

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265325



4

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΟΗΘΗΣΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΟΗΘΗΣΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΟΗΘΗΣΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΟΗΘΗΣΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΟΗΘΗΣΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΟΗΘΗΣΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΟΗΘΗΣΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΒΟΗΘΗΣΙΑΣ





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΕΣΤΗΣ Κ. ΜΑΥΡΙΔΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

ΗΡΑΚΛΗΣ ΣΑΚΚΑΣ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»



Ημερομηνία αίτησης του κ. Σακκά Ηρακλή: 5-11-1999

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 399^α/29-2-2000

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Παπαδοπούλου Χρυσάνθη Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Λεβειδιώτου -Στεφάνου Σταματίνα Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αρβανιτίδου –Βαγιανά Μαλαματένια Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27-9-2002

«Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 619α/30-10-2007

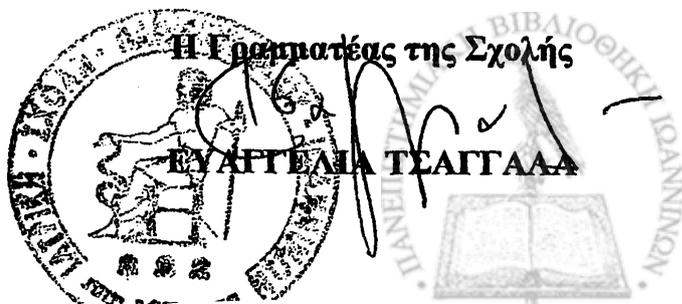
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαυρίδης Ανέστης	Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπουραντάς Κωνσταντίνος	Καθηγητής Παθολογίας –Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αρβανιτίδου –Βαγιανά Μαλαματένια	Καθηγήτρια Υγιεινής Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Γιαννίτση Σταυρούλα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ψυχιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεβειδιώτου –Στεφάνου Σταματίνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαδοπούλου Χρυσάνθη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-12-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας -Καρδιολογίας



Στην οικογένειά μου



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η φύση είναι γεμάτη μυστήρια μερικά από τα οποία τα έχουμε διερευνήσει, αλλά πολλά ακόμη παραμένουν ανεξερεύνητα. Ολοένα και περισσότερο αντιλαμβανόμαστε το ανεξάντλητο απόθεμα των συστατικών των φυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη φαρμακολογική έρευνα. Παρά την αξιοθαύμαστη πρόοδο της συνθετικής χημείας, όλες μαζί οι επιστημονικές προσπάθειες δεν έχουν καταφέρει να αναπαράγουν την πληθώρα των βιοενεργών μορίων που κρύβει η βιοποικιλότητα της γης. Μέχρι σήμερα μόνον 60 από τις 11.500 γνωστές διαφορετικές φυσικές ουσίες έχουν αναπαραχθεί συνθετικά. Με δεδομένη αυτή τη βιοποικιλία δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι όλοι οι ανθρώπινοι πολιτισμοί βασίστηκαν - και ακόμη βασίζονται - στη βιοποικιλότητα ως πηγή θεραπευτικών ουσιών. Ακόμη και σήμερα το 85% του πληθυσμού της γης βασίζεται άμεσα στη χρήση φαρμακευτικών φυτών για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων και προβλημάτων υγείας, ενώ πάνω από το 50% των φαρμάκων των αναπτυγμένων χωρών προέρχονται από τη φύση, κυρίως από φυτά και θαλάσσιους οργανισμούς. Οι ανακαλύψεις της παλιτοξίνης (palytoxin), της πακλιταξέλης (taxol), μοναδικών COX-2 αναστολέων, της αρτεμισίνης, των αντισπασμωδικών τερπενοειδών, της προστρατίνης (prostratin) και της β-μεθυλαμινο-L-αλανίνης (BMAA), αποτελούν τυπικά παραδείγματα πετυχημένης προσέγγισης της φύσης για την παραγωγή μοναδικών βιοδραστικών μορίων (Cox, 2007).

Τα φυσικά συστατικά παρέχουν απεριόριστες δυνατότητες για ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Με τις νέες αναδυόμενες νόσους και με την αυξανόμενη αντίσταση των μικροοργανισμών στα υπάρχοντα φάρμακα, υπάρχει πιεστική πλέον ανάγκη για ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων φαρμάκων με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες και με την καλύτερη δυνατή δράση κατά των ιών, των βακτηρίων, των μυκήτων, των πρωτοζώων και των ελμίνθων. Τα φυτά, εξαιτίας της μεγάλης βιολογικής και δομικής πολυμορφίας των συστατικών τους, αποτελούν μοναδική και ανανεώσιμη πηγή για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης διαφόρων αιθέριων ελαίων ορισμένων φυτών, έναντι παθογόνων στελεχών βακτηρίων και μυκήτων, τα οποία απομονώθηκαν από νοσοκομειακούς ασθενείς, από τρόφιμα και από νερά. Η διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ και χρηματοδοτήθηκε εξ ολοκλήρου από το Υπουργείο Παιδείας, προς το οποίο εκφράζονται θερμές ευχαριστίες.

Δέον να σημειωθεί ότι ολόκληρη η διατριβή πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Μικροβιολογίας Τροφίμων του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του



Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Χρυσάνθης Παπαδοπούλου, προς την οποία επιθυμώ να εκφράσω τις ολόθερμες ευχαριστίες μου, τόσο για την εξασφάλιση υποτροφιών από το ίδρυμα «Γ. Σταύρου» και από το πρόγραμμα ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ, όσο και για την ανάθεση της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης, όπως και για την πολύτιμη καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθειά της σε όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας διατριβής, τις σημαντικές υποδείξεις και οδηγίες της σε όλα τα πειράματα και την ουσιαστική συμβολή της στη διάρθρωση και συγγραφή της διατριβής αυτής.

Επίσης θέλω να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου προς την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου για το αμέριστο ενδιαφέρον που επέδειξε σε όλη τη διάρκεια ενασχόλησής μου στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και τη βοήθεια που μου προσέφερε στη συλλογή των κλινικών πολυανθεκτικών στελεχών που απομονώθηκαν και στη μελέτη της αντιβιοαντοχής τους, καθώς και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις της στη διάρκεια συγγραφής της παρούσας διατριβής.

Επίσης ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω προς την Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Υγιεινής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Μαλαματένια Αρβανιτίδου-Βαγιανά, για το ενδιαφέρον της, την υποστήριξή της και τις χρήσιμες συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας διατριβής.

Ακόμη θέλω να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στα μέλη της 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ανέστη Μαυρίδη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, για τις χρήσιμες συζητήσεις που είχαμε πάνω στο θέμα της παρούσας διατριβής, τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Άγγελο Ευαγγέλου, τον Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας κ. Κωνσταντίνο Μπουραντά και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ψυχιατρικής κ. Σταυρούλα Γιαννίτση για την ενθάρρυνση που μου παρείχαν και τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται προς το Εργαστήριο Ελέγχου Ρύπανσης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος, του Τομέα Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων, του Χημικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με υπεύθυνο καθηγητή τον κ. Αλμπάνη Τριαντάφυλλο και ιδιαίτερα προς τον Δρ. Βασίλη Σακκά, χημικό, επιστημονικό συνεργάτη του Εργαστηρίου για τη βοήθειά του στα χρωματογραφήματα των αιθέριων ελαίων.

