοια μικροβιακά οικοσυστήματα υπό την επίδραση διαφορετικών αντιβιοτικών καταλήγουν σε διαφορετικές καταστάσεις ισορροπίας λόγω της διαφορετικής ευαισθησίας / ανθεκτικότητας των ποικίλων ειδών που αποτελούν τον αρχικό πληθυσμό.

Η ως άνω παρατήρηση γίνεται εργαλείο ερμηνείας των ευρημάτων τόσο στην περίπτωση του επιπολασμού όσο και των μεγεθών των πληθυσμών. Αν για παράδειγμα θεωρηθεί η συχνότητα απομόνωσης *E. coli* στην ομάδα A (μάρτυρες) ως «κανονική»,

«φυσιολογική» και «συνήθης», τότε θα έπρεπε ο επιπολασμός και στις τρεις ομάδες της κατηγορίας Γ να είναι ίσος ή έστω παρεμφερής με αυτόν της ομάδας Α. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται και η μόνη εύλογη ερμηνεία είναι ότι μετά την διαταραχή των ισορροπιών του μικροβιακού οικοσυστήματος λόγω της νόσου κατά την αποκατάσταση της υγείας διαμορφώθηκαν νέες ισορροπίες μεταξύ των πληθυσμών του οικοσυστήματος, τέτοιες που να ευνοούν την *E. coli*. Στον πίνακα 56 φαίνεται ο επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 στις ομάδες της κατηγορίας Β και της κατηγορίας Γ, αν λάβουμε δογματικά ότι θετικότητα στις βιοχημικές δοκιμές, υποδηλώνει και θετικότητα στην ύπαρξη *E. coli* O157:H7

Πίνακας 56: Συγκριτική κατανομή στελεχών *E. coli* O157:H7 μεταξύ των πειραματικών ομάδων σε δείγματα γάλακτος.

	B1	Γ1	B2	Γ2	B3	Γ3	Σύνολο
<i>E. coli</i> O157:H7	5	2	4	4	5	10	30
<i>E. coli</i>	25	8	9	5	11	4	62
Σύνολο	30	10	13	9	16	14	92

Από τον πίνακα 56 προκύπτει μια διαφοροποιημένη εικόνα σε ότι αφορά τα στελέχη *E. coli* O157:H7. Ο επιπολασμός τους μειώνεται από την ομάδα Β1 στην ομάδα Γ1, παραμένει σταθερός στις ομάδες Β2-Γ2, ενώ αυξάνεται από την ομάδα Β3 στην ομάδα Γ3. Αν συγχωνευθούν οι ομάδες Β μεταξύ τους καθώς και οι ομάδες Γ μεταξύ τους, τότε γίνεται αντιληπτό ότι παρά το γεγονός ότι ο συνολικός επιπολασμός *E. coli* στις ομάδες Β μειώνεται, ο επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 αυξάνεται (Πίνακας 57).

Πίνακας 57: Σύμπτυξη του Πίνακα 56

	Β (συνολικό)	Γ (συνολικό)	Σύνολο
<i>E. coli</i> O157:H7	14	16	30
<i>E. coli</i>	45	17	62
Σύνολο	59	33	92

Η διαφορά των επιπολασμών στον Πίνακα 57 είναι στατιστικά σημαντική για την δοκιμή χ^2 (δοκιμή της ανεξαρτησίας για $p < 0,05$) που σημαίνει ότι γενικά μετά την θεραπεία αυξήθηκε σημαντικά ο συνολικός αριθμός των απομονωθέντων στελεχών *E. coli* O157:H7, ενώ μειώθηκε ο συνολικός αριθμός των «απλών» *E. coli*. Αυτή η

αυξομείωση είναι μια στατιστικά σημαντική συμμεταβολή. Η αύξηση αυτή μπορεί να ερμηνευθεί με τον μηχανισμό της εγκαθίδρυσης νέων ισορροπιών μεταξύ βακτηριακών ειδών και πληθυσμών μετά τη νόσηση και την φαρμακευτική αγωγή. Το οικολογικό κενό που αφήνει η μείωση της «απλής» *E. coli* το καταλαμβάνει -σε ένα βαθμό- η *E. coli* O157:H7. Σε μια τέτοια περίπτωση η προέλευση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού είναι περιβαλλοντική και πιθανόν αντανακλά την παλαιότητα της σταβλικής εγκατάστασης σε συνδυασμό με τις κακές συνθήκες υγιεινής.

Στην περίπτωση όμως που θεωρηθεί ότι θετικότητα στην ύπαρξη *E. coli* O157:H7 απαιτεί θετικότητα στις βιοχημικές δοκιμές και θετική οροτύπηση στο σωματικό αντιγόνο O157 και βλεφαριδικό αντιγόνο H7, τότε ο πίνακας 56 δίδει την θέση του στον πίνακα 58 (που απορρέει από τον πίνακα 54).

Πίνακας 58: Συγκριτική κατανομή στελεχών *E. coli* O157:H7 μεταξύ των πειραματικών ομάδων σε δείγματα γάλακτος.

	B1	Γ1	B2	Γ2	B3	Γ3	Σύνολο
<i>E. coli</i> O157:H7	1	4	5	0	2	1	13
<i>E. coli</i>	25	8	9	5	11	4	62
Σύνολο	26	12	14	5	13	5	75

Από τον πίνακα 58 προκύπτει μια τελείως αντίστροφη εικόνα σε ότι αφορά τα στελέχη *E. coli* O157:H7, σε σχέση με τα αποτελέσματα του πίνακα 56. Ο επιπολασμός τους αυξάνεται από την ομάδα B1 στην ομάδα Γ1, εμφανίζει μια πτωτική τάση από την ομάδα B3 στην ομάδα Γ3 και που οδηγεί στην εκμηδένιση από την ομάδα B2 στην ομάδα Γ2.

Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία η *E. coli* O157:H7 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως παθογόνο μικρόβιο το 1982, κατά τη διάρκεια έξαρσης λοιμώξεων του γαστρεντερικού συστήματος με έντονα συμπτώματα στις Η.Π.Α. (Marzocca et al 2006). Ως αιτιολογικός παράγοντας αναγνωρίστηκε ότι ήταν ένας σπάνιος ορότυπος της *E. coli*, η *E. coli* O157:H7. Ο ορότυπος αυτός είχε ταυτοποιηθεί, στο παρελθόν, ακόμη μία φορά, όπου εμπλεκόνταν μόνο ένας ασθενής με επιβεβαρημένο ιατρικό ιστορικό (Marzocca et al. 2006). Μετά το 1982 τα επόμενα δέκα χρόνια, περίπου 30 εξάρσεις λοιμώξεων τόσο του γαστρεντερικού συστήματος όσο και με τη μορφή συστηματικών νόσων, που οφείλονταν στο βακτήριο *E. coli* O157:H7 καταγράφηκαν στις Η.Π.Α. (Griffin and Tauxe 1991). Οι ορότυποι της *E. coli* O157:H7

χαρακτηρίζονται ως εντεροαιμορραγικά στελέχη (EHEC) της *E. coli* και κατηγοροποιούνται ως τύποι verotoxin - παραγωγοί *E. coli* (VTEC) που προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα και μπορούν να οδηγήσουν σε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS), που μπορεί να καταλήξει σε σοβαρές βλάβες στα νεφρά (Bezirtzoglou 2010, Rahimi et al 2011). Τα στελέχη *E. coli* O157:H7 εμφανίζουν διαφορετικούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες ανάπτυξης και μεταβολισμού από τα άλλα παθογόνα στελέχη της *E. coli*. Ειδικότερα, είναι αρνητικά για εισχώρηση (δοκιμή sereny), προσκολλώνται μέσω του Κοινού Ινιδίου (ECP, *E. coli* Common Pillus) (Rendón et al 2007) και δεν προκαλούν αιμόλυση. Επίσης, είναι σορβιτόλη - αρνητικά σε σχέση με το 93% του συνόλου των στελεχών της *E. coli* τα οποία είναι σορβιτόλη-θετικά (Delahay et al 2001). Η *E. coli* O157:H7 είναι αρνητική στη δοκιμή υδρόλυσης της β-γλυκουρονιδάσης και δεν αναπτύσσεται στους 45°C, παρουσία 0,15% χολικών αλάτων (Doyle and Buchanan 2012). Λόγω δε της πολύ χαμηλής δόσης (ποσότητας σε cfu/ml) που χρειάζεται προκειμένου να προκαλέσει λοίμωξη και της ικανότητάς της να επιβιώνει στις αντίξοες συνθήκες της κατάψυξης αποτελεί μικροοργανισμό που θεωρείται ως παράγοντας ελέγχου, προκειμένου να μην θιγεί η Δημόσια υγεία (Roberts et al 1996, Paton and Paton 1998).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν σχετικά λίγες μελέτες που διαπραγματεύονται την απομόνωση στελεχών *E. coli* O157:H7 σε νωπό πρόβειο γάλα (Little and De Louvois 1999, Rubini et al 1999, Chapman et al 2001, Dontorou et al 2003, Caro et al 2006, Gundogan and Avcı 2014). Η συχνότητα απομόνωσης στις προαναφερόμενες μελέτες κυμαινόταν από τιμές 0, 0,6, 1, 2 και 3,5 % αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη η συχνότητα απομόνωσης της *E. coli* O157:H7 στα εξεταζόμενα δείγματα γάλακτος, που προέρχονται από ζώα τα οποία είχαν υποβληθεί πρόσφατα σε θεραπευτικό σχήμα ήταν 3,25% (στηριζόμενοι στην οροτύπηση) και 7,5% (στηριζόμενοι μόνο στον φαινότυπο βιοχημικών δοκιμών). Οι παρατηρούμενες διαφορετικές τιμές απομόνωσης που καταγράφονται από μελέτη σε μελέτη αποδίδονται σε πολλούς αιτιολογικούς παράγοντες, όπως: τήρηση διαφορετικών συνθηκών υγιεινής κατά την άλμexη, επιρροή του γεωγραφικού αναγλύφου εκτροφής, τροποποιήσεις στις τεχνικές δειγματοληψίας και χρήση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης της παρουσίας του εν λόγω μικροοργανισμού (Blackburn and McCarthy 2000, Chapman 2000, Caro et al. 2006). Τη σημασία του τελευταίου προαναφερόμενου αιτιολογικού παράγοντα έρχεται να ενισχύσουν τα ευρήματα της παρούσας μελέτης όπου καταγράφονται διαφορετικές τιμές συχνότητας απομόνωσης της *E. coli* O157:H7. Όταν η ταυτοποίηση στηρίζεται μόνο στον φαινότυπο των βιοχημικών δοκιμών το ποσοστό απομόνωσης είναι 7,5%

και 3,25 % (σχεδόν μείωση κατά το ήμισυ) όταν η ταυτοποίηση ενισχύεται και με την οροτύπηση. Σε κάθε περίπτωση η οροτυπική τιμή του επιπολασμού στην παρούσα μελέτη (3,2%) πρέπει να χαρακτηριστεί ως μάλλον υψηλή σε σχέση με αυτές που δημοσιεύονται στη διεθνή βιβλιογραφία και πέραν των άλλων παραγόντων θα πρέπει να αποδοθεί στις ιδιαίτερα κακές συνθήκες υγιεινής των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων τόσο σε ότι αφορά τη διαβίωση των ζώων όσο και σε ότι αφορά την υγιεινή της άμελης.

Σχετικά πρόσφατη μελέτη ανέδειξε τη σημασία της μεθόδου απομόνωσης και ταυτοποίησης, όπου παρατηρήθηκε ότι η χρήση μόνο των βιοχημικών δοκιμών επιτρέπει διαφυγή θετικών δειγμάτων στην *E. coli* O157:H. Ενώ με τη χρήση «*E. coli* O157:H7 Rapid kit» και μετέπειτα πραγματοποίηση PCR δοκιμής αυξάνονται οι καταγραφηθείσες τιμές ανίχνευσης (Kim et al 2005). Στην παρούσα όμως μελέτη η οροτύπηση έρχεται να περικόψει σχεδόν κατά το ήμισυ την τιμή συχνότητας απομόνωσης της *E. coli* O157:H7 που δίδεται με τη χρήση μόνο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών βιοχημικών δοκιμών. Από τους πίνακες 54, 56, 57 και 58 παρατηρείται ότι θεραπευτική αγωγή με τη χρήση διαφορετικών αντιβιοτικών σκευασμάτων προκαλεί ποικιλομορφία και πιθανόν συνθήκες εισαγωγής σε λανθάνουσα κατάσταση της *E. coli* O157:H, κυρίως στις ομάδες Β1 και Γ3.

1β. Salmonella spp.

Στον Πίνακα 55 φαίνεται ο επιπολασμός των στελεχών *Salmonella spp* στις διάφορες πειραματικές ομάδες. Αρχικά στην ομάδα Α (μάρτυρες) ο επιπολασμός ήταν 5%. Στα ζώα υπό θεραπεία η συχνότητα απομόνωσης αυξήθηκε σε 9% (Β1), 10% (Β2) και 6% (Β3). Μετά την πάροδο του χρόνου αναμονής ο επιπολασμός είτε παρέμεινε σταθερός (9% στην ομάδα Γ1) είτε μειώθηκε ελαφρά (8% και 4% στις ομάδες Γ2 και Γ3 αντίστοιχα). Οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές, εύρημα το οποίο υποδηλώνει ότι είναι μικρής κλίμακας αλλά και ότι είναι τυχαίες.

Σε ότι αφορά τους πληθυσμούς η ομάδα των μαρτύρων υπερέχει αριθμητικά των υπόλοιπων ομάδων (t-test για $p < 0,05$). Τόσο κατά τη νόσηση όσο και μετά τη θεραπεία οι πληθυσμοί των στελεχών *Salmonella spp* μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά και δεν επανήλθαν σε αυτά τα επίπεδα ακόμα και μετά την πάροδο του χρόνου αναμονής. Η κάμψη αυτή των πληθυσμών ενώ είναι στατιστικά σημαντική από την ομάδα Α (μάρτυρες στις άλλες ομάδες των κατηγοριών Β και Γ), δεν είναι στατιστικά σημαντική μεταξύ των ομάδων Β και της αντίστοιχης Γ. Αυτό σημαίνει ότι τόσο κατά την θεραπεία όσο και μετά οι πληθυσμοί παρέμειναν μειωμένοι μεν σε

σχέση με τους μάρτυρες αλλά πρακτικά αμετάβλητοι. Προφανώς η διαταραχή της ισορροπίας του μικροβιακού οικοσυστήματος του μαστού κατά τη νόσηση αλλά και η θεραπευτική αγωγή δημιούργησαν νέα δυναμική πληθυσμών που οδήγησε σε νέα ισορροπία, ακριβώς όπως και στην περίπτωση της *E. coli*. Το γεγονός ότι τόσο σε επίπεδο πληθυσμού όσο και σε επίπεδο επιπολασμού δεν υπήρξαν επιδημιολογικά αξιόλογες μεταβολές, υποδηλώνει μάλλον τη μηδαμινή συμβολή των στελεχών *Salmonella* spp στην αιτιοπαθογένεια του νοσήματος.

2γ. Staphylococcus aureus.

Ενώ ο αρχικός επιπολασμός του μικροοργανισμού στους μάρτυρες ήταν 23%, κατά τη διάρκεια της νόσησης και της θεραπείας αυξήθηκε (πίνακας 55). Η αύξηση αυτή είναι πιο έντονη στην ομάδα B2 (34%) και στην ομάδα B1 (30%) και οριακή στην ομάδα B3 (24%). Στην λήξη του χρόνου αναμονής η συχνότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού στις ομάδες της κατηγορίας Γ είναι σαφώς μειωμένη ακόμα και κάτω από το αρχικό επίπεδο της ομάδας των μαρτύρων. Έτσι, ο επιπολασμός του *S. aureus* στις ομάδες Γ διαμορφώνεται ως εξής: 22% στις ομάδες Γ1 και Γ2 και 20% στην ομάδα Γ3. Όλες οι παραπάνω μεταβολές είναι στατιστικά σημαντικές και αυτό σημαίνει ότι ο επιπολασμός του *S. aureus* επηρεάστηκε από τη μαστίτιδα αλλά και από την θεραπευτική αγωγή. Για τους ίδιους λόγους που προαναφέρθηκαν στη συζήτηση για την *E. coli*, δεν ήταν στους σκοπούς της παρούσας έρευνας να διερευνήσει την εμπλοκή του *S. aureus* στην αιτιοπαθογένεια της μαστίτιδας των αιγοπροβάτων. Συνεπώς, δεν μπορεί να γίνει λόγος για θεραπευτικό αποτέλεσμα κρίνοντας από τις μεταβολές των επιπολασμών. Αυτό όμως που φαίνεται είναι ότι ο *S. aureus* έδειξε τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην δράση της κινολόνης (ενροφλοξασίνη).

Σε ότι αφορά τα μεγέθη των πληθυσμών οι πειραματικές ομάδες διαφοροποιούνται μεταξύ τους. Η βαθμιαία αριθμητική μείωση που παρατηρείται στον πληθυσμό από την ομάδα A στην ομάδα B1 και τελικά στην ομάδα Γ1 δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η μείωση του πληθυσμού του *S. aureus* από την ομάδα A στην ομάδα B2 είναι στατιστικά σημαντική (t test $p < 0,05$) αλλά η περαιτέρω παρατηρούμενη ελαφρά αύξηση από την ομάδα B2 στην ομάδα Γ2 δεν είναι στατιστικά σημαντική. Δηλαδή παρά την μείωση του επιπολασμού τα μεγέθη των πληθυσμών δεν μεταβλήθηκαν. Ο συνδυασμός αυτών των ευρημάτων σημαίνει πρακτικά ότι λιγότερα ζώα του ποιμνίου μετά την θεραπεία απέβαλλαν με το γάλα στελέχη του μικροοργανισμού, αλλά σε όσα παρέμειναν θετικά στον *S. aureus* ο πληθυσμός στην ουσία ήταν ποσοτικά αμετάβλητος. Το εύρημα αυτό ενδεχομένως να οφείλεται σε ατομικούς παράγοντες

των ζώων όπως η ηλικία, το ύψος της γαλακτοπαραγωγής, η πολυδυμία, η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος κλπ. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και στις πειραματικές ομάδες Β3 και Γ3. Ενώ δηλαδή η μείωση από την ομάδα Α στην ομάδα Β3 είναι στατιστικά σημαντική, η ελαφρά αύξηση από την ομάδα Β3 στην ομάδα Γ3 δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Διαπιστώθηκε δε μόνο ένα (1) δείγμα μαστικού εκκρίματος (γάλα) θετικό στην παρουσία στελέχους *S. aureus* ανθεκτικό στη μεθικιλίνη (MRSA) και πρόκειται για το δείγμα Νο 13 στην ομάδα Γ3 (προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής). Παρατηρήθηκε δε ότι το ίδιο δείγμα, τη χρονική περίοδο που αντιστοιχούσε στα μέσα της θεραπείας μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη (ομάδα Β3) εμφάνιζε παρουσία μόνο *S. aureus* MSSA (Μεθικιλίνη Ευαίσθητο). Η διαπίστωση αυτή θέτει προβληματισμούς για το αν η μετέπειτα παρουσία του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη (MRSA) στελέχους *S. aureus* θεωρείται ως «νέα» μόλυνση του δείγματος ή ο μικροοργανισμός υπήρχε στο μαστικό παράγχυμα και για κάποιο λόγο η χορήγηση της αντιβιοτικής θεραπείας στο ζώο δημιούργησε συνθήκες απόκρυψης αυτού.