Ακόμη θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο και στην Ιατρική Σχολή Ιωαννίνων για τη



βοήθεια και συμπαράστασή του στη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αυτής. Στον Επιμελητή του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου κ. Δημήτρη Παπαμιχαήλ, στις Αναπληρώτριες Διευθύντριες του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου κ. Ελένη Γκεσούλη και κ. Χριστιάνα Παππά, στον Επίκουρο Καθηγητή του Φυσικού Τμήματος της Σχολής Θετικών Επιστημών κ. Κωνσταντίνο Ιωαννίδη, στην ειδικευόμενη ιατρό κ. Παναγιώτα Σπυροπούλου και στην εκπαιδευτικό κ. Βασιλική Σακκά θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για τη βοήθειά τους στη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους μου, ήδη διδάκτορες κ. Αικατερίνη Ντόντορου, κ. Ιωάννα Αποστόλου, κ. Ευάγγελο Οικονόμου, κ. Αικατερίνη Σαλαμούρα, κ. Γεώργιο Ζάκα και τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Διονύση Μπασέα και κ. Παναγιώτα Γούσια για την αγαστή συνεργασία που είχαμε σε όλο το διάστημα εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Στην οικογένειά μου τέλος θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τη συμπαράσταση και υποστήριξη κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
A.1. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΟΓΕΣ	4
A.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	4
A.2. Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	6
A.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	7
A.3.1. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ	8
A.3.1.1. β-λακταμάσες	8
A.3.1.2. Ένζυμα τροποποιητικά των αμινογλυκοσιδών	8
A.3.2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΟΧΩΝ	9
A.3.2.1. Τροποποίηση των πενικιλλινোসυνδετικών πρωτεϊνών (PBP's)	9
A.3.2.2. Τροποποίηση προδρόμων στόχων επί του κυτταρικού τοιχώματος	9
A.3.2.3. Τροποποίηση των θέσεων σύνδεσης πάνω στα ριβοσωμάτια	10
A.3.2.4. Τροποποίηση της DNA-γυράσης και της IV-τοποϊσομεράσης	10
A.3.3. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΣΤΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΥ	10
A.3.3.1. Ελάττωση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης (τροποποίηση των πορινών)	10
A.3.3.2. Ενεργητική απέκκριση του αντιμικροβιακού φαρμάκου	11
A.3.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	11
A.3.4.1. Μηχανισμός αντοχής στην Αμφοτερικίνη-B	11
A.3.4.2. Μηχανισμοί αντοχής στις αζόλες	12
A.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	12
A.4.1. ΜΕΘΟΔΟΣ BAUER-KIRBY	12
A.4.2. E-TEST	13
A.4.3. ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	13
A.4.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ	13
A.4.4.1. Μακρομέθοδος (broth macrodilution method)	14
A.5. ΤΙ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΣΗΜΕΡΑ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	14
A.6. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ	23



A.6.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ	24
A.6.2. ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ	25
A.6.3. ΔΡΑΣΗ-ΧΡΗΣΕΙΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ	26
A.6.4. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	28
A.6.5. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ	31
A.6.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	35
A.6.7. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	37
A.6.8. ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ	40
A.6.9. ΑΝΤΙΠΑΡΑΣΙΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ	43
A.6.10. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ	45
A.6.11. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΘΥΜΑΡΙΟΥ	48
A.6.12. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ	49
A.6.13. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΤΕΪΟΔΕΝΔΡΟΥ	53
A.6.14. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΠΛΕ ΧΑΜΟΜΗΛΙΟΥ	56
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	59
B.1. ΣΚΟΠΟΣ	61
B.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
B.2.1. ΥΛΙΚΑ	63
B.2.1.1. Μικροβιακά στελέχη	63
B. 2.1.2. Αιθέρια έλαια	65
B.2.2. ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ	65
B.2.2.1. Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων	65
B.2.2.1.1. GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)	65
B.2.2.1.2. Χρωματογραφικές συνθήκες	66
B.2.2.2. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριων ελαίων	66
B.2.2.2.1. Μέθοδος	66
B.2.2.2.2. Θρεπτικά υποστρώματα	67
B.2.2.2.3. Παρασκευή διαλυμάτων διαδοχικών αραιώσεων του αιθέριου ελαίου	68
B.2.2.2.4. Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος	69
B.2.2.2.5. Επώαση και ανάγνωση	70
B.2.2.2.5.1. Βακτήρια	70



B.2.2.2.5.2. Μόκητες	71
B.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	72
B.3.1. ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ	72
B.3.1.1. Αιθέριο έλαιο ρίγανης	72
B.3.1.2. Αιθέριο έλαιο βασιλικού	72
B.3.1.3. Αιθέριο έλαιο τειόδενδρου	73
B.3.1.4. Αιθέριο έλαιο θυμαριού	74
B.3.1.5. Αιθέριο έλαιο χαμομηλιού	74
B.3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ, ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΘΑΝΑΤΩΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ MIC ΚΑΙ MBC ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ	75
B.3.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	75
B.3.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	82
B.3.2.3. <i>Enterobacter spp</i>	86
B.3.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89
B.3.2.5. <i>Salmonella enteritidis</i>	93
B.3.2.6. <i>Escherichia coli</i>	96
B.3.2.7. <i>Morganella morganii</i>	100
B.3.2.8. <i>Pantoea agglomerans</i>	102
B.3.2.9. <i>Yersinia enterocolitica</i>	104
B.3.2.10. <i>Staphylococcus spp</i>	106
B.3.2.11. <i>Enterococcus faecium</i>	115
B.3.2.12. <i>Listeria spp</i>	117
B.3.2.13. <i>Streptococcus spp</i>	121
B.3.2.14. Συγκενρωτικοί πίνακες	124
B.3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ MIC ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>Candida spp</i>	126
B.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
B.4.1 Πρότυπα στελέχη	132
B.4.2 Μικροοργανισμοί φυσιολογικής χλωρίδας	135



B.4.3 Στελέχη που ενοχοποιούνται για τροφιμογενή νοσήματα	135
B.4.4 Κλινικά παθογόνα στελέχη	136
B.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	141
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	145
SUMMARY	147
ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	149
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	172



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φαρμακοβιομηχανία σήμερα έχει να αντιμετωπίσει τεράστιες προκλήσεις όσον αφορά την αλματώδη αύξηση των ανθεκτικών μικροοργανισμών και κυρίως των πολυανθεκτικών βακτηρίων. Η εξάπλωση των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)], των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντεροκόκκων [*Enterococcus vancomycin-resistant* (VRE)], των εγγενώς ανθεκτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων όπως τα *Acinetobacter baumannii*, των ανθεκτικών *Clostridium difficile* και των εξαιρετικά ανθεκτικών *Mycobacterium tuberculosis* (XDR-TB) προκαλεί το ιδιαίτερο ενδιαφέρον της βιομηχανίας των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Πολύ λίγα αντιμικροβιακά φάρμακα εμφανίζονται τα τελευταία χρόνια, κυρίως επειδή η αγορά είναι σχετικά μικρή και εξειδικευμένη σε σύγκριση με την αγορά των φαρμάκων που αφορούν χρόνιες παθήσεις (π.χ. αντιυπερτασικά, αντιχολινεστερασικά, παυσίπονα, αντιφλεγμονώδη, αντικαταθλιπτικά κλπ). Όμως τα πρόσφατα περιστατικά σε Η.Π.Α και Ευρώπη, τα οποία οφείλονται σε XDR-TB και οι αναφορές σε παγκόσμια αύξηση των ασθενών με λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη, έχουν εστιάσει την προσοχή των ερευνητών και της φαρμακοβιομηχανίας στην ανάγκη ανακάλυψης και ανάπτυξης νέων αντιμικροβιακών παραγόντων ικανών να αντιμετωπίσουν τις λοιμώξεις αυτές.

Τα φυτά είναι πρακτικά μια ανεξάντλητη πηγή πιθανών νέων αντιμικροβιακών παραγόντων και ήδη ορισμένες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία δείχνουν προκαταρκτικά αξιοσημείωτες δράσεις. Ακόμη υπάρχει και μια οικολογική βάση όσον αφορά τις αντιμικροβιακές δράσεις των φυτικών ουσιών, η οποία βασίζεται στο γεγονός ότι τα φυτά παράγουν αντιμικροβιακά φυσικά προϊόντα ως μέρος της αυτοπροστασίας τους από παθογόνους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντός τους (Gibbons, 2007). Επίσης τα κλινικά στελέχη των ανθεκτικών βακτηρίων είναι απίθανο να έχουν έλθει σε επαφή με τα δομικά στοιχεία των φυτικών αντιμικροβιακών ουσιών, και αυτό σίγουρα αποτελεί ένα επιπλέον πλεονέκτημα της έρευνας για νέα αντιμικροβιακά φάρμακα από τα φυτά.



A.1. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΟΓΕΣ

Στη φαρμακογνωσία, τα φάρμακα που προέρχονται από τη φύση ονομάζονται απλά φάρμακα ή δρόγες και προέρχονται από το ορυκτό, το ζωικό και κυρίως από το φυτικό βασίλειο, δηλαδή μπορεί να είναι διάφορες ορυκτές ουσίες, ολόκληροι οργανισμοί ή τμήματα και εκκρίματα αυτών, φυτικά προϊόντα ή προϊόντα εκχύλισης φυτών (Βερυκοκίδου, 1997).

Οι δρόγες του φυτικού βασιλείου ονομάζονται ανάλογα με το τμήμα του φυτού από το οποίο προέρχονται και κατατάσσονται σε ανώτατες μονάδες που αποτελούν τα αθροίσματα και κατά σειρά σε κλάσεις, τάξεις, οικογένειες, γένη και είδη (Λουκής, 2000). Αποτελούν ουσιαστικά μείγματα διαφορετικών χημικών συστατικών που μπορούν να δράσουν ανεξάρτητα, αθροιστικά ή και σε συνέργεια (Gurib-Fakim, 2006).

Τα δραστικά συστατικά μιας δρόγης, στα οποία οφείλεται η δράση της και η χρήση της στη φαρμακευτική, μπορεί να είναι θεμελιώδη για τη ζωή του φυτού (π.χ πρωτεΐνες, λιπίδια, σάκχαρα), αλλά και προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού του φυτού (π.χ φαινόλες) (Βερυκοκίδου, 1997) και αποτελούν τις πρώτες ύλες στην ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών μορίων (Gurib-Fakim, 2006).

A.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Στη Βίβλο γίνεται περιγραφή περίπου 30 φαρμακευτικών φυτών (Cowan, 1999), ενώ στο βιβλίο «Περί ύλης της ιατρικής» (De materia medica) του Διοσκουρίδη, που γράφτηκε μεταξύ 60 και 79 μ.Χ (Arias και Laca, 2005) και αποτέλεσε βιβλίο αναφοράς για περισσότερα από 1000 χρόνια στην Ευρώπη, περιγράφονται περίπου 950 φάρμακα, από τα οποία τα 600 είναι φυτικά, ενώ τα υπόλοιπα είναι ζωικά ή ορυκτά (Παπαδόπουλος, 2001, Gurib-Fakim, 2006).

Η χρήση των φυσικών φαρμάκων από τους πρωτόγονους λαούς μέχρι σήμερα έχει λάβει ποικίλες μορφές. Έτσι οι δρόγες έχουν χρησιμοποιηθεί ως φάρμακα, αρτύματα, ευφραντικά, καλλυντικά, παραισθησιογόνα, θυμιάματα, καπνιστικά και μασητικά (Βερυκοκίδου, 1997), ενώ αποτέλεσαν τη βάση της Ινδικής, Ελληνικής και Κινέζικης παραδοσιακής Ιατρικής (Gurib-Fakim, 2006).

Η ανάγκη θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενειών από αρχαιοτάτους χρόνους, ώθησε τους παραδοσιακούς θεραπευτές κάθε εποχής στη χρήση διαφόρων φαρμακευτικών φυτών. Στην Αρχαία Ελλάδα τέτοιοι θεραπευτές είχαν εκτεταμένη δραστηριότητα, ενώ στην κατηγορία αυτών των ανθρώπων περιλαμβάνονταν και εκείνοι που σχετίζονταν με την προμήθεια των φαρμακευτικών μέσων (βότανα) και ονομάζονταν ριζοτόμοι και



φαρμακοπώλες (Παπαδόπουλος, 2001). Η ασχολία τους αφορούσε την εξόρυξη των ριζών, τη συλλογή των βοτάνων και την καλλιέργεια των φαρμακευτικών φυτών (Σκαλτσά, 2001). Μαρτυρίες γραμμένες με σφηνοειδή γραφή σε πήλινα αντικείμενα της Μεσοποταμίας του 2600 π.Χ. φέρουν ως χρησιμοποιούμενα θεραπευτικά συστατικά έλαια κέδρου, κυπαρισσιού, γλυκόριζας, μύρου και παπαρούνας (Gurib-Fakim, 2006).

Εκτός από τους Έλληνες, επίσης οι Κινέζοι, οι Ινδοί, οι Αιγύπτιοι, οι Ρωμαίοι και οι Άραβες, στηρίχθηκαν στη βοτανολογία η οποία αφομοιώθηκε και στις φιλοσοφικές αρχές, στις δοξασίες, στις λαϊκές παραδόσεις και στις πρακτικές του κάθε πολιτισμού. Έτσι η θεραπευτική, από εμπειρική και ενστικτώδη, εξελίχθηκε σε μαγική και θεοκρατική, με τη θρησκεία και τη θεραπευτική να είναι άρρηκτα συνδεδεμένες. Η θεοκρατική αντίληψη αποτέλεσε στοιχείο όλων των αρχαίων λαών και των Ελλήνων, ως την εμφάνιση της Ιπποκρατικής Σχολής, που στηρίχθηκε στην παρατήρηση και στο πείραμα. Στο έργο του Ιπποκράτη αριθμούνται 336 δρόγες, ενώ ο Γαληνός πρωτοχρησιμοποίησε σύνθετα φάρμακα, συνδυάζοντας πολλές δρόγες μαζί (Σκαλτσά, 2001).