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας πρόκλησης υποκλινικής και κλινικής μαστίτιδας των προβάτων είναι ο *Staphylococcus* spp. Ο *S. aureus* είναι το πιο συχνό παθογόνο που συναντάται στα τεταρτημόρια του μαστού με αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και αντιπροσωπεύει περίπου το 50% των ενδομαστικών λοιμώξεων των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων (Mørk et al 2007, Gundogan and Avcı 2014).

Ο *S. aureus* είναι ένας συμβιωτικός μικροοργανισμός τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο, όπου μπορεί ανά πάσα στιγμή να προκαλέσει επιφανειακές και εν τω βάθει λοιμώξεις (από ήπιες δερματικές λοιμώξεις έως και συστηματικές, πιθανά θανατηφόρες, όπως η ενδοκαρδίτιδα). Οι λοιμώξεις από *S. aureus* στον άνθρωπο σχετίζονται συχνά με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας και σε πρόσφατες μελέτες βρέθηκε ότι στις Η.Π.Α. το 2005 το συγκεκριμένο βακτήριο προκάλεσε περισσότερους θανάτους από ότι ο HIV/AIDS. Η δράση του *S. aureus* ως παθογόνου του ανθρώπου μπορεί να οφείλεται σε ένα μεγάλο ποσοστό στην ικανότητά του να παράγει τοξίνες οι οποίες συγκεντρώνονται στους ιστούς του ξενιστή ενώ δεν επηρεάζονται από την ανοσολογική απόκριση αυτού (Olson et al 2011).

Συγκρίνοντας τα ποσοστά απομόνωσης του *S. aureus* που καταγράφηκαν στην παρούσα μελέτη με ευρήματα προγενέστερων ερευνών διαπιστώνονται υψηλότερες

τιμές από άλλους ερευνητές: από 66,7 έως και 100 % (Gündoğan et al 2006, Bartolomeoli et al 2009, Gundogan and Avcı 2014). Ενώ άλλοι μελετητές αναφέρουν μηδενική συχνότητα απομόνωσης του εν λόγω μικροοργανισμού (Mersha et al 2010).

Η κύρια αποθήκη του *S. aureus* στα πρόβατα είναι οι μολυσμένοι μαστικοί αδένες και τα τραύματα των θηλών. Ωστόσο, ο *S. aureus* μπορεί επίσης να αναπτυχθεί και σε ανέπαφο δέρμα των θηλών, εμπλέκοντας και άλλα μέρη του σώματος. Στα κοπάδια γαλακτοπαραγωγής η μεταφορά του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της άμελης, είτε από τα χέρια του αλμεκτή, είτε από τον εξοπλισμό της αρμεκτικής μηχανής, θεωρείται σημαντικός μηχανισμός εξάπλωσης αυτού του οργανισμού. Στα κοπάδια κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης η μετάδοση του *S. aureus* μεταξύ των προβατίνων μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταφοράς από το βοσκό κατά τη διάρκεια του ελέγχου του μαστού με το χέρι ή ο μαστός εκτίθεται στη στρωμνή που έχει μολυνθεί από τις μολυσμένες προβατίνες. Κάποιοι αμνοί που θηλάζουν και από άλλες προβατίνες, εκτός από τη μητέρα τους, μπορεί να συμβάλλουν στο μηχανισμό εξάπλωσης του *S. aureus*. Οι υποκλινικά μολυσμένοι μαστοί αποκτούν σημαντικό ρόλο διατήρησης του *S. aureus* (αποθήκη) στις εγκαταστάσεις της εκτροφής και ως εκ τούτου διαδραματίζουν ισχυρό ρόλο στον φαύλο κύκλο επιμόλνσης υγιών ζώων της μονάδας.

Επίσης ευρήματα της παρούσης μελέτης ήταν ότι σε ομάδες ζώων που υποβλήθηκαν σε θεραπευτική αγωγή, παρά την μείωση του επιπολασμού που παρατηρήθηκε μετά τη λήξη του χρόνου αναμονής του χρησιμοποιθέντος αντιβιοτικού, τα μεγέθη των πληθυσμών του *S. aureus* δεν μεταβλήθηκαν. Άρα σε εκτροφές προβάτων η χρήση αντιβιοτικών σκευασμάτων (είτε για θεραπεία μαστίτιδας, είτε για κάποια άλλη λοίμωξη) μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός ισχυρού οικοσυστήματος στελεχών του *S. aureus*, με διακυμάνσεις των τιμών επιπολασμού αλλά με ισχυρή παρουσία.

1δ. Bacillus spp.

Στον Πίνακα 55 φαίνεται η συχνότητα απομόνωσης των στελεχών *Bacillus* spp στις διάφορες πειραματικές ομάδες. Ο επιπολασμός στην ομάδα Α (μάρτυρες) ήταν 28%. Στην ομάδα Β1 ανέρχονταν στο 34% και μειώθηκε στην ομάδα Γ1 στο αρχικό 28%. Η αντίθετη μεταβολή παρατηρήθηκε στις ομάδες Β2 και Γ2. Η συχνότητα απομόνωσης στην ομάδα Β2 μειώθηκε στο 26% και ανακάμπτει στην ομάδα Γ2 στο 38%. Στην ομάδα Β3 η μείωση του επιπολασμού είναι πολύ έντονη και φτάνει στο 6% ενώ μια μικρή ανάκαμψη παρατηρείται στην ομάδα Γ3 (8%). Όλες αυτές οι μεταβολές είναι στατιστικά σημαντικές (δοκιμή χ^2 για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας για $p < 0,05$) και θα πρέπει να αποδοθούν στη δυναμική των πληθυσμών του μικροβιακού οικοσυστήματος

του μαστού υπό την επίδραση των διαφορετικών θεραπευτικών σχημάτων. Σε ότι αφορά τους πληθυσμούς η εικόνα παρουσιάζει ιδιομορφίες. Αρχικά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πληθυσμού από την ομάδα Α στην ομάδα Β1 αλλά ακολούθησε στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα Γ1 (t test $p < 0,05$). Η ίδια στατιστικά σημαντική μεταβολή παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των ομάδων Β2 και Γ2. Στην ομάδα Β3 ενώ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα Α, η ακολουθούμενη αύξηση στην ομάδα Γ3 δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

1ε. Clostridium perfringens

Βλαστικές μορφές *Clostridium perfringens*:

- α) απομονώθηκαν σε ποσοστό 13% στα δείγματα της ομάδας Α.
- β) απομονώθηκαν σε ποσοστό 25% στα δείγματα της ομάδας Β1.
- γ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 35% στα δείγματα της ομάδας Γ1.
- δ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 36% στα δείγματα της ομάδας Β2.
- ε) απομονώθηκαν σε ποσοστό 38% στα δείγματα της ομάδας Γ2.
- στ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 30% στα δείγματα της ομάδας Β3.
- ζ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 10% στα δείγματα της ομάδας Γ3.

Σπορογόνες μορφές *Clostridium perfringens*:

- α) απομονώθηκαν σε ποσοστό 62 % στα δείγματα της ομάδας Α.
- β) απομονώθηκαν σε ποσοστό 49 % στα δείγματα της ομάδας Β1.
- γ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 57 % στα δείγματα της ομάδας Γ1.
- δ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 36% στα δείγματα της ομάδας Β2.
- ε) απομονώθηκαν σε ποσοστό 72% στα δείγματα της ομάδας Γ2.
- στ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 36 % στα δείγματα της ομάδας Β3.
- ζ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 74 % στα δείγματα της ομάδας Γ3.

Σε ότι αφορά τις βλαστικές μορφές του *Cl. perfringens* παρατηρήθηκε αύξηση των επιπολασμών στις ομάδες τις κατηγορίας Β. Στο μεταβατικό στάδιο από την αγωγή στην αποθεραπεία, ο επιπολασμός του συγκεκριμένου μικροοργανισμού αυξήθηκε ακόμα περισσότερο από την ομάδα Β1 προς την ομάδα Γ1, παρέμεινε σταθερός από την ομάδα Β2 προς την ομάδα Γ2, ενώ μειώθηκε κατά πολύ από την ομάδα Β3 στην ομάδα Γ3. Οι μεταβολές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές (δοκιμή χ^2 για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας για $p < 0,05$). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν την εμφανή

αποτελεσματικότητα της ενροφλοξασίνης έναντι της βλαστικής μορφής του *Cl. perfringens*.

Μετά την πάροδο του χρόνου αναμονής του χορηγηθέντος αντιβιοτικού σκευάσματος παρατηρήθηκε μετακύλιση των βλαστικών μορφών του *Cl. perfringens* σε σπορογόνες μορφές. Η μετάπτωση αυτή ήταν πιο έντονη μεταξύ των ομάδων Γ2 και Γ3, γεγονός που σημαίνει ότι η χρήση τετρακυκλίνης και κινολόνης, ως θεραπευτικό σχήμα, προκαλούν στρες στα βλαστικά κύτταρα του *Cl. perfringens*, με αποτέλεσμα να αναγκάζονται να υποστούν μεταμόρφωση και να μεταπέσουν σε πιο ανθεκτικές μορφές, δηλαδή τις σπορογόνων. Επίσης συγκρίνοντας την αρχική συχνότητα ανίχνευσης των βλαστικών μορφών του βακτηρίου στην ομάδα Α (μάρτυρες) παρατηρήθηκε το χρονικό διάστημα χορήγησης της αντιβιοτικής θεραπείας μία ενεργοποίηση των βλαστικών μορφών του βακτηρίου και ως εκ τούτου άνοδος στην συχνότητα ανίχνευσης αυτών.

Οι σπορογόνες μορφές του *Cl. perfringens* εμφανίζουν μειωμένο επιπολασμό στους νοσούντες μαστούς (ομάδες κατηγορίας Β) σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι τιμές των επιπολασμών αυξάνονται στις ομάδες της κατηγορίας Γ και μάλιστα στις ομάδες Γ2 και Γ3 ανέρχονται σε τιμές μεγαλύτερες από αυτές των μαρτύρων. Οι μεταβολές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές (δοκιμή χ^2 για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας για $p < 0,05$).

2. Μεταβολές στελεχών και πληθυσμών στις διαφορετικές εξεταζόμενες ομάδες ζώων, ως προς τα δείγματα κοπράνων

2α. *E. coli*

Σε ότι αφορά την *E. coli* οι τιμές απομόνωσης στις ομάδες Β1, Β2 και Β3 εμφάνισαν επιπολασμό του βακτηρίου 21%, 8% και 6% αντίστοιχα. Οι ομάδες Γ1, Γ2 και Γ3 εμφάνισαν επιπολασμό 11%, 7% και 9% αντίστοιχα. Οι μεταβολές αυτές της κατανομής των στελεχών *E. coli* στις ομάδες είναι στατιστικά σημαντικές (χ^2 δοκιμή της ανεξαρτησίας για $p < 0,05$). Οι προαναφερόμενες τιμές είναι κατά πολύ μικρότερες από τις τιμές ανίχνευσης του βακτηρίου στο μαστικό έκκριμα.

Το θεραπευτικό σχήμα πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης (ομάδες Β1 και Γ1) και η χορήγηση κινολόνης (ομάδες Β3 και Γ3) δίνουν τη μεγαλύτερη μείωση του επιπολασμού του εν λόγω βακτηρίου.

Στον πίνακα 59 φαίνεται ο επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 στις ομάδες της κατηγορίας Β και της κατηγορίας Γ, αν θεωρήσουμε δογματικά ότι θετικότητα στις

βιοχημικές δοκιμές, υποδηλώνει και θετικότητα στην ύπαρξη *E. coli* O157:H7. Ενώ στον πίνακα 60 αποτυπώνεται ο επιπολασμός του εν λόγω βακτηρίου, στην περίπτωση που η αποδοχή θετικότητας στην ύπαρξη *E. coli* O157:H7 απαιτεί θετικότητα στις βιοχημικές δοκιμές και θετική οροτύπηση στο σωματικό αντιγόνο O157 και βλεφαριδικό αντιγόνο H7.

Παρατηρήθηκε ότι με την πραγματοποίηση της οροτύπησης η συχνότητα απομόνωσης του εντεροτοξινογόνου βακτηρίου ελαχιστοποιείται έως και εκμηδενίζεται.

Πίνακας 59: Συγκριτική κατανομή στελεχών *E. coli* O157:H7 μεταξύ των πειραματικών ομάδων σε δείγματα κοπράνων.

	B1	Γ1	B2	Γ2	B3	Γ3	Σύνολο
<i>E. coli</i> O157:H7	6	2	6	6	8	3	31
<i>E. coli</i>	20	10	8	6	2	7	53
Σύνολο	27	12	14	12	10	10	84

Πίνακας 60: Συγκριτική κατανομή στελεχών *E. coli* O157:H7 μεταξύ των πειραματικών ομάδων σε δείγματα κοπράνων (βιοχημικό προφίλ και οροτύπηση).

	B1	Γ1	B2	Γ2	B3	Γ3	Σύνολο
<i>E. coli</i> O157:H7	1	-	2	2	3	1	8
<i>E. coli</i>	20	10	8	6	2	7	53
Σύνολο	21	10	10	8	5	8	61

Σε πρόσφατη μελέτη η συχνότητα απομόνωσης της *E. coli* O157:H7 από δείγματα κοπράνων αιγών και προβάτων ήταν 3,3 % και 5,4 % αντίστοιχα (Mersha et al. 2010). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι συμβατά με τα προαναφερόμενα, μόνο όταν η θετικότητα των δειγμάτων για το εν λόγω βακτήριο ενισχύεται με την επιβεβαίωση της οροτύπησης.

Άλλες έρευνες που αχολήθηκαν με τη μελέτη ανίχνευσης και απομόνωσης της *E. coli* O157:H7 δίδουν παρόμοια αποτελέσματα με διακύμανση στη συχνότητα απομόνωσης από 0, 0.2, 1.3, 4 και 4.8 % (Heuvelink et al 1998, Paiba et al 2002, Battisti et al 2006, Jensen and Lyon 2009, Mersha et al. 2010).

2β. *Salmonella* spp

Το βακτήριο *Salmonella* spp. απομονώθηκε μόνο στις ομάδες B2 και Γ2 με τις συχνότητες απομόνωσης 4 και 16, αντίστοιχα.

2γ. Staphylococcus aureus

Ο επιπολασμός του *S. aureus* στις ομάδες B1, B2 και B3 ήταν 18, 12 και 0%, αντίστοιχα. Ενώ για τις ομάδες Γ1, Γ2 και Γ3 διαμορφώθηκε στο 0, 4 και 30 %, αντίστοιχα. Όλες οι παραπάνω μεταβολές είναι στατιστικά σημαντικές και αυτό σημαίνει ότι ο επιπολασμός του *S. aureus* επηρεάστηκε από τη μαστίτιδα αλλά και από την θεραπευτική αγωγή. Παρατηρήθηκε λογική μείωση της συχνότητας απομόνωσης από την ομάδα B1 προς την ομάδα Γ1 και το ίδιο από την ομάδα B2 προς την ομάδα Γ2. Στις ομάδες όμως B3 και Γ3 παρατηρήθηκε ότι η μηδενική (0%) συχνότητα απομόνωσης του βακτηρίου μετατρέπεται, μετά τη λήψη χορήγησης θεραπείας στο ζώο, σε μία ομολογουμένως υψηλή τιμή απομόνωσης, της τάξης του 30 %. Κρίνεται απαραίτητο λοιπόν να διερευνηθεί στο μέλλον γιατί στο θεραπευτικό σχήμα μαστίτιδας με τη χρήση κινολόνης η παρουσία του *S. aureus*, σε δείγματα μαστικού εκκρίματος, είναι πολύ μικρή (ο μικροοργανισμός δείχνει μεγαλύτερη ευαισθησία), ενώ σε δείγματα κοπράνων από τα ίδια ζώα παρατηρείται εκτόξευση της τιμής απομόνωσης του εν λόγω βακτηρίου.

Σε καμία από τις εξεταζόμενες ομάδες δεν παρατηρήθηκε η παρουσία Μεθικιλίνη Ανθεκτικού (MRSA) στελέχους *S. aureus*.

Σε παρόμοιες μελέτες διαπιστώθηκαν μηδενικές έως πολύ μικρές συχνότητες απομόνωσης του εν λόγω βακτηρίου (Klimešová et al 2017).

2δ. Bacillus spp

Για τα στελέχη του βακτηρίου *Bacillus spp.* τιμές απομόνωσης στις ομάδες B1, B2 και B3 είχαν επιπολασμό του βακτηρίου 15%, 0% και 6% αντίστοιχα. Οι ομάδες Γ1, Γ2 και Γ3 είχαν επιπολασμό 17%, 6% και 10% αντίστοιχα. Οι μεταβολές αυτές της κατανομής των στελεχών *E. coli* στις ομάδες είναι στατιστικά σημαντικές (χ^2 δοκιμή της ανεξαρτησίας για $p < 0,05$). Οι προαναφερόμενες τιμές είναι κατά πολύ μικρότερες από τις τιμές ανίχνευσης του βακτηρίου στο μαστικό έκκριμα, κυρίως για τις ομάδες που αντιστοιχούν στα ζώα που βρίσκονταν υπό θεραπευτική αγωγή ακόμη.

2ε. Clostridium perfringens

Βλαστικές μορφές *Clostridium perfringens*:

- α) ΔΕΝ απομονώθηκαν στα δείγματα της ομάδας B1.
- β) απομονώθηκαν σε ποσοστό 35% στα δείγματα της ομάδας Γ1.
- γ) ΔΕΝ απομονώθηκαν στα δείγματα της ομάδας B2.

- δ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 12% στα δείγματα της ομάδας Γ2.
- ε) απομονώθηκαν σε ποσοστό 6% στα δείγματα της ομάδας Β3.
- στ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 28% στα δείγματα της ομάδας Γ3.

Σπορογόνες μορφές *Clostridium perfringens*:

- α) απομονώθηκαν σε ποσοστό 54 % στα δείγματα της ομάδας Β1.
- β) απομονώθηκαν σε ποσοστό 72 % στα δείγματα της ομάδας Γ1.
- γ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 22% στα δείγματα της ομάδας Β2.
- δ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 16% στα δείγματα της ομάδας Γ2.
- ε) απομονώθηκαν σε ποσοστό 14 % στα δείγματα της ομάδας Β3.
- θ) απομονώθηκαν σε ποσοστό 74 % στα δείγματα της ομάδας Γ3.