Οι αυτοκρατορίες για αιώνες διαχειρίστηκαν την παραγωγή και το εμπόριο των πρώτων υλών (βότανα, ορυκτά κ.ά), ενώ στο Μεσαίωνα, με τις καλλιέργειες των φυτών στα μοναστήρια, άρχισε η εξάπλωση της γνώσης από γενιά σε γενιά δημιουργώντας τη βάση της λαϊκής ιατρικής. Κατά τη διάρκεια της Οθωμανικής Αυτοκρατορίας πολλά σημαντικά ελληνικά ορθόδοξα μοναστήρια δημιούργησαν οργανωμένα νοσοκομεία Βυζαντινής παράδοσης, με ανθρώπους που παρασκεύαζαν φάρμακα από συλλεγόμενα βότανα, ενώ σε μοναστηριακή γραφή κατά την Οθωμανική περίοδο στο νησί της Κύπρου (1571-1878), περιγράφονται 494 συνταγές με χρήση φαρμακευτικών φυτών (Lardos, 2006).

Στην Ελλάδα η μακροχρόνια σκλαβιά, η φτώχεια, οι πόλεμοι και οι επιδημίες, η έλλειψη οργανωμένης περίθαλψης, σε συνδυασμό με περιορισμένο αριθμό γιατρών και η μεγάλη διασπορά του πληθυσμού, δημιούργησαν ανάγκες που δεν μπορούσαν να καλυφθούν από την ιατρική, με αποτέλεσμα μεγάλο μέρος των αναγκών αυτών να καλύπτεται από τη λαϊκή ιατρική, ασκούμενη από τους κατά τόπους εμπειρικούς γιατρούς (κομπογιανίτες) (Ρηγάτος, 2001). Χαρακτηριστικό παράδειγμα για την περιοχή της Ηπείρου αποτελούν οι περίφημοι εμπειρικοί Βικογιατροί της περιοχής Ζαγορίου που άκμασαν από το 17^ο ως τα μέσα του 19^{ου} αιώνα, οι οποίοι χρησιμοποιούσαν βότανα από τη Χαράδρα του Βίκου στο Ζαγόρι για θεραπευτικούς σκοπούς, των οποίων οι ιδιότητες πολλές φορές μεγαλοποιούνταν και καλύπτονταν από ένα πέπλο μυστηριώδους θεραπευτικής δύναμης (Μάλαμας, 1982).



Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα και με την εξέλιξη της Ιατρικής Επιστήμης υπήρξε μία βαθμιαία απομάκρυνση από τα παραδοσιακά λαϊκά θεραπευτικά μέσα. Ωστόσο η χρήση τους ήταν πάντα επίκαιρη και αποτελούσε μορφή αντίδρασης στις νεοεισερχόμενες τάσεις της εποχής που πολλές φορές ήταν και επικίνδυνες. Με αφορμή τα «λουτρά υδραργύρου» στο Λονδίνο για τη θεραπεία της σύφιλης και τα χορηγούμενα παραισθησιογόνα στη φυματίωση, ο Oliver Wendell Holmes, Αμερικανός γιατρός και συγγραφέας της εποχής, έγραψε το 1861: «Αν όλο το χρησιμοποιούμενο θεραπευτικό υλικό της Ιατρικής έπεφτε στο βυθό της θάλασσας, αυτό θα ήταν το καλύτερο για την ανθρωπότητα και το χειρότερο για τα ψάρια» (Cowan, 1999).

Σήμερα τα φαρμακευτικά φυτά και τα εκχυλίσματά τους αποτελούν εκ νέου αντικείμενο μελέτης σε μία προσπάθεια συμπλήρωσης και σε μερικές περιπτώσεις αντικατάστασης, των ήδη ευρέως χρησιμοποιούμενων συνθετικών χημικών ουσιών στη σύγχρονη Φαρμακοβιομηχανία και Βιομηχανία Τροφίμων. Αν και από τα περίπου 250.000 φυτικά είδη του πλανήτη μας μόλις το 10% έχει ελεγχθεί φαρμακολογικά και το 15% ως προς τη χημική του σύσταση, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 80% περίπου του πληθυσμού της γης, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες, στηρίζεται στην παραδοσιακή θεραπευτική σε ό,τι αφορά την πρωτοβάθμια περίθαλψη, κάνοντας χρήση των φαρμακευτικών φυτών και των εκχυλισμάτων τους (Craig, 1999, Gurib-Fakim, 2006, Prabuseenivasan και συν., 2006).

A.2. Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η πρώτη ιστορικά αναφερόμενη εφαρμογή αντιμικροβιακής θεραπείας, αφορά στην κατά το 1619 επιτυχή θεραπεία από την ελονοσία της συζύγου του Ισπανού κυβερνήτη του Περού, με τη χρήση εκχυλίσματος φλοιού κιγχόνης (Παπαπαναγιώτου, 1988).

Η σύγχρονη όμως εποχή της αντιμικροβιακής θεραπείας αρχίζει το 1909 με τον Γερμανό Paul Ehrlich (1854-1915), ο οποίος άνοιξε νέους ορίζοντες στη θεραπευτική των λοιμωδών νοσημάτων με την ανακάλυψη και εφαρμογή της θεραπείας της σύφιλης, με μία αρσενικούχο ένωση, τη σαλβαρσάνη (Gensini και συν., 2007). Εξαιτίας αυτού του έργου του κατηγορήθηκε από την εκκλησία για παρέμβαση στη Θεία Δίκη κατά της αμαρτίας (Mims και συν., 2004). Ο ίδιος καθόρισε και τη βασική αρχή της «εκλεκτικής τοξικότητας», σύμφωνα με την οποία μία χημειοθεραπευτική ουσία πρέπει κατά τη συστηματική χορήγησή της να δρα επιβλαβώς μόνο έναντι του μικροοργανισμού και όχι έναντι του ατόμου που υποβάλλεται σε θεραπεία (Παπαπαναγιώτου, 1988).



Νέα περίοδος στην αντιμικροβιακή θεραπεία αρχίζει από το 1935 όταν για πρώτη φορά εισήχθησαν στη θεραπεία των στρεπτοκοκκικών κυρίως λοιμώξεων, οι σουλφοναμίδες, ενώ ο όρος αντιβίωση πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον Villemin το 1889 και σημαίνει την αναστολή της ανάπτυξης ή το θάνατο ορισμένων μικροβίων με τη δράση άλλων μικροβίων, αποτελεί δηλαδή το αντίθετο της συμβίωσης, ενώ ο όρος αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τον Waksman το 1942 (Παπαπαναγιώτου, 1988).

Τα αντιβιοτικά αποτελούν φυσικά παράγωγα μικροοργανισμών (μυκήτων, ακτινομυκήτων, βακτηρίων) και δρουν έναντι άλλων μικροοργανισμών. Σήμερα όμως ο όρος αντιβιοτικό έχει αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο αντιμικροβιακό φάρμακο, γιατί εκτός από τα φυσικά παράγωγα, περιλαμβάνει και τα ημισυνθετικά και τις συνθετικές ουσίες (Αντωνιάδης και συν., 2000).

Ο Pasteur το 1877 παρατήρησε καταστροφή του βακίλλου του άνθρακα σε καλλιέργειες που είχαν επιμολυνθεί από άλλα μικρόβια, ενώ οι Τσέχοι Honl και Bukovsky το 1889 χρησιμοποίησαν εκχυλίσματα καλλιέργειας *Pseudomonas aeruginosa* για τοπική εφαρμογή, προς θεραπεία λοιμώξεων (Koneman και συν., 2006).

Η σύγχρονη ιστορία των αντιβιοτικών αρχίζει το 1929 με την ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming, που ολοκληρώθηκε επιτυχώς 10 χρόνια μετά από τους Florey και Chain, όταν ανέπτυξαν μία πρακτική τεχνική απομόνωσης του αντιμικροβιακού εκχυλίσματος σε επαρκή καθαρότητα και ποσότητα για χρήση στους ασθενείς (Goldsworthy και Mc Farlane, 2002).

Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου πολέμου ο Waksman ανακάλυψε τη στρεπτομυκίνη (1943), ο Dubos την τυροτριχίνη και ο Duggar τη χλωροτετρακυκλίνη (1944) (Koneman και συν., 2006).

A.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

Οι κυριότεροι μηχανισμοί με τους οποίους εκφράζεται η ανθεκτικότητα ενός μικροβίου στα αντιμικροβιακά φάρμακα συνοψίζονται στα παρακάτω (Mandell και συν., 2000):

- α. Ενζυμική αδρανοποίηση του αντιμικροβιακού φαρμάκου
 - β-λακταμάσες
 - Ένζυμα τροποποιητικά των αμινογλυκοσιδών
- β. Τροποποίηση των ενζύμων-στόχων
 - Τροποποίηση των πενικιλλιοσυνδετικών πρωτεϊνών (PBP's)
 - Τροποποίηση προδρόμων στόχων επί του κυτταρικού τοιχώματος



- Τροποποίηση των θέσεων σύνδεσης πάνω στα ριβοσωμάτια
- Τροποποίηση της DNA-γυράσης

γ. Περιορισμός της εισόδου του αντιμικροβιακού φαρμάκου στο εσωτερικό του μικροβίου

- Ελάττωση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης (τροποποίηση των πορινών)
- Ενεργητική απέκκριση του αντιμικροβιακού φαρμάκου.

Πριν περιγραφούν οι επιμέρους μηχανισμοί αξίζει να σημειωθεί ότι πολύ συχνά σε ένα συγκεκριμένο μικροβιακό στέλεχος παρατηρούνται πολλαπλοί μηχανισμοί αντοχής, ακόμη και για το ίδιο αντιμικροβιακό φάρμακο (Logian , 2005).

A.3.1. ENZYMΙΚΗ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ

Εδώ ανήκουν οι περιπτώσεις των β-λακταμασών και των τροποποιητικών ενζύμων των αμινογλυκοσιδών.

A.3.1.1. β-λακταμάσες

Είναι ένζυμα παραγόμενα από τα βακτήρια, τα οποία διασπούν το β-λακταμικό δακτύλιο των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Στα Gram (+) βακτήρια η β-λακταμάση απεκκρίνεται στον περιβάλλοντα χώρο, ενώ στα Gram (-) παραμένει στον περιπλασματικό χώρο (Livermore, 1995).

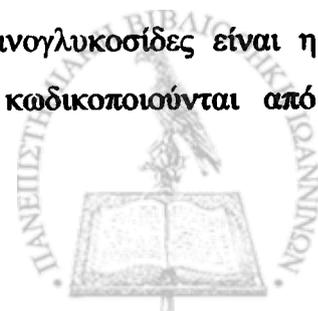
Μία τρέχουσα ταξινόμηση είναι η ταξινόμηση κατά Bush. Το ταξινομητικό αυτό σχήμα βασίζεται σε ορισμένα λειτουργικά γνωρίσματα, όπως οι ρυθμοί υδρόλυσης για μία σειρά υποστρωμάτων και ο βαθμός αναστολής τους από το κλαβουλανικό οξύ. Μειονέκτημά του αποτελεί το γεγονός ότι απλές σημειακές μεταλλάξεις μπορούν να το τροποποιήσουν σημαντικά (Cohen και Powderly, 2000).

Ο Ambler (1980) ταξινομεί τις λακταμάσες ανάλογα με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους (τάξεις A, B, C, D).

Από τις 178 β-λακταμάσες που περιγράφηκαν από τους Bush-Jacoby-Medeiros πριν από μία περίπου δεκαετία (TEM-, SHV-, κλπ), ο αριθμός αυτός σήμερα αυξάνει διαρκώς (Chaudhary και Aggarwal, 2004).

A.3.1.2. Ένζυμα τροποποιητικά των αμινογλυκοσιδών

Μείζων μηχανισμός ανθεκτικότητας των βακτηρίων στις αμινογλυκοσίδες είναι η παραγωγή τροποποιητικών ενζύμων. Πρόκειται για ένζυμα που κωδικοποιούνται από



πλασμιδιακά γονίδια και τροποποιούν τις αμινομάδες ή τις υδροξυλομάδες των μορίων της αμινογλυκοσίδης. Το τροποποιημένο μόριο του αντιβιοτικού αδυνατεί πλέον να συνδεθεί με την πρωτεΐνη-στόχο πάνω στο ριβοσωμάτιο. Πολλά από τα γονίδια που κωδικοποιούν για αυτά τα ένζυμα έχουν πλέον ενσωματωθεί στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Τα ένζυμα αυτά ανήκουν σε τρεις τάξεις: φωσφοτρανσφεράσες (APH), ακετυλοτρανσφεράσες (AAC), νουκλεοτιδυλτρανσφεράσες (ANT) (Cohen και Powderly, 2000).

A.3.2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ENZYΜΩΝ ΣΤΟΧΩΝ

A.3.2.1. Τροποποίηση των πενικιλινোসυνδεδετικών πρωτεϊνών (PBP's)

Κλασικό παράδειγμα του μηχανισμού αυτού είναι η ανθεκτικότητα των σταφυλοκόκκων στη μεθικιλίνη και στις αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες. Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίζονται ως μεθικιλίνη-ανθεκτικά, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) και Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci (MRCoNS) και οφείλουν την ανθεκτικότητά τους στην παραγωγή μιας επιπλέον PBP, της PBP2a. Οι PBP's είναι ένζυμα του κυτταρικού τοιχώματος και καταλύουν την αντίδραση της τρανσπεπτιδίωσης (transpeptidation). Πρόκειται για μία από τις τελικές αντιδράσεις του πολυμερισμού (cross-linking) της πεπτιδογλυκάνης. Η PBP2a, εμφανίζει ελαττωμένη χημική συγγένεια προς τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και υποκαθιστά τις φυσιολογικές PBP's, αναλαμβάνοντας τη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικού που διαφορετικά θα ήταν θανατηφόρες (Mandell και συν., 2000, Lorian, 2005, Safo και συν., 2005, Grundmann και συν., 2006).

Για τη σύνθεση της PBP2a ευθύνεται ένα γονίδιο, το *mecA*, το οποίο ανήκει σε μία «γονιδιακή νησίδα» που προήλθε από άλλα βακτήρια και εισχώρησε στο βακτηριακό χρωμόσωμα (Brakstad και Maeland, 1997, McKinney και συν., 2001).

A.3.2.2. Τροποποίηση προδρόμων στόχων επί του κυτταρικού τοιχώματος

Στο μηχανισμό αυτό αποδίδεται η ανθεκτικότητα των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντεροκόκκων (Vancomycin Resistant Enterococci, VRE) στα γλυκοπεπτίδια. Η ανθεκτικότητα των VRE οφείλεται στην εισχώρηση ενός τρανσποζονίου (Tn1546) στο βακτηριακό χρωμόσωμα (Payne και Tomasz, 2004). Το Tn1546 αποτελείται από εννέα γονίδια, μεταξύ των οποίων και τα VanA, VanB, VanC, VanH και VanX. Το VanH κωδικοποιεί μία δεϋδρογενάση που καταλύει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε D-γαλακτικό οξύ (Moellering, 1998).