Σε όλα τα δείγματα κοπράνων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε μετάπτωση των απομονωθέντων βλαστικών μορφών στις ομάδες Β σε σπορογόνες μορφές στις ομάδες Γ, η οποία εικάζεται ότι αποτελεί λύση επιβίωσης του εν λόγω σπορογόνου μικροοργανισμού σε πιθανόν στρεσογόνο περιβάλλον που δημιουργεί η φαρμακευτική χορήγηση αντιβιοτικών στα ζώα.

3. Μικροβιακή Αντοχή

Δεδομένου ότι ο κύριος όγκος έρευνας της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της μικροβιακής αντοχής, σε δείγματα μαστικού εκκρίματος από προβατίνες που δέχτηκαν αντιβιοτική θεραπεία για μαστίτιδα, η σύγκριση θα αφορά τον αριθμό των αντιμικροβιακών παραγόντων έναντι των οποίων εμφανίστηκε αντοχή, την τιμή MIC (breakpoint) στην οποία διαπιστώθηκε η αντοχή καθώς και τον αριθμό των στελεχών τα οποία εμφάνισαν αντοχή. Στην τελευταία περίπτωση θα υπολογιστεί και ο λόγος των συμπληρωματικών πιθανοτήτων (Odd Ratio - OR). Το μέγεθος αυτό υποδηλώνει το πόσο πιο πιθανό είναι να εντοπιστούν ανθεκτικά στελέχη έναντι χρήσης συγκεκριμένου αντιβιοτικού (ως θεραπευτικό σχήμα) στις ομάδες της κατηγορίας Γ σε σχέση με αυτές της κατηγορίας Β. Για παράδειγμα $OR=6,5$ σημαίνει ότι στην ομάδα Γ ήταν 6,5 φορές πιο πιθανό να βρεθούν ανθεκτικά στελέχη έναντι του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε σχέση με την ομάδα Β. Τιμές του $OR<1$ δείχνουν ότι ο εξεταζόμενος παράγοντας (το πείραμα στη συγκεκριμένη περίπτωση) έδρασε προστατευτικά μειώνοντας τον κίνδυνο. Είναι ευνόητο ότι ο συγκεκριμένος υπολογισμός μπορεί να γίνει μόνο για αντιβιοτικά έναντι των οποίων εμφανίζεται

αντοχή τόσο σε ομάδα της κατηγορίας Β όσο και στην αντίστοιχη ομάδα της κατηγορίας Γ.

E. coli

Στον Πίνακα 61 παρουσιάζονται τα ανθεκτικά ανά πειραματική ομάδα στελέχη *E. coli* στα 12 αντιβιοτικά καθώς και οι MIC στις οποίες διαπιστώθηκε η αντοχή (breakpoints). Οι συγκρίσεις αφορούν τις ομάδες της κατηγορίας Β (ποίμνια στα οποία χορηγήθηκε συγκεκριμένο αντιβιοτικό ή συγκεκριμένος συνδυασμός αντιβιοτικών) με τις αντίστοιχες της κατηγορίας Γ (δειγματοληψία / γαλακτοληψία αμέσως μετά την πάροδο του χρόνου αναμονής).

Στην ομάδα Β1 παρατηρήθηκε αντοχή έναντι έξι (6) αντιβιοτικών ενώ στην ομάδα Γ1 έναντι επτά (7). Συγκεκριμένα και στις δύο ομάδες παρατηρήθηκε αντοχή έναντι της Αμπικιλίνης (OR=3,05), της Τετρακυκλίνης (OR=2,19), της Στρεπτομυκίνης (OR=3,28) και της Κεθαλοθίνης (OR=6,5) με ακριβώς ίδιες τιμές MIC για κάθε αντιβιοτικό και στις δύο ομάδες. Επιπλέον στην Ομάδα Β1 παρατηρήθηκε αντοχή έναντι της κλινδαμυκίνης και έναντι του ναλιδιξικού οξέος που δεν καταγράφηκε στην ομάδα Γ1, στην οποία όμως παρατηρήθηκε αντοχή έναντι της γενταμυκίνης, της κεφοταξίμης και της σιπροφλοξασίνης. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μικροβιακή αντοχή αυξήθηκε στην ομάδα Γ1 σε σχέση με την ομάδα Β1 παρά το γεγονός ότι ο επιπολασμός του μικροοργανισμού έχει μειωθεί (από 30% στην ομάδα Β1 σε 10% στην ομάδα Γ1).

Πίνακας 61: Ανθεκτικά στελέχη *E. coli* ανά πειραματική ομάδα και breakpoints (mg/L)

Ομάδες δειγμάτων	Αριθμός ανθεκτικών στελεχών για κάθε αντιβιοτικό											
	Am	Amc	Te	Chl	Ge	St	Tr/ Sulf	Nl a	Ce	Cef	Cip	Sulf
B1 (n=30)	19	-	7	6	-	7	-	11	4	-	-	-
B/P	32	-	16	32	-	64	-	32	8	-	-	-
Γ1 (n=10)	7	-	4	-	1	5	-	-	5	1	3	-
B/P	32	-	16	--	4	64	-	-	8	4	2	-
B2 (n=13)	11	-	5	-	4	6	-	6	3	1	3	-
B/P	16	-	8	-	8	64	-	32	16	4	2	-
Γ2 (n=9)	6	-	7	-	6	-	-	3	4	1	3	-
B/P	16	-	8	-	8	-	-	32	16	2	2	-
B3 (n=16)	14	1	9	7	8	-	-	5	6	-	-	-
B/P	16	64	16	16	8	-	-	32	8	-	-	-
Γ3 (n=14)	13	1	11	-	7	7	-	5	-	-	-	-
B/P	16	32	4	-	8	64	-	16	-	-	-	-

B/P: breakpoints, n: Αριθμός απομονωθέντων στελεχών

Στην ομάδα B2 παρατηρήθηκε αντοχή έναντι οκτώ (8) αντιμικροβιακών παραγόντων ενώ στην ομάδα Γ2 καταγράφηκε αντοχή έναντι επτά (7) αντιμικροβιακών παραγόντων (κοινοί με την ομάδα B2). Συγκεκριμένα οι κοινοί παράγοντες είναι η αμπικιλίνη (OR=0,36), η τετρακυκλίνη (OR=5,6), η γενταμυκίνη (OR=4,5), το ναλιδιξικό οξύ (0,58), η κεφαλοθίνη (OR=2,67), η κεφοταξίμη (OR=1,5) και η σπιροφλοξασίνη (OR=1,5). Με εξαίρεση την κεφοταξίμη η οποία εμφάνισε αντοχή σε μικρότερη τιμή MIC στην ομάδα Γ2, τα άλλα αντιβιοτικά εμφάνισαν αντοχή στις ίδιες ακριβώς τιμές MIC και στις δύο ομάδες. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι μαζί με την μείωση του επιπολασμού του μικροοργανισμού (από 26% στην ομάδα B2 σε 18% στην ομάδα Γ2) μειώθηκε εν μέρει και η μικροβιακή αντοχή όχι μόνο επειδή μειώθηκε ο αριθμός των αντιβιοτικών έναντι των οποίων εμφανίστηκε η αντοχή αλλά και διότι η αντοχή αυτή εμφανίζεται μειωμένη στην ομάδα Γ2 στις περιπτώσεις της αμπικιλίνης και του ναλιδιξικού οξέος (OR<1 και για τους δύο παράγοντες). Την μεγαλύτερη αύξηση της αντοχής εμφάνισε η τετρακυκλίνη, ένα εύρημα απολύτως αναμενόμενο με δεδομένο ότι στην πειραματική ομάδα B2 η θεραπευτική αγωγή γινόταν με την ουσία αυτή.

Στην ομάδα B3 αντοχή εμφανίστηκε έναντι επτά (7) αντιμικροβιακών παραγόντων και συγκεκριμένα έναντι της αμπικιλίνης, της αμικασίνης, της τετρακυκλίνης, της χλωραμφενικόλης, της γενταμυκίνης, του ναλιδιξικού οξέος και της κεφαλοθίνης.

Στην ομάδα Γ3 αντοχή καταγράφηκε έναντι της αμπικιλλίνης (OR=1,85), της αμικασίνης (OR=1,15), της τετρακυκλίνης (OR=2,85) της γενταμυκίνης (OR=1), του ναλιδιξικού οξέος (OR=1,22) και της στρεπτομυκίνης. Από τους έξι (6) αυτούς παράγοντες, οι πέντε πρώτοι είναι κοινοί με την ομάδα Β3 και στους οποίους η αντοχή αυξάνεται με εξαίρεση το ναλιδιξικό οξύ έναντι του οποίου η αντοχή μένει σταθερή. Τα breakpoints έχουν μειωθεί στις περιπτώσεις της αμικασίνης, της τετρακυκλίνης και του ναλιδιξικού οξέος ενώ έχουν παραμείνει αμετάβλητα στις περιπτώσεις των άλλων δυο κοινών παραγόντων.

S. aureus

Στην ομάδα Β1, καταγράφηκε αντοχή έναντι εννέα (9) αντιμικροβιακών παραγόντων, ενώ στην ομάδα Γ1 η αντοχή καταγράφηκε έναντι πέντε (5) αντιβιοτικών, κοινών με την ομάδα Β1 (Πίνακας 62). Οι κοινοί παράγοντες ήταν η πενικιλίνη (OR=3,71), η οξακυκλίνη (OR=2,77), η βανκομυκίνη (OR=1,42), η χλωραμφενικόλη (OR=0,30) και η κεθαλοθίνη (0,29). Στις περιπτώσεις της πενικιλίνης και της χλωραμφενικόλης τα breakpoints είναι αυξημένα. Τη μεγαλύτερη αύξηση στην αντοχή δείχνει η πενικιλίνη, ένα απολύτως αναμενόμενο εύρημα με δεδομένο ότι στην πειραματική ομάδα Β1 χρησιμοποιήθηκε η ουσία αυτή. Στην ομάδα Β2, καταγράφηκε αντοχή έναντι πέντε (5) μικροβιακών παραγόντων ενώ στην ομάδα Γ2 έναντι έξι (6) παραγόντων (πίνακας 62). Τέσσερις παράγοντες ήταν κοινοί και στις δύο ομάδες και συγκεκριμένα η βανκομυκίνη (OR=2), η ερυθρομυκίνη (OR=7,87), η τετρακυκλίνη (OR=2,57) και η κεθαλοθίνη (OR=0,48). Τα breakpoints παραμένουν στις ίδιες τιμές και στις δύο ομάδες με εξαίρεση το breakpoint της τετρακυκλίνης στην ομάδα Γ2 το οποίο ελαττώθηκε, εύρημα το οποίο δεν είναι αναμενόμενο διότι η μείωση αυτή συνεπάγεται αύξηση της ευαισθησίας. Έτσι προκύπτει σχετική αύξηση των ανθεκτικών στελεχών αλλά με μειωμένη ευαισθησία. Η σχετική αύξηση της αντοχής της ερυθρομυκίνης ήταν υπερδιπλάσια της τετρακυκλίνης.

Πίνακας 62: Ανθεκτικά στελέχη ανά ομάδα και breakpoints του *S. aureus*

Ομάδες δειγμάτων & breakpoints	Αριθμός ανθεκτικών στελεχών για κάθε αντιβιοτικό																	
	Pe G	Am	Ox	Vn	Tcp	Er	Cl	Te	Chl	Ge	St	Fc a	Ce	Tr/Sulf	En	Cet	Cip	Tob
B1	4	14	6	3		2	1	5	4	-	-	-	17	-	-	-	-	-
B/P	0.25	4	4	4	-	1	2	8	16	-	-	-	16	-	-	-	-	-
Γ1	8	-	9	3	-	-	-	-	1	-	-	-	6	-	-	-	-	-
B/P	1	-	4	4	-	-	-	-	32	-	-	-	16	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	1	-	3	-	4	-	-	-	-	7	-	-	1	-	-
B/P	-	-	-	8	-	4	-	8	-	-	-	-	16	-	-	8	-	-
Γ2	-	-	-	2	-	3	-	9	3	-	-	4	5	-	-	-	-	-
B/P	-	-	-	8	-	4	-	2	16	-	-	0,5	16	-	-	-	-	-
B3	-	10	-	1	1	-	-	6	-	-	2	5	3	9	1	-	2	-
B/P	-	16	-	4	2	-	-	8	-	-	32	1	16	2	2	-	2	-
Γ3	-	8	1	-	7	-	-	3	3	7	-	-	5	-	5	-	4	-
B/P	-	16	4	-	1	-	-	8	8	6	-	-	16	-	2	-	2	-

B/P: breakpoints

Στην ομάδα B3 παρατηρήθηκε αντοχή έναντι δέκα (10) αντιμικροβιακών παραγόντων ενώ στην ομάδα Γ3 αντοχή καταγράφηκε έναντι εννέα (9) παραγόντων (Πίνακας 62). Έξι (6) παράγοντες ήταν κοινοί και στις δύο ομάδες και συγκεκριμένα η αμικικιλίνη (OR=0,8), η τετρακυκλίνη (OR=,43), η κεφαλοθίνη (OR=3), η ενροφλιξασίνη (OR=11) και η σιπροφλοξασίνη (OR=3,33). Αξιοσημείωτη είναι η σχετική αύξηση της αντοχής της τετρακυκλίνης η οποία δεν χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη της κτηνιατρικής και ενδεχομένως το εύρημα αυτό πιθανό να οφείλεται σε γενετικό παράγοντα. Από τις δύο κινολόνες η ενροφλοξασίνη παρουσιάζει υπερτριπλάσια αύξηση στη σχετική αντοχή σε σχέση με τη σιπροφλοξασίνη και αυτό είναι ένα μάλλον αναμενόμενο εύρημα με δεδομένο ότι στην πειραματική ομάδα B3 είχε χρησιμοποιηθεί ο συγκεκριμένος παράγοντας. και στις τρεις ομάδες της κατηγορίας Γ ο επιπολασμός του μικροοργανισμού μειώνεται αλλά επειδή υπήρξε κλινική ίαση, αυτό σημαίνει ότι τα λίγα κλινικά υγιή ζώα που έμειναν θετικά είναι φορείς της αντοχής που δημιούργησε ο πειραματισμός. Τα ζώα αυτά μπορεί να γίνουν πηγή μετάδοσης και διασποράς των ανθεκτικών μικροοργανισμών σε άλλα ζώα του ίδιου κοπαδιού ή και σε ανθρώπους μέσω των προϊόντων τους.

Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην μικροβιακή αντοχή από τις ομάδες της κατηγορίας B στις κατηγορίες Γ ενδεχομένως να οφείλονται σε άμεση επίδραση του κάθε αντιβιοτικού που χορηγήθηκε στην αντίστοιχη πειραματική ομάδα. Η άμεση

επίδραση του αντιβιοτικού μέσω του μηχανισμού της φυσικής επιλογής ευνοεί την ανάπτυξη των μικροοργανισμών εκείνων που φέρουν γενετικά στοιχεία που κωδικοποιούν την αντοχή. Μπορεί όμως η επίδραση να είναι και έμμεση δηλαδή να εξαλείφονται κατά τη θεραπεία τα ευαίσθητα μικρόβια αλλά μέχρι την πάροδο του χρόνου αναμονής να έχουν αντικατασταθεί από άλλα μικρόβια του ίδιου είδους τα οποία να προέρχονται από το περιβάλλον και να έχουν αντοχή. Θα μπορούσε δηλαδή ένα μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής να οφείλεται σε προηγούμενες θεραπείες των συγκεκριμένων ποιμνίων οι οποίες επέφεραν στα ποίμνια ένα συγκεκριμένο προφίλ αντοχής.

ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

S. aureus

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 63 από τα 96 στελέχη *S. aureus*, τα οποία όλα είναι MSSA (Μεθικιλίνη Ευαίσθητος *S. aureus*) που απομονώθηκαν συνολικά από τις πειραματικές ομάδες, τα 6 εμφάνισαν καθολική ευαισθησία έναντι όλων των αντιμικροβιακών παραγόντων, τα 19 ήταν μονοανθεκτικά ενώ τα υπόλοιπα 71 ήταν πολυανθεκτικά (73,95%). Το ποσοστό αυτό είναι αρκετά υψηλό αλλά ενδεχομένως μεγάλο μέρος της αντοχής αυτής να οφείλεται σε διασταυρούμενη αντοχή μεταξύ αντιβιοτικών με τον ίδιο μηχανισμό δράσης ή με τον ίδιο στόχο δράσης στο βακτηριακό κύτταρο. Το μοναδικό απομονωθέν MRSA (Μεθικιλίνη Ανθεκτικό *S. aureus*) από δείγμα της ομάδας Γ3, σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα 51 κρίνεται ιδιαίτερος πολυανθεκτικό δηλαδή εμφάνισε ανθεκτικότητα σε 6 από τα 10 συνολικά χρησιμοποιηθέντα αντιβιοτικά και συγκεκριμένα στην τερακυκλίνη, στην γενταμυκίνη, στην ερυθρομυκίνη, στην κλινταμυκίνη, στην σιπροφλοξασίνη και στην τειχοπλανίνη.

Πίνακας 63: Ανθεκτικότητα των στελεχών του *S. aureus* ανά πειραματική ομάδα.