Το προϊόν του VanA, η VanA-λιγάση, χρησιμοποιεί το παραπάνω υπόστρωμα για να συνθέσει το διπεπτίδιο D-Ala-D-Lac που ενσωματώνεται στην πρόδρομη μορφή της πεπτιδογλυκάνης, υποκαθιστώντας το D-Ala-D-Ala που παράγεται απουσία VanA και VanH. Η υποκατάσταση αυτή παρεμποδίζει τη σύνδεση με το γλυκοπεπτίδιο και επιτρέπει τον «πολυμερισμό» της πεπτιδογλυκάνης ακόμη και παρουσία του γλυκοπεπτιδίου (Rao και συν., 1999, Gold, 2001, Chen και συν., 2003).

A.3.2.3. Τροποποίηση των θέσεων σύνδεσης πάνω στα ριβοσωμάτια

Η τροποποίηση της υπομονάδας 23S του ριβοσωματικού RNA αποτελεί τον πλέον συχνό μηχανισμό ανθεκτικότητας των Gram (+) βακτηρίων στις μακρολίδες, στις λινκοσαμίδες και στις στρεπτογραμίνες (MLS_B φαινότυπος) (Riska και συν., 2004, Pereyre και συν., 2006).

A.3.2.4. Τροποποίηση της DNA-γυράσης και της IV-τοποϊσομεράσης

Πολλά ανθεκτικά στις κινολόνες Gram (-) βακτηρίδια φέρουν μία μετάλλαξη στο *gyrA*, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της υπερέλικωσης του DNA και την αύξηση της ανθεκτικότητας (Lindback και συν., 2006).

Για την ανθεκτικότητα των σταφυλοκόκκων στις κινολόνες ευθύνονται μεταλλάξεις στο *grlA* γονίδιο της IV-τοποϊσομεράσης, με ή χωρίς μεταλλάξεις στο *gyrA* (Cohen και Powderly, 2000).

A.3.3. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΣΤΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΥ

A.3.3.1. Ελάττωση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης

(τροποποίηση των πορινών)

Οι πορίνες είναι πρωτεϊνικά κανάλια της μεμβράνης των βακτηρίων μέσω των οποίων διέρχονται τα υδρόφιλα μόρια, δηλαδή τα περισσότερα αντιβιοτικά (Logian, 2005). Επομένως μεταλλάξεις που οδηγούν στην απώλεια συγκεκριμένων πορινών επιφέρουν αύξηση της ανθεκτικότητας του στελέχους που υπέστη τη μετάλλαξη (Mandell και συν., 2000).

Πρόκειται για ελάσσονα μηχανισμό ανθεκτικότητας που όμως αφορά πολλά είδη βακτηρίων, όπως επίσης και πολλά αντιμικροβιακά φάρμακα, όπως κινολόνες, καρβαπενέμες, αμινογλυκοσίδες, χλωραμφαινικόλη (Cohen και Powderly, 2000).



A.3.3.2. Ενεργητική απέκκριση του αντιμικροβιακού φαρμάκου

Πρόκειται για ένα μηχανισμό που αφορά αρκετά βακτήρια. Παρουσία του μηχανισμού αυτού η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιμικροβιακού φαρμάκου δεν φτάνει στα επιθυμητά επίπεδα προκειμένου να ασκήσει τη δράση του (Koneman και συν., 2006). Η απέκκριση οφείλεται στην παρουσία εξειδικευμένων «αντλιών» (πρωτεϊνών) της μεμβράνης. Στα βακτήρια έχουν περιγραφεί πέντε τάξεις τέτοιων πρωτεϊνών (Cattoir, 2004, Lorian, 2005):

1. MFS (major facilitator family)
2. MATE (multidrug and toxic efflux)
3. RND (resistance-nodulation division family)
4. SMR (small multidrug resistance)
5. ABC (ATP-binding cassette).

Οι τέσσερις πρώτες είναι απλές πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν την αντλία πρωτονίων της μεμβράνης, ενώ η τελευταία χρησιμοποιεί την υδρόλυση του ATP. Ο ρόλος του μηχανισμού αυτού είναι συνήθως δευτερεύων, δηλαδή απλά συμβάλλει στην επίτευξη υψηλού βαθμού αντοχής (Lorian, 2005).

Παραδείγματα του μηχανισμού αυτού :

- Κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας έναντι των τετρακυκλινών και των μακρολίδων (Koneman και συν., 2006)
- Επικουρικός μηχανισμός ανθεκτικότητας των σταφυλοκόκκων έναντι των κινολονών (κύριος μηχανισμός είναι η τροποποίηση της DNA-γυράσης) (Koneman και συν., 2006).

A.3.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

A.3.4.1. Μηχανισμός αντοχής στην Αμφοτερικίνη-B

Ελάττωση της περιεκτικότητας της μεμβράνης σε εργοστερόλη. Διακρίνονται τρία επίπεδα αντοχής ανάλογα με την περιεκτικότητα: Χαμηλού βαθμού, ενδιάμεση (ανώμαλη συσσώρευση Δ8-στερολών) και υψηλού βαθμού (24-μεθυλεν-λανοστερόλη αντί εργοστερόλης). Από μοριακή άποψη φαίνεται πως στα ανθεκτικά στελέχη τα γονίδια *erg2* και *erg3* που κωδικοποιούν για την C-8-στερολ-ισομεράση και την C-5-στερολ-δεσατουράση αντίστοιχα είναι ελαττωματικά (Collier και συν., 1998, Sterling και Merz, 1998, Sanglard και συν., 2003).



A.3.4.2. Μηχανισμοί αντοχής στις αζόλες

- Τροποποίηση της θέσης σύνδεσης του ενζύμου-στόχου, με αποτέλεσμα ελαττωμένη χημική συγγένεια της P450DM (σημειακή μετάλλαξη στο *erg11*).
- Αυξημένη έκφραση του ενζύμου-στόχου, με αποτέλεσμα υπερπαραγωγή P450DM.
- Προαγωγή σχηματισμού αντλιών ενεργητικής απέκκρισης του φαρμάκου (Collier και συν., 1998, Sanguinetti και συν., 2005, Cernicka και Subik, 2006).

A.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Οι εργαστηριακές μέθοδοι για τον έλεγχο της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις δοκιμασίες διάχυσης και τις δοκιμασίες αραίωσης (Mims και συν., 2004).

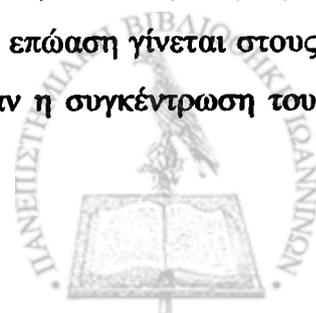
Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τη μέθοδο διάχυσης των αντιβιοτικών σε άγαρ με τη μορφή διαλύματος σε βυθίσματα, σε κυλίνδρους ή με τοποθέτηση εμποτισμένων με αντιβιοτικά δίσκων. Η απάντηση των μικροοργανισμών εκφράζεται με τη δημιουργία ζώνης αναστολής της μικροβιακής ανάπτυξης γύρω από το σημείο τοποθέτησης του αντιβιοτικού (Λεβειδιώτου, 2004, Isenberg, 2004).