Ομάδες δειγμάτων	Αριθμός Αντιβιοτικών							Σύνολο
	0	1	2	3	4	5	6	
B1	4	5	13	4	2	1	1	30
Γ1	2	2	9	5	3	-	1	22
B2	-	7	2	2	-	-	-	11
Γ2	-	3	3	3	2	-	-	11
B3	-	2	5	2	1	1	1	12
Γ3	-	-	2	3	3	1	1	10
Σύνολο	6	19	34	19	11	3	4	96

Τα στελέχη που εμφανίζουν ευαισθησία έναντι όλων των αντιβιοτικών κατανέμονται στις ομάδες B1 και Γ1 και μάλιστα μειώνονται από τη B1 στη Γ1. Τα περισσότερα μονοανθεκτικά βρέθηκαν στην ομάδα B2 (7) και ακολουθεί η ομάδα B1 (5). Η πολυπληθέστερη ομάδα είναι εκείνη των στελεχών που εμφάνισαν αντοχή σε 2 αντιβιοτικά, ενώ οι ομάδες των στελεχών που εμφανίζουν αντοχή σε 1 αντιβιοτικό ή σε 3 αντιβιοτικά βρίσκονται στην ίδια σειρά κατάταξης. Τα ιδιαίτερος πολυανθεκτικά στελέχη (έναντι 5 και 6 αντιβιοτικών) κατανέμονται κατά κύριο λόγο στις ομάδες B3 και Γ3. Οι ομάδες της κατηγορίας B στο σύνολό τους έχουν 34 πολυανθεκτικά στελέχη ενώ οι ομάδες της κατηγορίας Γ στο σύνολό τους έχουν 37 πολυανθεκτικά στελέχη. Η μαστίτιδα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες οντότητες λοιμώξεων στα μικρά μυρμηκαστικά (πρόβατα και αίγες). Τις περισσότερες φορές η αιτιολογική διάγνωση μιας μαστίτιδας κρίνεται αδύνατη, διότι εμπλέκεται ένα μεγάλο εύρος μικροοργανισμών. Εντούτοις τις περισσότερες περιπτώσεις αποτυπώνεται η παρουσία (ως αιτιολογικός παράγοντας) κοαγκουλάση - αρνητικών σταφυλοκόκκων (CNS) και ο *S. aureus* (Mørk et al. 2007).) Η κύρια δεξαμενή του *S. aureus* στα αιγο-πρόβατα είναι οι μολυσμένοι μαστικοί αδένες και τα τραύματα των θηλών. Επίσης είναι δυνατή η μεταφορά και εγκατάσταση του εν λόγω βακτηρίου κατά τη διάρκεια της άμελης (όταν υπάρχει αμελκτική μηχανή), από τα χέρια του βοσκού κατά τη διάρκεια της χειρωνακτικής άμελης ή του ελέγχου του μαστού με το χέρι ή όταν ο μαστικός αδένας εκτίθεται στη στρωμνή που έχει μολυνθεί από τις μολυσμένες προβατίνες (Akindolire et al 2015, Teshome et al 2016).

Δεδομένης της υψηλής συχνότητας απομόνωσης του *Staphylococcus aureus* σε γαλακτοπαραγωγικές εκτροφές βοειδών και αιγο-προβάτων είναι ανεμενόμενο να εφαρμόζεται στις μονάδες αυτές, ένας συνδυασμός προληπτικών μέτρων για να μειωθεί ο αριθμός των νέων μολύνσεων περιλαμβάνοντας τη χρήση αντιβιοτικών. Τα

αντιβιοτικά που έχουν εγκριθεί για την ανωτέρω χρήση στις αγελάδες που βρίσκονται στη γαλακτοπαραγωγική και στην ξηρή περίοδο ως μέτρα για την αποφυγή και τη θεραπεία της μαστίτιδας περιλαμβάνουν την αμοξικιλίνη, την κεφαπρίνη, την κλοξακιλλίνη, την πιρλιμισίνη, την πενικιλίνη και τους συνδυασμούς της με τη νοβοβοκίνη ή τη στρεπτομυκίνη. Η αλόγιστη χρήση των χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών οδήγησε στην αύξηση της συχνότητας παρουσίας ανθεκτικών στα αντιβιοτικά σταφυλοκόκκων. Η ανάπτυξη αντοχής του *S. aureus* στη μεθικιλίνη (Methicillin-resistant *S. aureus* - MRSA) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1961, λίγο μετά την εισαγωγή αυτού του αντιβιοτικού στην ιατρική – κτηνιατρική πρακτική (Jevons 1961). Η εν λόγω αντοχή ελέγχεται από το *mecA* gene, το οποίο κωδικοποιεί την αλλοιωμένη δεσμευτική πρωτεΐνη της πενικιλίνης 2a και σχετίζεται με την αντοχή στην πενικιλίνη. Η εμφάνιση κοινοτικών στελεχών *S. aureus* που είναι ανθεκτικά στη μεθικιλίνη υποκρύπτουν γονίδια που σχετίζονται με αυξημένη λοιμογόνο δύναμη (Howden et al 2010). Σήμερα ο *S. aureus* θεωρείται ότι είναι τυπικά ένας πολυανθεκτικός μικροοργανισμός, που έχει ανθεκτικότητα στις πενικιλίνες, βανκομυκίνη και οξακιλλίνη (Kennedy et al 2008, Olson et al., 2011).

Μελέτες έχουν δείξει την εμφάνιση μη πολυανθεκτικών στελεχών *S. aureus*, τα οποία για παράδειγμα εμφανίζουν ευαισθησία στα ακόλουθα αντιβιοτικά: ciprofloxacin (77,8 – 100 %), gentamicin (88,8%), tetracycline (77,8 – 83,3%), amoxicillin (66,7 – 83,3%), vancomycin (88,2%) and Trimethoprim-Sulfamethoxazole (66,7- 83,3 %). Σε αντίθεση υψηλή ανθεκτικότητα, αποτυπώνεται σε διάφορες έρευνες, για το ναλιδιξικό οξύ (nalidixic acid) και την πενικιλίνη G (Teshome et al., 2016).

Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει τον προβληματισμό της εμφάνισης πολυανθεκτικότητας των απομονωθέντων στελεχών *S. aureus*, τα οποία κατανέμονται σχεδόν αποκλειστικά στις ομάδες Β3 και Γ3, δηλαδή στην ομάδα που τα ζώα έλαβαν θεραπευτικό σχήμα με κινολόνη. Ειδική προσοχή θα πρέπει να δοθεί ως προς την παρούσα διαπίστωση διότι η παρουσία ιδιαίτερος πολυανθεκτικών στελεχών του *S. aureus*, θα προκαλέσει έντονο προβληματισμό, είτε στην περίπτωση που αυτά τα στελέχη θα αποτελέσουν αιτιολογικό παράγοντα μαστίτιδας και θα είναι δύσκολο να βρεθεί κατάλληλο θεραπευτικό σχήμα, είτε αν εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα.

E. coli

Ο Πίνακας 64 δείχνει την κατανομή των ανθεκτικών στελεχών της *E. coli* στις διάφορες πειραματικές ομάδες.

Πίνακας 64: Κατανομή των ανθεκτικών στελεχών της *E. coli* στις ομάδες που μελετήθηκαν.

Ομάδες δειγμάτων	Αριθμός αντιβιοτικών								Σύνολο
	0	1	2	3	4	5	6	7	
B1	9	4	7	3	5	1	1	-	30
Γ1	1	2	2	1	1	1	1	1	10
B2	5	-	2	1	1	2	1	1	13
Γ2	-	2	-	2	3	2	1	2	12
B3	3	1	2	2	3	3	-	1	15
Γ3	1	-	1	2	3	2	5	4	18
Σύνολο	19	9	14	11	16	11	9	9	98

Τα πολυανθεκτικά στελέχη είναι 70 (71,4%) σαφώς περισσότερα των 19 ευαίσθητων και των 9 μονοανθεκτικών. Τα ιδιαίτερος πολυανθεκτικά (έναντι 6 και 7 αντιβιοτικών) κατανέμονται σχεδόν σε όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν αλλά η μεγαλύτερη συχνότητά τους απαντά στην ομάδα Γ3.

Στον Πίνακα 65 φαίνεται η κατανομή των ανθεκτικών στελεχών *E. coli* O157:H7 στις ομάδες που μελετήθηκαν. Στην ομάδα Γ3 βρέθηκαν 9 πολυανθεκτικά στελέχη, 6 εκ των οποίων είναι ιδιαίτερα πολυανθεκτικά. Το εύρημα αυτό σε συνδυασμό με το εύρημα της προηγούμενης παραγράφου θέτουν σοβαρή υποψία ότι το ποίμνιο της συγκεκριμένης ομάδας που μελετήθηκε έχει ιστορικό πολλών θεραπευτικών παρεμβάσεων με αντιβιοτικά διαφορετικών κατηγοριών. Οι παρεμβάσεις αυτές είχαν ως αποτέλεσμα την επικράτηση ανθεκτικών βακτηρίων στο μικροβιακό οικοσύστημα της εκτροφής.

Πίνακας 65: Κατανομή των ανθεκτικών στελεχών της *E. coli* O157:H7 στις ομάδες που μελετήθηκαν.

Ομάδες δειγμάτων	Αριθμός Αντιβιοτικών								Σύνολο
	0	1	2	3	4	5	6	7	
B1	1	-	-	1	3	-	-	-	5
Γ1	1	-	-	-	1	-	-	-	2
B2	-	-	-	-	1	1	1	-	4
Γ2	-	-	-	-	1	-	-	2	4
B3	1	-	2	1	-	-	-	1	5
Γ3	1	-	1	2	-	-	5	1	10
Σύνολο	4	-	3	4	6	6	6	4	30

Από την πρώτη σοβαρή επιδημία τροφιμογενούς νοσήματος, το 1982, που αποδόθηκε στην παρουσία του τύπου της *E. coli*, με σωματικό αντιγόνο O157 και το βλεφαριδικό H7, μέχρι και σήμερα έχουν καταγραφεί αρκετές εξάρσεις γαστρεντερικών λοιμώξεων, με συμπτώματα που τις συνοδεύουν και από άλλα συστήματα. Είναι αξιοσημείωτη η ένταση και σφοδρότητα των κλινικών συμπτωμάτων σε μερικές περιπτώσεις. Ενοχοποιητικοί παράγοντες κυρίως είναι η κατανάλωση τροφίμων ζωικής προέλευσης, κυρίως το ατελώς ψημένο μπιφτέκι σε σάντουιτς τύπου hamburger, το μη παστεριωμένο γάλα, τα μαλακά τυριά και λαχανικά τα οποία ποτίζονται με μη επεξεργασμένα λύματα. Οι Υγειονομικές Αρχές των ΗΠΑ και πολλών κρατών της Ευρωπαϊκής Ένωσης θεωρούν τη διασπορά του συγκεκριμένου ορότυπου ως σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Ο παράγοντας επικινδυνότητας του βακτηρίου αυτού θεωρείται πολύ υψηλός γιατί έχει πολύ μικρή μολύνουσα δόση. Αναφέρεται ότι δέκα μικροβιακά κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν νόσο στον άνθρωπο, σε σύγκριση με τις σαλμονέλλες που απαιτούνται 100.000 περίπου μικροβιακά κύτταρα και επίσης ότι η πρόγνωση της κλινικής εικόνας είναι δυσμενής, εφόσον εμφανιστούν τα κλινικά συμπτώματα. Μελέτες απέδειξαν ότι παραγωγικά ζώα, κυρίως τα μεγάλα μυρμηκαστικά, είναι φορείς αυτού του μικροοργανισμού με συχνότητα που κυμαίνεται από πολύ χαμηλά ποσοστά 1%, αλλά μπορεί όμως να φθάσει σε ποσοστό 60% των ζώων, ανάλογα με τις συνθήκες εκτροφής (Ostroff et al 1989, Rangel et al 2005).

Στη παρούσα μελέτη βρέθηκαν πολυανθεκτικά στελέχη *E. coli* σε ποσοστό 71,4%. Τα ιδιαίτερα πολυανθεκτικά (έναντι 6 και 7 αντιβιοτικών) κατανέμονται σχεδόν σε όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν αλλά η μεγαλύτερη συχνότητά τους απαντάται στην ομάδα Γ3, δηλαδή στην ομάδα που τα ζώα έλαβαν θεραπευτικό σχήμα με κινολόνη. Στην εν λόγω ομάδα (Γ3) βρέθηκαν 9 πολυανθεκτικά στελέχη *E. coli* O157:H7, τα 6 εκ των οποίων είναι ιδιαίτερα πολυανθεκτικά. Μελέτες αποτύπωσαν STEC στελέχη O157:H7 από δείγματα προβάτων, που ήταν στην πλειοψηφία τους ανθεκτικά σε ένα μόνο από τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά. Μόνο ένα στέλεχος ήταν ανθεκτικό στα αντιβιοτικά: αμπικιλίνη, αμπικιλίνη – σουλβακτάμη, κεφαλοσπορίνες, αμινογλυκοσίδες τετρακυκλίνη και στην χλωραμφαινικόλη. Έρευνες ως προς την εμφάνιση ανθεκτικότητας στελεχών *E. coli* O157H7 ανέδειξαν υψηλές τιμές ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (Jevons 1961, Riley et al 1983, Rahimi and Nayeypour 2012).

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά, τα κυριότερα συμπεράσματα της παρούσας διατριβής είναι:

- Ο επιπολασμός της *E. coli* O157:H7 τροποποιείται ανάλογα με τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο ανίχνευσης. Η χρήση μόνο φαινοτυπικών χαρακτήρων, μέσω των βιοχημικών εξετάσεων, μπορεί να δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα δε που λαμβάνονται με τη χρήση της οροτύπησης θα πρέπει να συγκριθούν με αυτά της τεχνικής PCR, προκειμένου να ενισχυθεί η άποψη περί υψηλής ευαισθησίας της μεθόδου οροτύπησης.
- Παρατηρήθηκε έντονη κινητικότητα των τιμών επιπολασμού των διαφόρων βακτηριακών ομάδων που μελετήθηκαν αλλά οι μεταβολές αυτών από τη νόσο (καταγραφή αυτών στο μέσο χρονικά μιας θεραπευτικής προσέγγισης) στη θεραπεία (μετά το πέρας του χρόνου αναμονής που δίδεται για κάθε θεραπευτικό σκεύασμα) δεν αποκατέστησαν τους πληθυσμούς *E. coli* στα αρχικά επίπεδα της ομάδας A (μάρτυρες).
- Η χρήση τετρακυκλίνης και κινολόνης, ως θεραπευτικό σχήμα σε μαστίτιδες, προκαλούν στρες στα βλαστικά κύτταρα του *Clostridium perfringens*, με αποτέλεσμα να αναγκάζονται να υποστούν μεταμόρφωση και να μεταπέσουν σε πιο ανθεκτικές μορφές, δηλαδή να σπορογονήσουν. Επίσης συγκρίνοντας την αρχική συχνότητα ανίχνευσης των βλαστικών μορφών του *Clostridium perfringens* στην ομάδα A (μάρτυρες) παρατηρήθηκε ότι κατά το χρονικό διάστημα χορήγησης της αντιβιοτικής θεραπείας συμβαίνει ενεργοποίηση των βλαστικών μορφών του βακτηρίου και ως εκ τούτου άνοδος στην συχνότητα ανίχνευσης αυτών.
- Διαπιστώθηκε μόνο ένα (1) δείγμα μαστικού εκκρίματος (γάλακτος) θετικό στην παρουσία Μεθικιλίνη Ανθεκτικό (MRSA) στέλεχος *S. aureus*, στα δείγματα της ομάδας Γ3 (προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη και μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής).
- Ανιχνεύθηκε υψηλό ποσοστό ανθεκτικότητας στελεχών του *S. aureus*, στα οποία ενδεχομένως μεγάλο μέρος της αντοχής τους, να οφείλεται σε διασταυρούμενη αντοχή μεταξύ αντιβιοτικών με τον ίδιο μηχανισμό δράσης ή με τον ίδιο στόχο δράσης στο βακτηριακό κύτταρο.
- Το μοναδικό απομονωθέν MRSA (Μεθικιλίνη Ανθεκτικό *S. aureus*) από δείγμα της ομάδας Γ3, κρίνεται ιδιαίτερα πολυανθεκτικό δηλαδή εμφάνισε ανθεκτικότητα σε 6 από τα 10 συνολικά αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν

(τερακυκλίνη, γενταμυκίνη, ερυθρομυκίνη, κλινταμυκίνη, σιπροφλοξασίνη και τειχοπλνίνη).

- Ανιχνεύθηκαν ιδιαίτερα πολυανθεκτικά στελέχη (71,4%) *E. coli*, έναντι 6 και 7 αντιβιοτικών, τα οποία κατανέμονται σχεδόν σε όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν αλλά η μεγαλύτερη συχνότητά τους απαντά στην ομάδα Γ3.
- Η ομάδα Γ3 συγκεντρώνει 9 πολυανθεκτικά στελέχη *E. coli*, τα 6 εκ των οποίων είναι ιδιαίτερα πολυανθεκτικά. Το εύρημα αυτό σε συνδυασμό με το εύρημα της προηγούμενης παραγράφου θέτουν σοβαρή υποψία ότι το ποίμνιο της συγκεκριμένης πειραματικής ομάδας έχει ιστορικό πολλών θεραπευτικών παρεμβάσεων με αντιβιοτικά διαφορετικών κατηγοριών. Οι παρεμβάσεις αυτές είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων στο μικροβιακό οικοσύστημα της εκτροφής.
- Χρειάζεται να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες, οι οποίες θα δίνουν πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την οικολογία των ανωτέρω βασικών βακτηριακών ομάδων, σε ζώα των εγκαταστάσεων εντατικών μονάδων όταν υποβάλλονται συχνά σε θεραπευτικές αγωγές, είτε προληπτικά, είτε στα πλαίσια θεραπευτικής προσέγγισης μίας μαστίτιδας.
- Κρίνεται πολύ σημαντικό να πραγματοποιηθούν μελέτες στο μέλλον, οι οποίες θα υιοθετήσουν το διερευνητικό σκεπτικό της παρούσης έρευνας, στοχεύοντας όμως στην ιδιαίτερη ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων που υπάρχουν στο νωπό γάλα.
- Αποδεχόμενοι ότι η μοναδικότητα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στη διατήρηση των ντόπιων παραδοσιακών ελληνικών γαλακτοκομικών προϊόντων οφείλεται στη μοναδικότητα της μικροβιακής ποικιλότητας και κατά κύριο λόγο στα αυτόχθονα οξυγαλακτικά βακτήρια, θα πρέπει να διερευνηθεί αν ταυτόχρονα ο βιολογικός αυτός πλούτος μπορεί να γίνει και ένα εργαλείο καθίζησης της ποιότητας του παραγόμενου τροφίμου στην περίπτωση που διαπιστωθεί σε μελλοντικές μελέτες ότι τα εν θέματι βακτήρια αποτελούν φορέα πολυανθεκτικότητας σε αντιβιοτικές ουσίες ή αποκαλυφθεί ότι διαθέτουν μηχανισμούς που να δημιουργούν πρόσφορο περιβάλλον ύπαρξης πολυανθεκτικών βακτηρίων.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιτήρηση της χρήσης αντιβιοτικών σκευασμάτων στην κτηνιατρική, στα κράτη μέλη της Ε.Ε. (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption - ESVAC) ξεκίνησε το 2009 από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων-European Medicines Agency (EMA).

Στοιχεία που δημοσιεύθηκαν από την Ευρωπαϊκή Υπηρεσία Φαρμάκων (EMA) αποκαλύπτουν ότι πολλές ευρωπαϊκές χώρες δεν έχουν θέσει τέλος στη μαζική κατάχρηση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία. Τα δεδομένα καταγραφής ως προς την χορήγηση αντιβιοτικών στην Ευρώπη αποκαλύπτουν ότι η χρήση αυτών είναι διπλάσια στα ζώα απ' ό τι στους ανθρώπους.

Μεταξύ της χρήσης αντιβιοτικών και της ανάπτυξης μικροβιακής αντοχής υπάρχει μια σαφής συσχέτιση, τόσο σε επίπεδο μεμονωμένων ζώων όσο και πληθυσμών. Ως εκ τούτου στις χώρες της Ε.Ε με τη μεγαλύτερη κατανάλωση αντιβιοτικών παρατηρούνται και τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής.

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί φυσιολογικό βιολογικό φαινόμενο και είναι συνέπεια φυσικής επιλογής, κατά την οποία μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν αντοχή σε κάποιον αντιμικροβιακό παράγοντα επιλέγονται και επικρατούν στον πληθυσμό των μικροοργανισμών, όταν ο εν λόγω πληθυσμός εκτεθεί στον παράγοντα αυτόν. Γονιδιακοί παράγοντες που καθορίζουν τη μικροβιακή αντοχή, μπορούν να μεταβιβάζονται μεταξύ μικροβίων. Τα ανθεκτικά στελέχη στη συνέχεια μπορούν να μεταδοθούν σε άλλον ξενιστή (άνθρωπο ή ζώο) ή/και να διασπαρούν στο φυσικό περιβάλλον. Οι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά μικροοργανισμοί αποτελούν απειλή για τη Δημόσια Υγεία. Η δε μετάδοση στον άνθρωπο, μέσω της τροφικής αλυσίδας (κυρίως μέσω του γάλακτος και κρέατος) παθογόνων μικροοργανισμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά τελευταία παίρνει ανησυχητικές διαστάσεις.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν:

(α) Η διερεύνηση και αξιολόγηση της επίδρασης διαφόρων θεραπευτικών σχημάτων για μαστίτιδα, που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κτηνιατρική πρακτική σε συγκεκριμένες βακτηριακές ομάδες [*E. coli* (με έμφαση στον ορότυπο O157:H7), *S. aureus*, *Salmonella spp*, *Bacillus spp* και *C. perfringens*] που απομονώθηκαν από δείγματα μαστικού εκκρίματος και κοπράνων, τα οποία ελήφθησαν από πρόβατα, στα οποία χορηγήθηκε θεραπεία με αντιβιοτικά σκευάσματα.

(β) Η χαρτογράφηση της ευαισθησίας/ανθεκτικότητας των απομονωθέντων βακτηριακών πληθυσμών του είδους *E. coli* και *S. aureus* έναντι αντιβιοτικών σκευασμάτων, που χρησιμοποιούνται στην ιατρική και κτηνιατρική πρακτική.

Εξετάστηκαν 30 κοπάδια με πρόβατα, τα οποία συμμετείχαν στις κλινικές δοκιμές και έγινε λήψη δειγμάτων μαστικού εκκρίματος (500 δείγματα) και κοπράνων (400 δείγματα). Στα ζώα που έγινε θεραπευτική αγωγή χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιβιοτικά σχήματα: (1) πενικιλίνη και στρεπτομικίνη, (2) σκεύασμα tetracycline-Log Active και (3) κινολόνη (ενροφλοξασίνη).

Οι ομάδες λήψης δειγμάτων διαμορφώθηκαν ως εξής:

(α) Ομάδα Α (ζώα Μάρτυρες – χωρίς χορήγηση θεραπευτικού σχήματος).

(β) Ομάδα Β (ζώα στα μέσα αγωγής με τη χορήγηση χημειοπροφύλαξης (σύμφωνα με τα προαναφερόμενα διαμορφώθηκαν τρεις υποομάδες B1, B2 & B3).

(γ) Ομάδα Γ [ζώα μετά το πέρας του χρόνου αναμονής που συστήνεται, σύμφωνα με το φυλλάδιο οδηγιών κάθε θεραπευτικού σχήματος (σύμφωνα με τα προαναφερόμενα διαμορφώθηκαν τρεις υποομάδες Γ1, Γ2 & Γ3)].

Η ανίχνευση ανθεκτικότητας των στελεχών *E. coli* και *S. aureus* που απομονώθηκαν, προσδιορίστηκε με τη μέθοδο αραίωσης των αντιβιοτικών σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα («Broth microdilution method»), σύμφωνα με τα δεδομένα του European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Ampicillin, Penicillin G, Oxacillin, Vancomycin, Teicoplanin, Erythromycin, Gentamicin, Streptomycin, Tetracycline, Chloramphenicol, Trimethoprim, Metronidazole, Nalidixic acid, Fucidic acid, Cefalotin, Cefoperazone, Enrofloxacin, Cefalexin, Ciprofloxacin, Sulfamethoxazole, Sulfathiazole, Cloxacillin, Clindamycin, Tobramycin.

Η διαφορά των καταγραφέντων επιπολασμών ως προς την απομόνωση της *E. coli* O157:H7 βρέθηκε στατιστικά σημαντική για την δοκιμή χ^2 (δοκιμή της ανεξαρτησίας για $p < 0,05$), που σημαίνει ότι γενικά μετά την χορήγηση θεραπευτικού σχήματος αυξήθηκε σημαντικά ο συνολικός αριθμός των απομονωθέντων στελεχών του εν λόγω μικροοργανισμού.

Παρατηρήθηκε έντονη κινητικότητα των τιμών επιπολασμού των διαφόρων βακτηριακών ομάδων που μελετήθηκαν αλλά οι μεταβολές αυτών από τη νόσο (καταγραφή αυτών στο μέσο χρονικά μιας θεραπευτικής προσέγγισης) στη θεραπεία (μετά το πέρας του χρόνου αναμονής που δίνεται για κάθε θεραπευτικό

σκεύασμα) δεν αποκατέστησαν τους πληθυσμούς *E. coli* στα αρχικά καταγραφέντα επίπεδα της ομάδας μάρτυρα.

Σε ότι αφορά την *E. coli* ο αρχικός επιπολασμός του βακτηρίου ήταν σχετικά χαμηλός (5%) στην ομάδα με τα ζώα μάρτυρες και μετέπειτα οι απομονώσεις αυξήθηκαν στα ζώα υπό θεραπεία και στη συνέχεια μειώθηκαν μετά την πάροδο του χρόνου αναμονής.

Το θεραπευτικό σχήμα πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης ήταν το αποτελεσματικότερο διότι εμφάνισε την μεγαλύτερη μείωση του επιπολασμού. Δεύτερο σε αποτελεσματικότητα ήταν το σχήμα της οξυτετρακυκλίνης και τρίτο σε θεραπευτική αποτελεσματικότητα, το σχήμα της ενροφλοξασίνης.

Ο επιπολασμός της *E.coli* O157:H7 γενικά αυξήθηκε μετά την πάροδο του χρόνου αναμονής, παρά τη συνολική μείωση του επιπολασμού των στελεχών *E. coli*.

Ο επιπολασμός των στελεχών *Salmonella spp* παρά τις αυξομειώσεις που καταγράφηκαν δεν μεταβλήθηκε σημαντικά μεταξύ των πειραματικών ομάδων.

Ο επιπολασμός του *S. aureus* επηρεάστηκε από τη μαστίτιδα αλλά και από την θεραπευτική αγωγή και έτσι οι απομονώσεις του μειώθηκαν σημαντικά με τη λήξη του χρόνου αναμονής.

Τα στελέχη *Bacillus spp* έδειξαν μέγιστη ευαισθησία στην ενροφλοξασίνη με ιδιαίτερα στατιστικά σημαντική μείωση του επιπολασμού τους με τη λήξη του χρόνου αναμονής.

Ο επιπολασμός των σπορογόνων μορφών του *C. perfringens* μειώθηκε κατά τη διάρκεια της νόσησης σε όλες τις πειραματικές ομάδες και αυξήθηκε με τη λήξη του χρόνου αναμονής. Στις βλαστικές μορφές παρατηρήθηκε αύξηση των απομονώσεων κατά τη διάρκεια της νόσου η οποία εντείνεται ακόμα περισσότερο μετά την αποθεραπεία.

Η χρήση τετρακυκλίνης ή κινολόνης, ως θεραπευτικό σχήμα, σε μαστίτιδες, προκαλούν στρες στα βλαστικά κύτταρα του *C. perfringens*, με αποτέλεσμα να αναγκάζονται να υποστούν μεταμόρφωση και να μεταπέσουν σε πιο ανθεκτικές μορφές, δηλαδή να σπορογονήσουν. Επίσης συγκρίνοντας την αρχική συχνότητα ανίχνευσης των βλαστικών μορφών του *C. perfringens* στην ομάδα Α (μάρτυρες) παρατηρήθηκε ότι κατά το χρονικό διάστημα χορήγησης της αντιβιοτικής θεραπείας συμβαίνει ενεργοποίηση των βλαστικών μορφών του βακτηρίου και ως εκ τούτου άνοδος στην συχνότητα ανίχνευσης αυτών.

Διαπιστώθηκε μόνο ένα (1) δείγμα μαστικού εκκρίματος (γάλα) ανθεκτικό στην Μεθικιλίνη (MRSA) στελέχους *S. aureus*, στα δείγματα της ομάδας που

περιελάμβανε προβατίνες που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία μαστίτιδας με χορήγηση του αντιβιοτικού κινολόνη και μετά την παρέλευση του χρόνου αναμονής.

Ανιχνεύθηκε υψηλό ποσοστό ανθεκτικότητας στελεχών του *S. aureus*, όπου ενδεχομένως μεγάλο μέρος της αντοχής αυτής να οφείλεται σε διασταυρούμενη αντοχή μεταξύ αντιβιοτικών με τον ίδιο μηχανισμό δράσης ή με τον ίδιο στόχο δράσης στο βακτηριακό κύτταρο.

Το μοναδικό απομονωθέν MRSA (Μεθικιλίνη Ανθεκτικό *S. aureus*) από δείγμα της ομάδας Γ3 κρίνεται ιδιαίτερα πολυανθεκτικό δηλαδή εμφάνισε ανθεκτικότητα σε 6 από τα 10 συνολικά αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν (τερακυκλίνη, γενταμυκίνη, ερυθρομυκίνη, κλινταμυκίνη, σπιροφλοξασίνη και τειχοπλανίνη).

Ανιχνεύθηκαν ιδιαίτερα πολυανθεκτικά στελέχη (71,4%) *E. coli*, έναντι 6 και 7 αντιβιοτικών, τα οποία κατανέμονται σχεδόν σε όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν αλλά η μεγαλύτερη συχνότητά τους απαντά στην ομάδα Γ3.

Τέλος, τα ποσοστά αντοχής και πολυανθεκτικότητας βρέθηκαν υψηλά, πιθανώς λόγω αυξημένης οριζόντιας μετάδοσης των γονιδίων αυτών, είτε λόγω φαινομένων διασταυρούμενης αντοχής. Αξιοσημείωτη ήταν η διαπίστωση ότι εκδηλώθηκε αντοχή ακόμα και έναντι αντιβιοτικών τα οποία δεν χρησιμοποιούνται στην θεραπευτική των παραγωγικών ζώων.

8. ABSTRACT

The European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) begun at 2009 by the European Medicines Agency (EMA).

Data published from EMA reveal that many European countries have failed to cease antibiotic drug misuse in animal farming. The same data suggests that the use of antibiotics to farm animals is twice as that to humans. Veterinary prescription practices are looser than the ones in human medicine.

There is a direct link between the use of antibiotics and the development of resistant strains. EU member states with the highest antibiotic consumption do have the highest rates of resistance.

Microbial resistance is a natural phenomenon based on natural selection of certain microorganisms from a population exposed to antibiotics. These strains finally dominate on the population while sensitive strains perish. Genetic determinants coding resistance can be transferred between bacteria. The resistant strains can infect another host (human or animal) or can be dispersed to the environment and pose a serious threat to Public Health. The transmission of resistant strains to humans via the food chain (milk and meat) is of increasing concern.

The aim of the present dissertation as a doctoral thesis is:

- a) The investigation and assessment of the effect of various therapeutic protocols used in veterinary practice for the treatment of the mastitis in small ruminants on bacteria isolated from the milk and feces of the treated sheep, such as *E. coli* (including serotype O157:H7), *S. aureus*, *Salmonella spp*, *Bacillus spp* and *C. perfringens*.
- b) The investigation of the susceptibility of the isolated strains of *E.coli* και *S. aureus* against a series of antibiotics used in medicine as well as in veterinary medicine.

Samples of milk and feces were collected from sheep belonging to 30 flocks. In total, 500 samples of milk were analyzed, originating from ewes treated for mastitis (400 samples) as well as from healthy animals [100 samples (martyrs)]. Also, 400 feces samples originating from ewes treated for mastitis, were analyzed. The treated ewes were divided in three groups receiving different drastic compounds. The milk samples were taken during treatment (infected udder) and right after the withdrawal period (treated udder) for every therapeutic compound used. The therapeutic protocols used included the following antibiotic substances a) penicillin and streptomycin, b) oxytetracycline and c) enrofloxacin.

The initial prevalence of *E. coli* was relatively low (5%), was increased in the animals under treatment and finally decreased at the end of the withdrawal period. The therapeutic protocol of penicillin-streptomycin was the most effective one.

The prevalence of *E. coli* O157:H7 increased at the end of the withdrawal period despite the total decrease of the *E. coli* strains.

The prevalence of *Salmonella spp* strains was not statistically significant altered among the experimental groups and the martyrs.

S. aureus was seriously affected by the mastitis and by the treatment and its prevalence was decreased significantly at the end of the withdrawal period for all groups.

The *Bacillus spp* strains showed an increased sensitivity to enrofloxacin and their prevalence was significantly reduced at the end of the withdrawal period.

The prevalence of the spore forms of *C. perfringens* was decreased during the treatment but was increased at the end of the withdrawal period. In the case of the vegetative forms an increase during the treatment period was observed, which intensified during the withdrawal period.

The susceptibility of the isolated *E. coli* and *S. aureus* strains was determined by the broth microdilution method according to the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

The following antimicrobial agents were used:

Ampicillin, Penicillin G, Oxacillin, Vancomycin, Teicoplanin, Erythromycin, Gentamicin, Streptomycin, Tetracycline, Chloramphenicol, Trimethoprim, Metronidazole, Nalidixic acid, Fucidic acid, Cefalotin, Cefoperazone, Enrofloxacin, Cefalexin, Ciprofloxacin, Sulfamethoxazole, Sulfathiazole, Cloxacillin, Clindamycin, Tobramycin.

A single sample was found positive to MRSA originating from an ewe at the end of the withdrawal period of enrofloxacin. This strain was characterized as multiresistant due to its resistance to 6 more substances.

A high percentage of the isolated strains of *S. aureus* were found highly resistant. This resistance-as in the case of *E coli* and *E coli* O157:H7- is probably due to cross resistance phenomena between substances with the same or similar mode of action or with the same target in the bacterial cell.

A large portion of the isolated *E. coli* strains were found resistant against 6 or 7 antibiotic substances. These strains were distributed to all the experimental groups

but their highest prevalence was recorded at the end of the withdrawal period of the enrofloxacin treated group.

In general, high levels of resistance and multiresistance against antibiotics were found, probably due to horizontal gene transfer or due to cross resistance phenomena. It is remarkable that this resistance was observed even against antibiotics that are not used in the veterinary clinical practice.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aarestrup F. M., 2006. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Emerging Infectious Diseases*, **12**(7), p 1180–1181.
2. Aarestrup F. M., Seyfarth A. M., Emborg H.-D., Pedersen K., Hendriksen R. S. and Bager F., 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **45**, p 2054-2059.
3. Aarestrup F. M., Wegener H. C. and Collignon P., 2008. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert review of anti-infective therapy*, **6**, p 733-750.
4. AbdelHameed K. G., 2016. Detection of *Prototheca zopfii* in raw milk and cheese with special reference to their antibiogram. *Journal of Food Safety*, **36**, p 214-219.
5. Acar J. and Rostel B., 2001. Antimicrobial resistance: an overview. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, **20**, p 797-810.
6. Addis M., 2015. A Review on Antibiotic Resistant and Implication on Food Chain. *Food Science and Quality Management*, **42**.
7. Adhikari R., and Pant N.D., 2017. Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and determination of minimum inhibitory concentration of vancomycin for *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples of the patients attending a tertiary care Hospital in Kathmandu, Nepal. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*.
8. Akindolire M. A., Babalola O. O., and Ateba, C. N., 2015. Detection of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* from milk: a public health implication. *International journal of environmental research and public health*, **12**(9), p 10254-10275.
9. Alais C. and Blanc B., 1975. Milk proteins: biochemical and biological aspects. In, *World review of nutrition and dietetics*, Vol. 20. Karger Publishers, pp. 66-167.
10. Alborn W., Allen N. and Preston D., 1991. Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **35**, p 2282-2287.
11. Al-Charrakh A., and Al-Muhana A., 2010. Prevalence of Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in a survey of dairy cattle in Najaf, Iraq. *Iranian journal of microbiology*, **2**(3), p 130.
12. Al-Gburi N. M., 2016. Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 in camels fecal samples. *Journal of Gene c and Environmental Resources*, **4**(1) p 46-50.
13. Alekshun M. N. and Levy S. B., 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, **128**, p 1037-1050.
14. Alexopoulos A., Voidarou C., Stefanis C., Papadopoulos I., Vavias S., Tsiotsias A. and Bezirtzoglou E., 2006. Antibiotic resistance profiles and integrons in *Enterobacteriaceae* from the riverside of Evros-Ardas with respect to chemical and waste pollution. *Microbial ecology in health and disease*, **18**(3-4), p 170-176.
15. Allison J., 1985. Antibiotic residues in milk. *British Veterinary Journal*, **141**, p 9-16.
16. Amábile-Cuevas C. F., 2013. Antibiotic resistance: from Darwin to Lederberg to Keynes. *Microbial Drug Resistance*, **19**, p 73-87.
17. Amábile-Cuevas C. F. and Chicurel M. E., 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell*, **70**, p 189-199.
18. Andersen J. L., He G.-X., Kakarla P., KC R., Kumar S., Lakra W. S., Mukherjee M. M., Ranaweera I., Shrestha U. and Tran T., 2015. Multidrug efflux pumps from

- Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *International journal of environmental research and public health*, **12**, p 1487-1547.
19. Andersen M. S., 1996. Tetracycline Resistance in *Staphylococcus aureus*. F. Hoffmann-La Roche AG.
 20. Anderson E., 1968. Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications. *Br Med J*, **3**, p 333-339.
 21. Andreoletti O., Budka H. and Buncic S., 2007. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *The EFSA Journal*, **579**, p 1-61.
 22. Appelbaum P., 2006. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, **12**, p 16-23.
 23. Ardic N., Ozyurt M., Sareyyupoglu B. and Haznedaroglu T., 2005. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. *International journal of antimicrobial agents*, **26**, p 213-218.
 24. Ariza-Miguel J., Hernández M., Fernández-Natal I. and Rodríguez-Lázaro D., 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* in livestock in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, p 4067-4069.
 25. Bager F., Madsen M., Christensen J. and Aarestrup F. M., 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive veterinary medicine*, **31**, p 95-112.
 26. Baker-Austin C., McArthur J., Tuckfield R. C., Najarro M., Lindell A. H., Gooch J. and Stepanauskas R., 2008. Antibiotic resistance in the shellfish pathogen *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water and sediment of Georgia and South Carolina, USA. *Journal of food protection*, **71**, p 2552-2558.
 27. Balouiri M., Sadiki M. and Ibsouda S. K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**, p 71-79.
 28. Balows A., 1974. Current techniques for antibiotic susceptibility testing. Charles C. Thomas Publisher.
 29. Clinical and Laboratory Standards Institute., 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty third informational supplement edition. CLSI Document M100-S23, CLSI, Wayne, Pa, USA.
 30. Barbano D., Rasmussen R. and Lynch J., 1991. Influence of Milk Somatic Cell Count and Milk Age on Cheese Yield1. *Journal of dairy science*, **74**, p 369-388.
 31. Barbano D., Ma Y. and Santos M., 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life 1, 2. *Journal of dairy science*, **89**, p E15-E19.
 32. Bartolomeoli I., Maifreni M., Frigo F., Urli G. and Marino M., 2009. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk for cheesemaking. *International journal of dairy technology*, **62**, p 366-371.
 33. Barry A. L., 1976. The antimicrobial susceptibility test: principles and practices, Lippincott Williams & Wilkins.
 34. Barton M. D., 2014. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Current opinion in microbiology*, **19**, p 9-15.
 35. Bath-Hextall F., Lymn J., Knaggs R. and Bowskill D., 2011. The New Prescriber: An integrated approach to medical and non-medical prescribing. John Wiley & Sons.
 36. Battisti A., Lovari S., Franco A., Di Egidio A., Tozzoli R., Caprioli A. and Morabito S., 2006. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in lambs at slaughter in Rome, central Italy. *Epidemiology & Infection*, **134**, p 415-419.