Οι δοκιμασίες αραίωσης περιλαμβάνουν τη μέθοδο αραίωσης των αντιβιοτικών σε υγρά (ζωμό) και στερεά (άγαρ) θρεπτικά υποστρώματα (Περόγαμβρος και Λεγάκης, 1987, Isenberg, 2004).

A.4.1. ΜΕΘΟΔΟΣ BAUER-KIRBY

Πρόκειται για πρότυπη μέθοδο διάχυσης αντιβιοτικών σε άγαρ με τη μορφή εμποτισμένων με αντιβιοτικά δίσκων. Η μέθοδος ακολουθεί ορισμένα πρότυπα σχετικά με τα θρεπτικά υποστρώματα, το ενοφθάλμισμα, τους δίσκους, την επώαση και την ανάγνωση των αποτελεσμάτων, ενώ η προτύπωσή της ανανεώνεται από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, πρώην NCCLS) ανάλογα με τα βακτηριακά στελέχη και τα νέα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα (CLSI, 2006).

Το χρησιμοποιούμενο υλικό είναι το Mueller Hinton Agar (MHA), το ενοφθάλμισμα έχει θολερότητα ίση με 0,5 της θολομετρικής κλίμακας Mc Farland, η επώαση γίνεται στους 35⁰C αεροβίως για 16-18 ώρες. Η ζώνη αναστολής σχηματίζεται όταν η συγκέντρωση του



αντιβιοτικού, ίση ή μεγαλύτερη από την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC, minimal inhibitory concentration), επιδρά σε ένα αρκετά μεγάλο βακτηριακό πληθυσμό, με αποτέλεσμα να επιτύχει την αναστολή της ανάπτυξής του. Από την έκταση της ζώνης χαρακτηρίζεται το βακτήριο ως: ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο, ενδιάμεσης ευαισθησίας και ανθεκτικό, βάσει των πινάκων της CLSI (CLSI, 2006).

A.4.2. E-TEST

Πρόκειται για μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με τη μορφή ταινιών που φέρουν διαβάθμιση πυκνότητας αντιβιοτικού. Η πλαστική ταινία στην άνω επιφάνειά της έχει τυπωμένη μία κλίμακα συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού, ενώ στην κάτω το αντιβιοτικό έχει στερεοποιηθεί σε μία σειρά συνεχών συγκεντρώσεων σε εκθετική βάση. Μετά την επιστροφή του ενοφθαλμίσματος στο υπόστρωμα (MHA), την τοποθέτηση των ταινιών και την επώαση για 18-24 ώρες, ακολουθεί η ανάγνωση του αποτελέσματος. Ως MIC θεωρείται η συγκέντρωση της κλίμακας η οποία τέμνεται από τη ζώνη αναστολής (De La Maza 2001, Koneman, 2006).

A.4.3. ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Το πιο διαδεδομένο αυτόματο σύστημα είναι το VITEK (bioMerieux, France). Οι εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί και οι αντιμικροβιακοί παράγοντες έρχονται σε επαφή σε υγρό μέσο που διαμοιράζεται σε φρεάτια σε μικρή πλαστική κάρτα. Κάθε ώρα προσδιορίζεται αυτόματα η κινητική ανάπτυξης σε κάθε κάρτα με ηλεκτρο-οπτικό σύστημα, ενώ ο αυτόματος εμβολιασμός, ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται για την πλειονότητα των βακτηρίων σε 6-15 ώρες. Οι MICs προσδιορίζονται μετά από στατιστική ανάλυση των καμπυλών βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία αντιβιοτικών (Forbes 1998, De La Maza 2001).

A.4.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

Η μέθοδος αραιώσεων σε ζωμό (Broth dilution method) θεωρείται μία από τις πιο ακριβείς μεθόδους για τον έλεγχο της ευαισθησίας, αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου αραιώσεων σε άγαρ και χρησιμοποιείται ως μέθοδος αναφοράς αφού προσδιορίζονται οι MIC και MBC (Περόγαμβρος και Λεγάκης, 1987, Isenberg, 2004).

Η MIC (Minimum Inhibitory Concentration) ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροβίου και αντιστοιχεί στην τελευταία από τις αραιώσεις του αντιβιοτικού που ύστερα από επώαση 18-24 ωρών, ακόμη αναστέλλει την ορατή ανάπτυξή του (Mims και συν., 2004). Ωστόσο η πραγματική τιμή της MIC βρίσκεται



μεταξύ της κατώτερης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και της αμέσως κατώτερης συγκέντρωσης από αυτή (CLSI, 2006).

Η MBC (Minimum Bactericidal Concentration) ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που σκοτώνει το μικροοργανισμό (Isenberg, 2004, Preuss και συν., 2005). Ο προσδιορισμός της γίνεται αν από τις αραιώσεις του αντιβιοτικού για τις οποίες δεν υπάρχει ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού (απουσία θολερότητας), ανακαλλιεργήσουμε σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα, επώασουμε και σημειώσουμε το τρυβλίο στο οποίο δεν υπάρχει ανάπτυξη (Mims και συν., 2004).

Πιο αναλυτικά η μέθοδος αραιώσεων σε ζωμό διακρίνεται σε μακρομέθοδο και μικρομέθοδο. Η πρώτη εκτελείται σε σωληνάρια και χρησιμοποιεί μεγάλους όγκους (≥ 1 ml), είναι δαπανηρή και επίπονη, ενώ η δεύτερη χρησιμοποιεί μικρότερους όγκους (0,05-0,2 ml) σε ειδικές πλάκες μικροτιτλοποίησης και είναι ταχεία και οικονομική (CLSI, 2006).

A.4.4.1. Μακρομέθοδος (broth macrodilution method)

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή απαιτείται η παρασκευή διαδοχικών υποδιπλάσιων αραιώσεων του αντιβιοτικού σε σωληνάρια με τον κατάλληλο θρεπτικό ζωμό (Mueller Hinton Broth). Σε όλα τα σωληνάρια προσθέτουμε το ενοφθάλμισμα του μικροβίου πυκνότητας 5×10^5 cfu/ml. Μετά από επώαση των σωληναρίων στους 35°C για 16-20 ώρες εξετάζουμε μακροσκοπικά για εμφανή ανάπτυξη των μικροβίων που υποδηλώνεται με τη θολερότητα των σωληναρίων. Η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην οποία δεν παρατηρείται ανάπτυξη μικροβίου (διαυγές σωληνάριο), αποτελεί την MIC. Η MBC προκύπτει μετά από ανακαλλιέργεια των διαυγών σωληναρίων που δεν εμφανίζουν ορατή μικροβιακή ανάπτυξη, σε θρεπτικό άγαρ και νέα επώαση. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού για την οποία μετά την επώαση δεν παρατηρείται ανάπτυξη μικροβίου (φονεύονται τουλάχιστον το 99,9%) είναι η MBC (Αρσένη 1994, Isenberg, 2004, Mims και συν 2004, CLSI, 2006).

A.5. ΤΙ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΣΗΜΕΡΑ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Η εμφάνιση και εξάπλωση των αντιγονικών καθοριστών (γονιδίων) ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα εξακολουθεί να αποτελεί μία «πρόκληση» της ικανότητάς μας να θεραπεύουμε σοβαρές λοιμώξεις. Την περασμένη δεκαετία γίναμε μάρτυρες μιας ραγδαίας αύξησης της ανθεκτικότητας, τόσο ενδονοσοκομειακής όσο και στα πλαίσια της κοινότητας (Levy, 1998). Παράλληλα όμως μάθαμε πλέον πολλά για τους μηχανισμούς με τους οποίους τα μικρόβια καθίστανται ανθεκτικά. Έτσι ελπίζουμε πλέον ότι θα μπορέσουμε να



εφαρμόσουμε νέες στρατηγικές αντιμετώπισης του προβλήματος, με την εισαγωγή νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων και τον καλύτερο έλεγχο των λοιμώξεων (Livermore και συν., 1998).

Η συντριπτική πλειοψηφία των αντιβιοτικών χρησιμοποιείται σε δύο τομείς: α) στην ιατρική θεραπευτικά και β) στην κτηνιατρική θεραπευτικά, για την πρόληψη λοιμώξεων και ως προαγωγείς της ανάπτυξης (επιτάχυνση αύξησης βάρους) (Johnston, 1998, Wise και συν., 1998, Teuber, 2001, Levy και Marshall, 2004).

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα ποσοστά χρήσης των αντιβιοτικών. Σύμφωνα με τους Wise και συν. (1998), το 75% των αντιβιοτικών είναι αμφίβολης θεραπευτικής αξίας, το 20%-40% κρίνεται ως μη αναγκαίο, ενώ το 40%-80% της χρήσης τους στη ζωική παραγωγή αμφισβητείται.

Πίνακας 1: Ποσοστό χρήσης των αντιβιοτικών στην ιατρική και κτηνιατρική (Wise και συν., 1998).

ΠΕΔΙΟ ΧΡΗΣΗΣ	ΤΡΟΠΟΙ ΧΡΗΣΗΣ
Χρήση σε ανθρώπους 50%	20% νοσοκομείο
	80% κοινότητα (8/10 λοιμώξεις αναπνευστικού)
Χρήση σε ζωική παραγωγή 50%	20% θεραπεία
	80% προαγωγείς ανάπτυξης -χημειοπροφύλαξη

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την αύξηση της ανθεκτικότητας. Η αυξημένη χρήση μιας μεγάλης ποικιλίας αντιμικροβιακών και η εισαγωγή στη θεραπευτική πολλών παρεμφερών ενώσεων στις δεκαετίες '80 και '90 σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση και εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών. Οι ολοένα και αυξανόμενοι αριθμοί ανοσοκατασταλμένων ασθενών έχουν δημιουργήσει περιβάλλοντα στα οποία επίσης ευνοείται η διασπορά της ανθεκτικότητας (Logian, 2005).

Οι απαιτήσεις για περιορισμό του κόστους στα σύγχρονα νοσοκομεία οδήγησε σε διαταραχές της αριθμητικής σχέσης ασθενών / προσωπικού, γεγονός που συνδέθηκε με

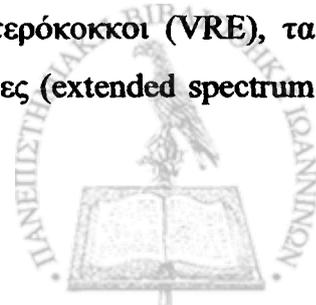


ελαστικότερη εφαρμογή μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων. Τέλος, ο αυξανόμενος αριθμός μονάδων εντατικής θεραπείας, με τους παρατεταμένους χρόνους παραμονής των ασθενών και το συγχρωτισμό πολλών ασθενών σε μικρούς χώρους, συνέβαλε στην επιτάχυνση τόσο της εμφάνισης όσο και της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας (Goossens και Sprenger, 1998, Struelens, 1998, Lorian 2005).

Παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα από τα ανθεκτικά στελέχη συναντώνται στα νοσοκομεία, υπάρχουν και στελέχη, όπως *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, MRSA, που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις και στην κοινότητα (Levy και Marshall, 2004, Alanis, 2005). Επίσης ανθεκτικά βακτήρια από τα νοσοκομεία μπορούν να εισαχθούν στην κοινότητα μέσω ενός μικρού ποσοστού (5%) ασθενών που εξέρχονται από αυτά και συνεχίζουν τη θεραπεία κατ' οίκον (Levy, 1998), ενώ μεγάλος είναι και ο κίνδυνος μεταφοράς ανθεκτικών στελεχών μέσω των τροφίμων ζωικής προέλευσης, λόγω των αντιβιοτικών που χορηγούνται στη ζωική παραγωγή (Mc Kellar, 1998).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι ένα απολύτως προβλέψιμο επακόλουθο της χρήσης ισχυρών αντιμικροβιακών παραγόντων. Συγκρινόμενα με το ανθρώπινο είδος, του οποίου η εξέλιξη είναι βραδεία, τα μικρόβια πολλαπλασιάζονται και εξελίσσονται ταχέως. Μία περίοδος μόλις 24 ωρών προσδίδει πάνω από 10^6 ευκαιρίες για δημιουργία μεταλλάξεων για πολλά βακτήρια (Lorian 2005). Οι μεταλλάξεις εκείνες που προσδίδουν κάποιο επιλεκτικό πλεονέκτημα (selective advantage) σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον εξαπλώνονται ταχέως. Επιπλέον, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι τα βακτήρια ήρθαν αντιμέτωπα με τα αντιμικροβιακά φάρμακα πολύ πριν την εισαγωγή οποιουδήποτε αντιμικροβιακού στη θεραπευτική. Αυτό γιατί τα περισσότερα αντιβιοτικά εν χρήσει είναι φυσικά προϊόντα μυκήτων ή βακτηρίων (Butler και Buss, 2006). Και επειδή στη φύση συνήθως συνυπάρχουν πολλά είδη μικροβίων, τα βακτήρια που συνυπάρχουν στο ίδιο περιβάλλον με μικρόβια που παράγουν αντιβιοτικά θα πρέπει να αναπτύξουν μηχανισμούς που θα τους επιτρέψουν να επιβιώσουν στο περιβάλλον αυτό. Επομένως πολλά, αν όχι όλα, γονίδια ανθεκτικότητας είναι πιθανόν να υπήρχαν πολύ πριν την ανακάλυψη των αντιβιοτικών. Η εμφάνισή τους σήμερα αντικατοπτρίζει το σημαντικό επιλεκτικό πλεονέκτημα που προσδίδουν τα γονίδια αυτά σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε αντιμικροβιακά (Alanis, 2005, Lorian 2005).

Η μικροβιακή αντοχή αφορά μεγάλο αριθμό παθογόνων βακτηρίων που απομονώνονται στο νοσοκομειακό περιβάλλον, όπως οι μεθικιλίνη-ανθεκτικοί *Staphylococcus aureus* (MRSA), οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (VRE), τα Gram-αρνητικά βακτήρια που παράγουν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες (extended spectrum



beta-lactamases, ESBLs) και τα πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter* spp και *P. aeruginosa* (Struelens, 1998).