37. Bennedsgaard T. W., Thamsborg S. M., Aarestrup F. M., Enevoldsen C., Vaarst M. and Christoffersen A. B., 2006. Resistance to penicillin of *Staphylococcus aureus* isolates from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in Denmark. *Acta veterinaria scandinavica*, **48**, p 24.
38. Bennett P., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, **153**.
39. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., 1986. 9th Edit.
40. Berger-Bächi B. and Rohrer S., 2002. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Archives of microbiology*, **178**, p 165-171.
41. Beutin L. and Martin A., 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104: H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *Journal of food protection*, **75**, p 408-418.
42. Bezirtzoglou E., Alexopoulos A. and Voidarou C., 2008. Apparent antibiotic misuse in environmental ecosystems and food. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **20**(4), p 197-198.
43. Bezirtzoglou E., Maipa V., Voidarou C., Tsiotsias A. and Papapetropoulou M., 2000. Food-Borne Intestinal Bacterial Pathogens. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **2**, p 96-104.
44. Bezirtzoglou E., Alexopoulos A., Plessas S., Abas Z., Lagka V. and Zdragas A., 2013. Occurrence and Antibiotic Susceptibility Profile of *Streptococcus* spp. Isolated from Ewe's Milk. *Microbial Ecology in Health & Disease*, **24**.
45. Bhargava K., Wang X., Donabedian S., Zervos M., da Rocha L. and Zhang Y., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA. *Emerging infectious diseases*, **17**, p 1135.
46. Blackburn C. d. W. and McCarthy J., 2000. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157: H7 in foods. *International journal of food microbiology*, **55**, p 285-290.
47. Blázquez B., Llarrull L. I., Luque-Ortega J. R., Alfonso C., Boggess B. and Mobashery S., 2014. Regulation of the expression of the β -lactam antibiotic-resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biochemistry*, **53**, p 1548-1550.
48. Blondeau J. M., 2004. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of ophthalmology*, **49**, p S73-S78.
49. Boor K. J., 2001. ADSA foundation scholar award fluid dairy product quality and safety: looking to the future. *Journal of dairy science*, **84**, p 1-11.
50. Borges A., Abreu A. C., Dias C., Saavedra M. J., Borges F. and Simões M., 2016. New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. *Molecules*, **21**, p 877.
51. Bortolaia V., Espinosa-Gongora C. and Guardabassi L., 2016. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, **22**, p 130-140.
52. Breeze A., Sims P. and Stacey K., 1975. Trimethoprim-resistant mutants of *E. coli* K12: preliminary genetic mapping. *Genetics Research*, **25**, p 207-214.
53. Burow E., Simoneit C., Tenhagen B.-A. and Käsbohrer A., 2014. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli*—A systematic review. *Preventive veterinary medicine*, **113**, p 364-375.
54. Burrus V., Pavlovic G., Decaris B. and Guédon G., 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular microbiology*, **46**, p 601-610.
55. Burrus V. and Waldor M. K., 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Research in microbiology*, **155**, p 376-386.

56. Butaye P., Devriese L. A. and Haesebrouck F., 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical microbiology reviews*, **16**, p 175-188.
57. Bywater R., Silley P. and Simjee S., 2006. Antimicrobial breakpoints—definitions and conflicting requirements. *Veterinary microbiology*, **118**, p 158-159.
58. Cabello F. C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, **8**, p 1137-1144.
59. Caini S., Szomor K., Ferenczi E., Szekelyne Gaspar A., Csohan A., Krisztalovics K., Molnar Z. and Horváth J., 2012. Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011. *Euro Surveill*, **17**, p 1-8.
60. Calderón C. B. and Sabundayo B. P., 2007. 2 Antimicrobial Classifications. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, p 7.
61. Canton R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquere F. and Coque T., 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, **14**, p 144-153.
62. Carattoli A., 2011. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, **301**, p 654-658.
63. Carnevale R. A., 2005. Antimicrobial use in food animals and human health. *Médecine et maladies infectieuses*, **35**, p 105-106.
64. Caro I., Fernandez-Barata V. M., Alonso-Llamazares A. and Garcia-Armesto M. R., 2006. Detection, occurrence, and characterization of Escherichia coli O157: H7 from raw ewe's milk in Spain. *Journal of food protection*, **69**, p 920-924.
65. Castanheira M., Watters A. A., Mendes R. E., Farrell D. J. and Jones R. N., 2010. Occurrence and molecular characterization of fusidic acid resistance mechanisms among Staphylococcus spp. from European countries (2008). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**, p 1353-1358.
66. Chantziaras I., Boyen F., Callens B. and Dewulf J., 2013. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**, p 827-834.
67. Chapman P., 2000. Sources of Escherichia coli O157 and experiences over the past 15 years in Sheffield, UK. *Journal of Applied Microbiology*, **88**.
68. Chapman P., Malo A. C., Ellin M., Ashton R. and Harkin M., 2001. Escherichia coli O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *International journal of food microbiology*, **64**, p 139-150.
69. Chattopadhyay M. K., 2014. Use of antibiotics as feed additives: a burning question. *Frontiers in microbiology*, **5**.
70. Chen C.-R., Malik M., Snyder M. and Drlica K., 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *Journal of molecular biology*, **258**, p 627-637.
71. Chiller T. M., Barrett T. and Angulo F. J., 2004. CDC studies incorrectly summarized in 'critical review'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **54**, p 275-276.
72. Chopra I., 1976. Mechanisms of resistance to fusidic acid in Staphylococcus aureus. *Microbiology*, **96**, p 229-238.
73. Chopra I. and Roberts M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**, p 232-260.
74. Cisak E., Wójcik-Fatla A., Zajac V., Sroka J., Buczek A. and Dutkiewicz J., 2010. Prevalence of tick-borne encephalitis virus [TBEV] in samples of raw milk taken

- randomly from cows, goats and sheep in Eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **17**, p 283-286.
75. Čižman M., 2003. The use and resistance to antibiotics in the community. *International journal of antimicrobial agents*, **21**, p 297-307.
 76. Claeys W., Verraes C., Cardoen S., De Block J., Huyghebaert A., Raes K., Dewettinck K. and Herman L., 2014. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, **42**, p 188-201.
 77. Cocconcelli P. S., Cattivelli D. and Gazzola S., 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International journal of food microbiology*, **88**, p 315-323.
 78. Cohen J., Powderly W. and Opal S., 2003. *Infectious Diseases*, 2 vols.
 79. Cohen S. P., Hächler H. and Levy S., 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (mar) locus in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **175**, p 1484-1492.
 80. Control C. f. D. and Prevention, 2010. *Get smart: know when antibiotics work*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
 81. Couce A. and Blázquez J., 2009. Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS microbiology reviews*, **33**, p 531-538.
 82. Council N. R., 1999. *The use of drugs in food animals: benefits and risks*. National Academies Press.
 83. Courvalin P., 2005. Resistance to aminoglycosides in Gram-negative bacteria by 16s rRNA methylation. *Clinical Microbiology & Infection Supplement*, **11**, p 31-32.
 84. Courvalin P., 2008. Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine*, **264**, p 4-16.
 85. Cox L. A. and Ricci P. F., 2008. Causal regulations vs. political will: why human zoonotic infections increase despite precautionary bans on animal antibiotics. *Environment international*, **34**, p 459-475.
 86. Coyle M. B., 2005. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. American Society for Microbiology.
 87. D'costa V. M., McGrann K. M., Hughes D. W. and Wright G. D., 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science*, **311**, p 374-377.
 88. Danielsen M. and Wind A., 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International journal of food microbiology*, **82**, p 1-11.
 89. Davies J. and Davies D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**, p 417-433.
 90. Davis B. D., 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological reviews*, **51**, p 341.
 91. De Pascale G. and Wright G. D., 2010. Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. *Chembiochem*, **11**, p 1325-1334.
 92. Delahay R. M., Frankel G. and Knutton S., 2001. Intimate interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface. *Current opinion in infectious diseases*, **14**, p 559-565.
 93. Delavenne E., Mounier J., Asmani K., Jany J.-L., Barbier G. and Le Blay G., 2011. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International journal of food microbiology*, **151**, p 247-251.
 94. Delcour A. H., 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1794**, p 808-816.
 95. Dhama K., Karthik K., Tiwari R., Shabbir M. Z., Barbuddhe S., Malik S. V. S. and Singh R. K., 2015. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, **35**, p 211-235.

96. Di Giannatale E., Di Serafino G., Zilli K., Alessiani A., Sacchini L., Garofolo G., Aprea G. and Marotta F., 2014. Characterization of antimicrobial resistance patterns and detection of virulence genes in *Campylobacter* isolates in Italy. *Sensors*, **14**, p 3308-3322.
97. Diaz F., 2013. Antimicrobial use in animals: analysis of the OIE survey on monitoring of the quantities of antimicrobial agents used in animals. In: Proceeding of the OIE Global Conference on the Responsible and Prudent Use of Antimicrobial Agents for Animals held in March 2013.
98. Ding Z., Zhang H., Tang W., Tong C., Li R., Chen L., Pu L., Zhu Z. and Cui Y., 2012. Methylase genes-mediated erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in China. *Israel J Vet Med*, **67**, p 170-179.
99. Directorate V. D., 2007. Health Canada. Categorization of antimicrobial drugs based on importance in human medicine.
100. Domagk G., 1935. Ein beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **61**, p 250-253.
101. Dontorou C., Papadopoulou C., Filioussis G., Economou V., Apostolou I., Zakkas G., Salamoura A., Kansouzidou A. and Levidiotou S., 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from foods in Greece. *International journal of food microbiology*, **82**, p 273-279.
102. Douthwaite S., 1992. Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic acids research*, **20**, p 4717-4720.
103. Doyle M. P. and Buchanan R. L., 2012. Food microbiology: fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology Press.
104. ECDC E. and EMEA S., 2009. Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSA Journal*, **7**, p 1372.
105. Egger-Danner C., Cole J., Pryce J., Gengler N., Heringstad B., Bradley A. and Stock K., 2015. Invited review: overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits. *Animal*, **9**, p 191-207.
106. El-Masannat E. T. S., 1987. A study of ovine mastitis with special reference to mastitis caused by *pasteurellahaemolytica*, Royal Veterinary College (University of London).
107. Emaneini M., Bigverdi R., Kalantar D., Soroush S., Jabalameli F., Khoshgnab B. N., Asadollahi P. and Taherikalani M., 2013. Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. *Annals of burns and fire disasters*, **26**, p 76.
108. Endtz H. P., Ruijs G. J., van Klingeren B., Jansen W. H., van der Reyden T. and Mouton R. P., 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **27**, p 199-208.
109. Epe B. and Woolley P., 1984. The binding of 6-demethylchlortetracycline to 70S, 50S and 30S ribosomal particles: a quantitative study by fluorescence anisotropy. *The Embo journal*, **3**, p 121.
110. Erskine R., Bartlett P., VanLente J. and Phipps C., 2002. Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of dairy science*, **85**, p 2571-2575.
111. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing., 2013. The Breakpoint tables for interpretations of MICs and zone diameters. Version 3.0, valid from 2013-01-01, EUCAST.
112. European Food Safety Authority (EFSA)., 2015a. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and

- occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*, **13** (1): 4006.
113. European Food Safety Authority (EFSA)., 2015b. Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*, **13** (1): 3940.
 114. Etebu E., 2013. Potential panacea to the complexities of Polymerase Chain Reaction (PCR). *Advances in Life Science and Technology*, **13**, p 53-59.
 115. Fàbrega A., Sánchez-Céspedes J., Soto S. and Vila J., 2008. Quinolone resistance in the food chain. *International journal of antimicrobial agents*, **31**, p 307-315.
 116. Falagas M. E., Rafailidis P. I. and Matthaïou D. K., 2010. Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*, **13**, p 132-138.
 117. Fao, 1961. Code of Principles Concerning Milk and Milk Products and Associated Standards. FAO.
 118. FDA/CFSAN –BAM., 2002. Chapter 4 - Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria.
 119. FDA/CFSAN-BAM., 2003. Chapter 5 – Salmonella.
 120. Finley R. L., Collignon P., Larsson D. J., McEwen S. A., Li X.-Z., Gaze W. H., Reid-Smith R., Timinouni M., Graham D. W. and Topp E., 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*, **57**, p 704-710.
 121. Fleming A., 1980. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. influenzae. *Reviews of infectious diseases*, **2**, p 129-139.
 122. Floyd J. T., Kumar S., Mukherjee M. M., He G. and Varela M. F., 2013. A review of the molecular mechanisms of drug efflux in pathogenic bacteria: A structure-function perspective. *Recent Research Developments in Membrane Biology*, **3**, p 15-66.
 123. Fomina, I. P., Kuznetsova, S. M., Vasil'ev, V. K., & Bodunkova, L. E. (1971). Penicillinase resistant semisynthetic penicillins--antibacterial action and circulatory characteristics of patients' blood. *Antibiotiki*, **16**(2), 153-158.
 124. Foster T. J., 2017. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects. *FEMS microbiology reviews*, **41**, p 430-449.
 125. Fotou K., Tzora A., Voidarou C., Alexopoulos A., Plessas S., Avgeris I. and Demertzis P., 2011. Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe*, **17**(6), p 315-319.
 126. Franz C. M., Holzapfel W. H. and Stiles M. E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International journal of food microbiology*, **47**, p 1-24.
 127. Friedrich A., Rau J., Horlacher S. and Spohr M., 2011. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in milk from dairy farms in Northern Wurttemberg. *Tierärztliche Umschau*, **66**, p 195-+.
 128. Frost K. J., 2007. An overview of antibiotic therapy. *Nursing Standard*, **22**, p 51-58.
 129. Fthenakis G., 1994. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of Southern Greece. *Small Ruminant Research*, **13**, p 293-300.
 130. Fthenakis G.C., 1995. California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis of dairy ewes. *Small Ruminant Research*, **16**(3), p 271-276.
 131. Fthenakis G. and Jones J., 1990. The effect of experimentally induced subclinical mastitis on milk yield of ewes and on the growth of lambs. *British Veterinary Journal*, **146**, p 43-49.

132. Fuda C., Fisher J. and Mobashery S., 2005. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and molecular life sciences*, **62**, p 2617.
133. Fuller A., Mellows G., Woolford M., Banks G., Barrow K. and Chain E., 1971. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature*, **234**, p 416-417.
134. Gündoğan N., Citak S. and Turan E., 2006. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. *Food Control*, **17**, p 389-392.
135. Galdiero S., Falanga A., Cantisani M., Tarallo R., Elena Della Pepa M., D'Oriano V. and Galdiero M., 2012. Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. *Current Protein and Peptide Science*, **13**, p 843-854.
136. Garneau-Tsodikova S. and Labby K. J., 2016. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *MedChemComm*, **7**, p 11-27.
- Gerosa S. and Skoet J., 2012. Milk availability: trends in production and demand and medium-term outlook. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, p 1-38.
137. Gillespie I., Adak G., O'brien S. and Bolton F., 2003. Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992–2000. *Epidemiology & Infection*, **130**, p 461-468.
138. Gindonis V., Taponen S., Myllyniemi A.-L., Pyörälä S., Nykäsenoja S., Salmenlinna S., Lindholm L. and Rantala M., 2013. Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. *Acta veterinaria scandinavica*, **55**, p 61.
139. Giraffa G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of food microbiology*, **88**, p 215-222.
140. Griffin P. M. and Tauxe R. V., 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic reviews*, **13**, p 60-98.
141. Gundogan N. and Avci E., 2014. Occurrence and antibiotic resistance of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in raw milk and dairy products in Turkey. *International journal of dairy technology*, **67**, p 562-569.
142. Haenlein G., 2001. Past, Present, and Future Perspectives of Small Ruminant Dairy Research1. *Journal of dairy science*, **84**, p 2097-2115.
143. Hao H., Cheng G., Iqbal Z., Ai X., Hussain H. I., Huang L., Dai M., Wang Y., Liu Z. and Yuan Z., 2014. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in microbiology*, **5**.
144. Haran K., Godden S., Boxrud D., Jawahir S., Bender J. and Sreevatsan S., 2012. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, p 688-695.
145. Harvey J. and Gilmour A., 2001. Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and nondairy foods by pulsed-field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and cadmium and antibiotic resistance determination. *Applied and environmental microbiology*, **67**, p 840-847.
146. Haug A., Høstmark A. T. and Harstad O. M., 2007. Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids in health and disease*, **6**, p 25.
147. Hayes J. R., English L. L., Carter P. J., Proescholdt T., Lee K. Y., Wagner D. D. and White D. G., 2003. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Applied and environmental microbiology*, **69**, p 7153-7160.

148. Health Protection Agency., 2004. National Standard Method – F15, Enumeration of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species.
149. Health Protection Agency., 2004. National Standard Method-F12, Enumeration of *Staphylococcus aureus*.
150. Healy V. L., Lessard I. A., Roper D. I., Knox J. R. and Walsh C. T., 2000. Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the d-Ala–d-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chemistry & biology*, **7**, p R109-R119.
151. Hernández-Allés S., Albertí S., Álvarez D., Doménech-Sánchez A., Martínez-Martínez L., Gil J., Tomás J. M. and Benedí V. J., 1999. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, **145**, p 673-679.
152. Hershberger E., Oprea S. F., Donabedian S. M., Perri M., Bozigar P., Bartlett P. and Zervos M. J., 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **55**, p 127-130.
153. Heuer O. E., Kruse H., Grave K., Collignon P., Karunasagar I. and Angulo F. J., 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, **49**, p 1248-1253.
154. Heuvelink A., Van Den Biggelaar F., De Boer E., Herbes R., Melchers W., Huis J. and Monnens L., 1998. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, p 878-882.
155. Hiramatsu K., Katayama Y., Matsuo M., Sasaki T., Morimoto Y., Sekiguchi A. and Baba T., 2014. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **20**, p 593-601.
156. Hong W., Zeng J. and Xie J., 2014. Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **4**, p 258-265.
157. Hordijk J., Mevius D. J., Kant A., Bos M. E., Graveland H., Bosman A. B., Hartskeerl C. M., Heederik D. J. and Wagenaar J. A., 2013. Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**, p 2468-2476.
158. Hosseini S. S., Niakan M., Saderi H., Motallebi M., Taherikalani M., Asadollahi K. and Emaneini M., 2016. Frequency of genes encoding erythromycin ribosomal methylases among *Staphylococcus aureus* clinical isolates with different D-phenotypes in Tehran, Iran. *Iranian journal of microbiology*, **8**, p 161.
159. Howden B. P., Johnson P. D., Ward P. B., Stinear T. P. and Davies J. K., 2006. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **50**, p 3039-3047.
160. Hudopisk N., Korva M., Janet E., Simetinger M., Grgič-Vitek M., Gubenšek J., Natek V., Kraigher A., Strle F. and Avšič-Županc T., 2013. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. *Emerging infectious diseases*, **19**, p 806.
161. Inglis G., McAllister T., Busz H., Yanke L., Morck D., Olson M. and Read R., 2005. Effects of subtherapeutic administration of antimicrobial agents to beef cattle on the prevalence of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis*. *Applied and environmental microbiology*, **71**, p 3872-3881.
162. Ingraham N. R. and Beerman H., 1950. The present status of penicillin in the treatment of syphilis in pregnancy and infantile congenital syphilis. *The American Journal of the Medical Sciences*, **219**, p 433-442.
163. ISO 6579 (2002) Horizontal method for the detection of *Salmonella*.
164. ISO 7937 (1997) Horizontal method for identification of *Clostridium perfringens*

165. Jacobs M. R., Bajaksouzian S., Appelbaum P. C. and Bolmström A., 1992. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of pneumococci. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, **15**, p 473-478.
166. Jacoby G. and Bush K., 2005. β -Lactam resistance in the 21st century. In, *Frontiers in Antimicrobial Resistance*. American Society of Microbiology, pp. 53-65.
167. Jacoby G. A., 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, **41**, p S120-S126.
168. Jacoby G. A. and Munoz-Price L. S., 2005. The new β -lactamases. *New England Journal of Medicine*, **352**, p 380-391.
169. Jacoby G. A. and Sutton L., 1985. beta-Lactamases and beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **28**, p 703-705.
170. Jamali H., Radmehr B. and Thong K. L., 2013. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control*, **34**, p 121-125.
171. Jensen B. B., 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J. Anim. Feed Sci*, **7**, p 45-64.
172. Jensen S. O. and Lyon B. R., 2009. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future microbiology*, **4**, p 565-582.
173. Jeśman C., Młudzik A. and Cybulska M., 2011. History of antibiotics and sulphonamides discoveries. *Polski merkurjusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, **30**, p 320-322.
174. Jetacar M., 1999. The use of antibiotics in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans. *Joint Expert Advisory Committee on Antibiotic Resistance (Jetacar), A Division of the CDHAC and CDAFF, Canberra*.
175. Jevons M.P., (1961). Celbenin[®]-resistant staphylococci. *British medical journal*, **1**, p (5219), 124.
176. Johnston L. M. and Jaykus L.-A., 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Applied and environmental microbiology*, **70**, p 3133-3137.
177. Jones F. and Ricke S., 2003. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poultry Science*, **82**, p 613-617.
178. Josephine H. R., Kumar I. and Pratt R., 2004. The perfect penicillin? Inhibition of a bacterial DD-peptidase by peptidoglycan-mimetic β -lactams. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, p 8122-8123.
179. Jukes T. H. and Williams W. L., 1953. Nutritional effects of antibiotics. *Pharmacological reviews*, **5**, p 381-420.
180. Kadlec K., von Czapiewski E., Kaspar H., Wallmann J., Michael G. B., Steinacker U. and Schwarz S., 2011. Molecular basis of sulfonamide and trimethoprim resistance in fish-pathogenic *Aeromonas* isolates. *Applied and environmental microbiology*, **77**, p 7147-7150.
181. Kahlmeter G., Brown D. F., Goldstein F. W., MacGowan A. P., Mouton J. W., Österlund A., Rodloff A., Steinbakk M., Urbaskova P. and Vatopoulos A., 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**, p 145-148.
182. Kahne D., Leimkuhler C., Lu W. and Walsh C., 2005. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical reviews*, **105**, p 425-448.
183. Kalmus P., Aasmäe B., Kärssin A., Orro T. and Kask K., 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta veterinaria scandinavica*, **53**, p 4.
184. Katayama Y., Ito T. and Hiramatsu K., 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **44**, p 1549-1555.

185. Katz L. and Ashley G. W., 2005. Translation and protein synthesis: macrolides. *Chemical reviews*, **105**, p 499-528.
186. Kaufman G., 2011. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Nursing Standard*, **25**, p 49-55.
187. Kearney J., 2010. Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **365**, p 2793-2807.
188. Kennedy A. D., Otto M., Braughton K. R., Whitney A. R., Chen L., Mathema B., Mediavilla J. R., Byrne K. A., Parkins L. D. and Tenover F. C., 2008. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, p 1327-1332.
189. Khan A. A., Ponce E., Nawaz M., Cheng C.-M., Khan J. A. and West C. S., 2009. Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from imported seafood. *Applied and environmental microbiology*, **75**, p 1192-1196.
190. Kim J.-Y., Kim S.-H., Kwon N.-H., Bae W.-K., Lim J.-Y., Koo H.-C., Kim J.-M., Noh K.-M., Jung W.-K. and Park K.-T., 2005. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157: H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. *J Vet Sci*, **6**, p 7-19.
191. Klei L., Yun J., Sapru A., Lynch J., Barbano D., Sears P. and Galton D., 1998. Effects of Milk Somatic Cell Count on Cottage Cheese Yield and Quality1. *Journal of dairy science*, **81**, p 1205-1213.
192. Klimešová M., Manga I., Nejeschlebová L., Horáček J., Ponížil A. and Vondrušková E., 2017. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cattle, sheep, goat, and pig rearing in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, **86**, p 3-10.
193. Kreausukon K., Fetsch A., Kraushaar B., Alt K., Müller K., Krömker V., Zessin K.-H., Käsbohrer A. and Tenhagen B.-A., 2012. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *Journal of dairy science*, **95**, p 4382-4388.
194. Ksouri S., Djebir S., Hadeif Y. and Benakhla A., 2015. Survey of bovine mycotic mastitis in different mammary gland statuses in two north-eastern regions of Algeria. *Mycopathologia*, **179**, p 327-331.
195. Kuang Y., Tani K., Synnott A. J., Ohshima K., Higuchi H., Nagahata H. and Tanji Y., 2009. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR–DGGE method. *Biochemical engineering journal*, **45**, p 76-81.
196. Kumar S. and Varela M. F., 2012. Biochemistry of bacterial multidrug efflux pumps. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, p 4484-4495.
197. Kumar S. and Varela M. F., 2013. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *chemotherapy*, **14**, p 18.
198. Kyriakis S., Tsinas A., Lekkas S., Sarris K. and Bourtzi-Hatzopoulou E., 1996. Clinical evaluation of in-feed zinc bacitracin for the control of porcine intestinal adenomatosis in growing/fattening pigs. *The Veterinary Record*, **138**, p 489-492.
199. Lagneau P., Lebtahi K. and Swinne D., 1996. Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia*, **135**, p 99-102.
200. Lahuerta A., Westrell T., Takkinen J., Boelaert F., Rizzi V., Helwigh B., Borck Høg B., Korsgaard H., Ammon A. and Mäkelä P., 2011. Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics: the EFSA-ECDC summary report 2009. *Eurosurveillance (Online Edition)*, **16**, p 5-8.

201. Lai C. and Weisblum B., 1971. Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **68**, p 856-860.
202. Lambert P. A., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced drug delivery reviews*, **57**, p 1471-1485.
203. Lambert T., 2012. Antibiotics that affect the ribosome. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **31**, p 57-64.
204. Lampert L. M., 1970. Modern dairy products. *Modern dairy products*.
205. Landers T. F., Cohen B., Wittum T. E. and Larson E. L., 2012. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports*, **127**, p 4-22.
206. Lavoie K., Touchette M., St-Gelais D. and Labrie S., 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy science & technology*, **92**, p 455-468.
207. Leclercq R., 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*, **34**, p 482-492.
208. Lekshmi M., Ammini P., Kumar S. and Varela M. F., 2017. The Food Production Environment and the Development of Antimicrobial Resistance in Human Pathogens of Animal Origin. *Microorganisms*, **5**, p 11.
209. Lennette E. H., and Balows A., 1985. Manual of clinical microbiology 4 Ed. Levesque S., Frost E. and Michaud S., 2007. Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec. *Journal of food protection*, **70**, p 729-735.
210. Levy S. B., 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American*, **278**, p 32-39.
211. Levy S. B., 2002. The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative power. Da Capo Press.
212. Levy S. B., Fitzgerald G. B. and Macone A. B., 1976. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature*, **260**, p 40-42.
213. Levy S. B. and Marshall B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, **10**, p S122-S129.
214. Li X.-Z., Plésiat P. and Nikaido H., 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*, **28**, p 337-418.
215. Li Y.-x., Zhang X.-l., Li W., Lu X.-f., Liu B. and Wang J., 2013. The residues and environmental risks of multiple veterinary antibiotics in animal faeces. *Environmental monitoring and assessment*, **185**, p 2211-2220.
216. Liebana E., Batchelor M., Hopkins K., Clifton-Hadley F., Teale C., Foster A., Barker L., Threlfall E. and Davies R., 2006. Longitudinal farm study of extended-spectrum β -lactamase-mediated resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**, p 1630-1634.
217. Lindgren P. K., Karlsson Å. and Hughes D., 2003. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **47**, p 3222-3232.
218. Little C. and De Louvois J., 1999. Health risks associated with unpasteurized goats' and ewes' milk on retail sale in England and Wales. A PHLS Dairy Products Working Group Study. *Epidemiology & Infection*, **122**, p 403-408.
219. Liu B. and Pop M., 2008. ARDB—antibiotic resistance genes database. *Nucleic acids research*, **37**, p D443-D447.
220. Lyras D., Adams V., Lucet I. and Rood J. I., 2004. The large resolvase TnpX is the only transposon encoded protein required for transposition of the Tn4451/3 family of integrative mobilizable elements. *Molecular microbiology*, **51**, p 1787-1800.

221. Ma D., Cook D. N., Hearst J. E. and Nikaido H., 1994. Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends in microbiology*, **2**, p 489-493.
222. Madigan M., Martiko J. and Parker J., 2000. JS Kaminjolo, 1997. Prevalence and characteristics Antibiotic sensitivity. *J. Biology of Microorganisms, of strains of Escherichia coli isolated from milk and*, **44**, p 3249-3256.
223. Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V. and Clark D. P., 2008. Brock biology of microorganisms 12th edn. *Int. Microbiol*, **11**, p 65-73.
224. Magnus C., Ingledew W. and McCurdy A., 1986. Thermal resistance of streptococci isolated from pasteurized ham. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, **19**, p 62-67.
225. Malinowski E., Lassa H., Klossowska A. and Kuzma K., 2001. Enzymatic activity of yeast species isolated from bovine mastitis. *Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy*, **45**, p 289-295.
226. Manning J., Hargis B., Hinton Jr A., Corrier D., DeLoach J. and Creger C., 1994. Effect of selected antibiotics and anticoccidials on Salmonella enteritidis cecal colonization and organ invasion in Leghorn chicks. *Avian diseases*, p 256-261.
227. Maran N., 2012. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands.
228. Mare I., 1968. Incidence of R factors among Gram negative bacteria in drug-free human and animal communities. *Nature*, **220**, p 1046-1047.
229. Marshall B. M. and Levy S. B., 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, **24**, p 718-733.
230. Martin B., Garriga M., Hugas M. and Aymerich T., 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, **98**, p 1177-1190.
231. Martínez-Martínez L., Pascual A. and Jacoby G. A., 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*, **351**, p 797-799.
232. Marzocca M., Marucci P., Sica M. and Alvarez E., 2006. Escherichia coli O157: H7 detection in fresh ground beef and hamburgers. *Revista Argentina de microbiologia*, **38**, p 38-40.
233. Mathur S. and Singh R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of food microbiology*, **105**, p 281-295.
234. McDonald S., 1966. Transduction of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *The Lancet*, **288**, p 1107-1110.
235. McDonnell G. and Russell A. D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*, **12**, p 147-179.
236. McGowan J. E., 2006. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *The American journal of medicine*, **119**, p S29-S36.
237. Menninger J. R. and Otto D., 1982. Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **21**, p 811-818.
238. Mersha G., Asrat D., Zewde B. and Kyule M., 2010. Occurrence of Escherichia coli O157: H7 in faeces, skin and carcasses from sheep and goats in Ethiopia. *Letters in applied microbiology*, **50**, p 71-76.
239. Meurant G., 1995. Handbook of milk composition. Academic press.
240. Michael G. B., Freitag C., Wendlandt S., Eidam C., Feßler A. T., Lopes G. V., Kadlec K. and Schwarz S., 2015. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future microbiology*, **10**, p 427-443.
241. Miyakis S., Pefanis A. and Tsakris A., 2011. The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece. *Clinical Infectious Diseases*, **53**, p 177-184.

242. Mohammadi P., Abiri R., Rezaei M. and Salmanzadeh-Ahrabi S., 2013. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk in Kermanshah, Iran. *Iranian journal of microbiology*, **5**, p 233.
243. Morens D. M., Folkers G. K. and Fauci A. S., 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, **430**, p 242-249.
244. Mørk T., Waage S., Tollersrud T., Kvitle B. and Sviland S., 2007. Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta veterinaria scandinavica*, **49**, p 23-23.
245. Murphy D., Ricci A., Auce Z., Beechinor J. G., Bergendahl H., Breathnach R., Bureš J., Da Silva D., Pedro J. and Hederová J., 2017. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). *EFSA Journal*, **15**.
246. Murphy S. and Boor K., 2000. Sources and causes of high bacteria counts in raw milk: An abbreviated review. *Dairy food environ. sanit*, **20**, p 1-4.
247. National Committee for Clinical Laboratory Standards., 1982. Tentative reference dilution procedure for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. M11-T., Villanova, Pa, NCCLS.
248. National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. M2-A6., Villanova, Pa, NCCLS.
249. Nemeth J., Oesch G. and Kuster S. P., 2015. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**, p 382-395.
250. Nikaido H., 1988. Bacterial resistance to antibiotics as a function of outer membrane permeability. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **22**, p 17-22.
251. Nikaido H., 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, **178**, p 5853.
252. Nikaido H., 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. In: *Seminars in cell & developmental biology*, pp. 215-223.
253. Regulation (EC)2004. No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union L*, **139**.
254. Oakberg E. F. and Luria S., 1947. Mutations to sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Genetics*, **32**, p 249.
255. Ogier J.-C. and Serror P., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International journal of food microbiology*, **126**, p 291-301.
256. Oh E.-G., Son K.-T., Yu H., Lee T.-S., Lee H.-J., Shin S., Kwon J.-Y., Park K. and Kim J., 2011. Antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* strains isolated from farmed fish in Korea from 2005 through 2007. *Journal of food protection*, **74**, p 380-386.
257. Oliver S. P., Boor K. J., Murphy S. C. and Murinda S. E., 2009. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne pathogens and disease*, **6**, p 793-806.
258. Oliver S. P., Jayarao B. M. and Almeida R. A., 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens & Disease*, **2**, p 115-129.
259. Olson P. D., Kuechenmeister L. J., Anderson K. L., Daily S., Beenken K. E., Roux C. M., Reniere M. L., Lewis T. L., Weiss W. J. and Pulse M., 2011. Small molecule inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA alter cellular mRNA turnover, exhibit antimicrobial activity, and attenuate pathogenesis. *PLoS pathogens*, **7**, p e1001287.

260. Ordinance M., 1953. Code: 1953 Recommendations of the Public Health Service. *PHS Pub*, **229**.
261. Ostroff S. M., Kobayashi J.M. and Lewis J.H., 1989. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State: The First Year of Statewide Disease Surveillance. *Journal of American Medical Association*, **262** (3), p 355-359.
262. Paiba G., Gibbens J., Pascoe S., Wilesmith J., Kidd S., Byrne C., Ryan J., Smith R., McLaren M. and Futter R., 2002. Faecal carriage of verocytotoxin-producing. *The Veterinary Record*, **150**, p 593-598.
263. Pantosti A., Sanchini A. and Monaco M., 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future microbiology*, **2**, p 323-334.
264. Park J. T. and Uehara T., 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **72**, p 211-227.
265. Pasteur L. and Joubert J. F., 1877. Charbon et septicémie. Gauthier-Villars.
266. Paterson D. L., 2006. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American journal of medicine*, **119**, p S20-S28.
267. Paterson G., Morgan F., Harrison E., Peacock S., Parkhill J., Zadoks R. and Holmes M., 2013. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**, p 598-602.
268. Paton J. C. and Paton A. W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology reviews*, **11**, p 450-479.
269. Peacock S. J. and Paterson G. K., 2015. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual review of biochemistry*, **84**, p 577-601.
270. Perreten V. and Boerlin P., 2003. A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **47**, p 1169-1172.
271. Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R. and Waddell J., 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **53**, p 28-52.
272. Picozzi C., Foschino R., Heuvelink A. and Beumer R., 2005. Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol- negative or slow- fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. *Letters in applied microbiology*, **40**, p 491-496.
273. Poirel L., Bonnin R. A. and Nordmann P., 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**, p 883-893.
274. Politis I. and Ng-Kwai-Hang K., 1988. Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. *Journal of dairy science*, **71**, p 1720-1727.
275. Poppe C., Martin L., Gyles C., Reid-Smith R., Boerlin P., McEwen S., Prescott J. and Forward K., 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, **71**, p 1184-1192.
276. Powers J., 2004. Antimicrobial drug development—the past, the present, and the future. *Clinical Microbiology and Infection*, **10**, p 23-31.
277. Prescott J. F. and Dowling P. M., 2013. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. John Wiley & Sons.
278. Price L. B., Graham J. P., Lackey L. G., Roess A., Vailes R. and Silbergeld E., 2007. Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among US poultry workers. *Environmental Health Perspectives*, **115**, p 1738.

279. Public Health Agency of Canada., 2006. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Annual Report.
280. Public Health Agency of Canada., 2012. Categorization of antimicrobial drugs based on importance in human medicine.
281. Pyörälä S., Baptiste K. E., Catry B., Van Duijkeren E., Greko C., Moreno M. A., Pomba M. C. M. F., Rantala M., Ružauskas M. and Sanders P., 2014. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. *The Veterinary Journal*, **200**, p 230-239.
282. Quigley L., O'sullivan O., Stanton C., Beresford T. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F. and Cotter P. D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, **37**, p 664-698.
283. Rabsch W., Tschäpe H. and Bäuml A. J., 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and infection*, **3**, p 237-247.
284. Rahimi E., Chaleshtori S. S. and Parsaei P., 2011. Prevalence and antimicrobial resistance of Escherichia coli O157 isolated from traditional cheese, ice cream and yoghurt in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, **5**, p 3706-3710.
285. Rahimi E., and Nayebpour F., 2012. Antimicrobial resistance of Escherichia coli O 157: H7/NM isolated from faeces of ruminant animals in Iran. *Journal of Cell and Animal Biology*, **6(6)**, p 104-108.
286. Rajić A., McFall M. E., Deckert A. E., Reid-Smith R., Manninen K., Poppe C., Dewey C. E. and McEwen S. A., 2004. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from finishing swine and the environment of 60 Alberta swine farms. *Veterinary microbiology*, **104**, p 189-196.
287. Ramirez M. S. and Tolmasky M. E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, **13**, p 151-171.
288. Rangel J.M., Sparling P.H., Crowe C., Griffin P.M. and Swerdlow D.L., 2005. Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*, **11** (4), p 603.
289. Redgrave L. S., Sutton S. B., Webber M. A. and Piddock L. J., 2014. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in microbiology*, **22**, p 438-445.
290. Regulation O., 2003. No 1831/2003 of the European Parliament and Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official J. Eur. Commun*, **268**, p 29-43.
291. Reller L. B., Weinstein M., Jorgensen J. H. and Ferraro M. J., 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, **49**, p 1749-1755.
292. Rendón M. a. A., Saldaña Z., Erdem A. L., Monteiro-Neto V., Vázquez A., Kaper J. B., Puente J. L. and Girón J. A., 2007. Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, p 10637-10642.
293. Reneau J. and Packard V., 1991. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. *Dairy, food and environmental sanitation*.
294. Revilla C., Garcillán-Barcia M. P., Fernández-López R., Thomson N. R., Sanders M., Cheung M., Thomas C. M. and de la Cruz F., 2008. Different pathways to acquiring resistance genes illustrated by the recent evolution of IncW plasmids. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **52**, p 1472-1480.
295. Reygaert W., 2013. Antimicrobial resistance mechanisms of Staphylococcus aureus. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, p 297-305.
296. Richmond M. and Curtis N., 1974. The interplay of b-lactamases and intrinsic factors in the resistance of Gram-negative bacteria to penicillins and cephalosporins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **235**, p 553-568.

297. Riley L. W., Remis R. S., Helgerson S. D., McGee H. B., Wells J. G., Davis B. R., and Blake P. A. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, **308(12)**, p 681-685.
298. Roberts M., 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS microbiology reviews*, **19**, p 1-24.
299. Roberts T., Tompkin R. and Baird-Parker A., 1996. *Microorganisms in foods 5: Microbiological specifications of food pathogens*. Chapman & Hall.
300. Ruaro A., Andrighetto C., Torriani S. and Lombardi A., 2013. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food microbiology*, **34**, p 106-111.
301. Rubini S., Cardeti G., Amiti S., Manna G., Onorati R., Caprioli A. and Morabito S., 1999. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in sheep milk. *The Veterinary Record*, **144**, p 56.
302. Ruiz J., Pons M. J. and Gomes C., 2012. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *International journal of antimicrobial agents*, **40**, p 196-203.
303. Sabath L., 1982. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Annals of internal medicine*, **97**, p 339-344.
304. Saga T. and Yamaguchi K., 2009. History of antimicrobial agents and resistant bacteria.
305. Salyers A. A., Moon K. and Schlessinger D., 2007. The human intestinal tract—a hotbed of resistance gene transfer? Part II. *Clinical Microbiology Newsletter*, **29**, p 25-30.
306. Sánchez-Vargas F. M., Abu-El-Haija M. A. and Gómez-Duarte O. G., 2011. Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel medicine and infectious disease*, **9**, p 263-277.
307. Sarbu I., Matei C., Benea V. and Georgescu S., 2014. Brief history of syphilis. *Journal of medicine and life*, **7**, p 4.
308. Šarić L. Č., Šarić B. M., Mandić A. I., Torbica A. M., Tomić J. M., Cvetković D. D. and Okanović Đ. G., 2012. Antibacterial properties of domestic Balkan donkeys' milk. *International Dairy Journal*, **25**, p 142-146.
309. Schatz A., Bugle E. and Waksman S. A., 1944. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **55**, p 66-69.
310. Schnappinger D. and Hillen W., 1996. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of microbiology*, **165**, p 359-369.
311. Serraino A., Florio D., Giacometti F., Piva S., Mion D. and Zanoni R., 2013. Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of a water buffalo dairy farm in Italy. *Journal of dairy science*, **96**, p 2801-2807.
312. Shrestha U., Ranaweera I., Kumar S., Ranjana K. and Kakarla P., 2015. Ikhra, W.; He, G.; Andersen, J.; Varela, M. Multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica*. *Salmonella: Prevalence, Risk Factors and Treatment Options; Hackett, CB, Ed*, p 1-30.
313. Silbergeld E. K., Graham J. and Price L. B., 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health*, **29**, p 151-169.
314. Simonsen T., Aarbakke J. and Kay I., 2006. *Illustrated pharmacology for nurses*. CRC Press.
315. Skoufos I., Voidarou C., Bezirtzoglou E. and Tzora A., 2006. Effects of Machine-milking on the Bacterial Flora of Teat Duct and Mammary Gland of Ewes. *Zoonoses and Public Health*, **53(10)**, p 499-501.

316. Smet A., Martel A., Persoons D., Dewulf J., Heyndrickx M., Herman L., Haesebrouck F. and Butaye P., 2010. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS microbiology reviews*, **34**, p 295-316.
317. Smith D. H., 1967. R factor infection of Escherichia coli lyophilized in 1946. *Journal of bacteriology*, **94**, p 2071.
318. Smith H. W. and Crabb W., 1956. The sensitivity to chemotherapeutic agents of a further series of strains of Bacterium coli from cases of white scours: the relationship between sensitivity tests and response to treatment. *Vet Rec*, **68**, p 274-277.
319. Smith T. C. and Wardyn S. E., 2015. Human infections with Staphylococcus aureus CC398. *Current environmental health reports*, **2**, p 41-51.
320. Snow G., 1982. The molecular basis of antibiotic action.
321. Solomakos N., Govaris A., Angelidis A. S., Pournaras S., Burriel A. R., Kritas S. K. and Papageorgiou D. K., 2009. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of Escherichia coli O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food microbiology*, **26**, p 865-871.
322. Sommer M. O., Munck C., Toft-Kehler R. V. and Andersson D. I., 2017. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nature reviews microbiology*.
323. Spohr M., Rau J., Friedrich A., Klittich G., Fetsch A., Guerra B., Hammerl J. and Tenhagen B. A., 2011. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Three Dairy Herds in Southwest Germany. *Zoonoses and Public Health*, **58**, p 252-261.
324. Stapleton P. D. and Taylor P. W., 2002. Methicillin resistance in Staphylococcus aureus: mechanisms and modulation. *Science progress*, **85**, p 57-72.
325. Starr M. P. and Reynolds D. M., 1951. Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, **41**, p 1375-1380.
326. Starrels J. L., Barg F. K. and Metlay J. P., 2009. Patterns and determinants of inappropriate antibiotic use in injection drug users. *Journal of general internal medicine*, **24**, p 263-269.
327. Stokes H. T. and Hall R. M., 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene- integration functions: integrons. *Molecular microbiology*, **3**, p 1669-1683.
328. Stokstad E. and Jukes T. H., 1950. Further observations on the "animal protein factor". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **73**, p 523-528.
329. Stryjewski M. E. and Corey G. R., 2014. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an evolving pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, **58**, p S10-S19.
330. Stutz M. and Lawton G., 1984. Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal Clostridium perfringens, and ileal weight of broiler chicks. *Poultry Science*, **63**, p 2036-2042.
331. Surendraraj A., Thampuran N. and Joseph T. C., 2010. Molecular screening, isolation, and characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7 from retail shrimp. *Journal of food protection*, **73**, p 97-103.
332. Szmolka A. and Nagy B., 2013. Multidrug resistant commensal Escherichia coli in animals and its impact for public health. *Frontiers in microbiology*, **4**.
333. Tacket C. O., Dominguez L. B., Fisher H. J. and Cohen M. L., 1985. An outbreak of multiple-drug-resistant Salmonella enteritis from raw milk. *Jama*, **253**, p 2058-2060.
334. Talaro K. P., 2004. Foundations in Microbiology: Interactive Study Cd-rom. McGraw-Hill.

335. Talaro K. P. and Chess B., 2012. Foundations in microbiology.
336. Talaro K. P. and Chess B., 2018. Foundations in microbiology. McGraw-Hill.
337. Teale C., Barker L., Foster A., Liebana E., Batchelor M., Livermore D. and Threlfall E., 2005. Extended-spectrum beta-lactamase detected in *E. coli* recovered from calves in Wales. *The Veterinary Record*, **156**, p 186.
338. Team E. E., 2014. European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2012 published. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*, **19**, p 20748.
339. Tenover F. C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, **119**, p S3-S10.
340. Tenover F. C., Biddle J. W. and Lancaster M. V., 2001. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*, **7**, p 327.
341. Teshome B., Tefera G., Belete B., and Mekuria A., 2016. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* from raw camel and goat milk from somali region of Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, **10(28)**, p 1066-1071.
342. Testing E. C. o. A. S., 2013. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version.
343. Teuber M., Meile L. and Schwarz F., 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, p 115-137.
344. Thomas C. M. and Nielsen K. M., 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, **3**, p 711-721.
345. Thornsberry C., 2016. NCCLS standards for antimicrobial susceptibility tests. *Laboratory Medicine*, **14**, p 549-553.
346. Threlfall E. J., 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food and water borne infections. *FEMS microbiology reviews*, **26**, p 141-148.
347. Threlfall E. J., Ward L. R. and Rowe B., 1999. Resistance to ciprofloxacin in non-typhoidal salmonella from humans in England and Wales—the current situation. *Clinical Microbiology and Infection*, **5**, p 130-134.
348. Tikofsky L. L., Barlow J. W., Santisteban C. and Schukken Y. H., 2003. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microbial Drug Resistance*, **9**, p 39-45.
349. Timofte D., Maciucă I. E., Evans N. J., Williams H., Wattret A., Fick J. C. and Williams N. J., 2014. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **58**, p 789-794.
350. Todar K., 2011. Bacterial resistance to antibiotics (page 3). *Todar's online textbook of bacteriology*, p 4.
351. Toleman M. A., Bennett P. M. and Walsh T. R., 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**, p 296-316.
352. Tolle A., 1980. The microflora of the udder. *Bull Int Dairy Fed*, **120**, p 4.
353. Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. and Johnson T. R., 2004. Microbiology: an introduction, Vol. 9. Benjamin Cummings San Francisco, CA.
354. Turnidge J. and Paterson D. L., 2007. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clinical microbiology reviews*, **20**, p 391-408.

355. Tzora A. and Fthenakis G., 1998. Mastitis in dairy ewes associated with *Serratia marcescens*. *Small Ruminant Research*, **29**, p 125-126.
356. Tzora A., Voidarou C., Giannenas I., Tsinas A. and Skoufos I., 2016. Study on the Prevalence of Subclinical Mastitis and the related Bacterial Flora in the Raw Milk of Primiparous Indigenous Greek Goats. *J J Vet Science Research*, **1**(4): 022, p 1-7
357. Uchil R. R., Kohli G. S., KateKhaye V. M. and Swami O. C., 2014. Strategies to combat antimicrobial resistance. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, **8**, p ME01.
358. Unnecessary R., 2015. Antimicrobials in agriculture and the environment.
359. Uwanibe E. L., Olugbo A. O., Ugwumba N. S. C., Ifeanyi S. S., Adenike F. and Ignatius N. C., 2014. Detection of Plasmid in *Listeria monocytogenes* Isolated from Fresh Raw Milk in Nigeria. *Animal and Veterinary Sciences*, **2**, p 169-174.
360. Van Boeckel T. P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B. T., Levin S. A., Robinson T. P., Teillant A. and Laxminarayan R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, p 5649-5654.
361. van Cleef B. A., van Benthem B. H., Verkade E. J., van Rijen M. M., Kluytmans-van den Bergh M. F., Graveland H., Bosch T., Verstappen K. M., Wagenaar J. A. and Bos M. E., 2015. Livestock-associated MRSA in household members of pig farmers: transmission and dynamics of carriage, a prospective cohort study. *PLoS One*, **10**, p e0127190.
362. Van Eldere J., 2005. The significance of in vitro antibiotic resistance.
363. van Hoek A. H., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P. and Aarts H. J., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, **2**.
364. van Hooijdonk T. and Hettinga K., 2015. Dairy in a sustainable diet: a question of balance. *Nutrition reviews*, **73**, p 48-54.
365. Van Kessel J., Sonnier J., Zhao S. and Karns J., 2013. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from bulk tank milk and milk filters in the United States. *Journal of food protection*, **76**, p 18-25.
366. Vanderhaeghen W., Cerpentier T., Adriaensen C., Vicca J., Hermans K. and Butaye P., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Veterinary microbiology*, **144**, p 166-171.
367. Vannufiel P. and Cocito C., 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, **51**, p 2030.
368. Varga C., Rajić A., McFall M. E., Reid-Smith R. J., Deckert A. E., Checkley S. L. and McEwen S. A., 2009. Associations between reported on-farm antimicrobial use practices and observed antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* isolated from Alberta finishing swine farms. *Preventive veterinary medicine*, **88**, p 185-192.
369. Verraes C., Van Boxstael S., Van Meervenne E., Van Coillie E., Butaye P., Catry B., de Schaetzen M.-A., Van Huffel X., Imberechts H. and Dierick K., 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International journal of environmental research and public health*, **10**, p 2643-2669.
370. Viridis S., Scarano C., Cossu F., Spanu V., Spanu C. and De Santis E. P. L., 2010. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis. *Veterinary medicine international*, **2010**.
371. Viseur N., Lambert M., Delmee M., Van Broeck J. and Catry B., 2011. Nosocomial and non-nosocomial *Clostridium difficile* infections in hospitalised patients in Belgium-compulsory surveillance data from 2008 to 2010. *Eurosurveillance*, **16**, p 2000.

372. Voidarou C., Alexopoulos A., Plessas S. and Bezirtzoglou E., 2009. Antibiotic profile of common pathogens related to food safety and health. *Ege Academic Review*, **9** (3) p 961-967.
373. Voidarou C., Alexopoulos A., Plessas S., Stavropoulou E., Fotou K., Tzora A., Skoufos I. and Bezirtzoglou E., 2011. Hygienic quality and antibiotic resistance profile of sliced butchery. *Anaerobe*, **17**(6) p 344-50.
374. Wahlstrom R., Terrill S. and Johnson B. C., 1950. Effect of antibacterial agents on growth of baby pigs fed a “synthetic” diet. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **75**, p 710-711.
375. Walther C., Rossano A., Thomann A. and Perreten V., 2008. Antibiotic resistance in *Lactococcus* species from bovine milk: presence of a mutated multidrug transporter *mdt* (A) gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. *Veterinary microbiology*, **131**, p 348-357.
376. Wayne P., 2002. National committee for clinical laboratory standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing*, **12**.
377. Wayne P., 2007. Clinical and laboratory standards institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, **17**.
378. Wegener H. C., 2012. Antibiotic resistance—linking human and animal health. In: *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary*, p. 331.
379. Wegener H. C., 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current opinion in microbiology*, **6**, p 439-445.
380. Wegener H. C., Aarestrup F. M., Jensen L. B., Hammerum A. M. and Bager F., 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerging infectious diseases*, **5**, p 329.
381. Wikler M. A., 2006a. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *CLSI (NCCLS)*, **26**, p M7-A7.
382. Wikler M. A., 2006b. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard. Clinical and Laboratory Standards Institute.
383. Witte W., 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *International journal of antimicrobial agents*, **16**, p 19-24.
384. Wolfson J. S. and Hooper D. C., 1985. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **28**, p 581.
385. World Health Organization (WHO)., 2000. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food: report of a WHO consultation with the participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the Office International des Epizooties, Geneva, Switzerland 5-9 June 2000.
386. World Health Organization (WHO)., 2011. Critically important antimicrobials for human medicine.
387. World Health Organization (WHO)., 2012. WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR). *Critically important antimicrobials for human medicine*, **3**.
388. World Health Organization (WHO)., 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization.
389. World Health Organization (WHO)., 2017. Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. World Health Organization.
390. Wozniak R. A. and Waldor M. K., 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature reviews microbiology*, **8**, p 552-563.

391. Wright G. D., 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current opinion in microbiology*, **13**, p 589-594.
392. Wysok B., Wiszniewska-Łaszczych A., Uradziński J. and Sztejn J., 2011. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in raw milk in the selected areas of Poland. *Polish journal of veterinary sciences*, **14**, p 473-477.
393. Yoneda N., Fujimoto Y. and Uno M., 2004. Annual changes in drug sensitivity of gonococci derived from urethritis in men. *Jpn J Chemother*, **52**, p 31-34.
394. Zafalon L. F., and Santana R. C. M., 2016. Diagnosis of subclinical mastitis in Santa Inês and Morada Nova sheep in southeastern Brazil. *Tropical animal health and production*, **48(5)**, p967-972.
395. Zarubica T., Baker M. R., Wright H. T. and Rife J. P., 2011. The aminoglycoside resistance methyltransferases from the ArmA/Rmt family operate late in the 30S ribosomal biogenesis pathway. *Rna*, **17**, p 346-355.
396. Zastempowska E., Grajewski J. and Twarużek M., 2016. Food-borne pathogens and contaminants in raw milk—a review. *Annals of Animal Science*, **16**, p 623-639.
397. Zhang Q., Lin J. and Pereira S., 2003. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in animal reservoirs: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness. *AnimalHealthResearchReviews*, **4**, p 63-72.
398. Μάντης Α., 2005. Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. *Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη ΑΕ, Θεσσαλονίκη*.
399. <http://mic.eucast.org/Eucast2/>
400. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf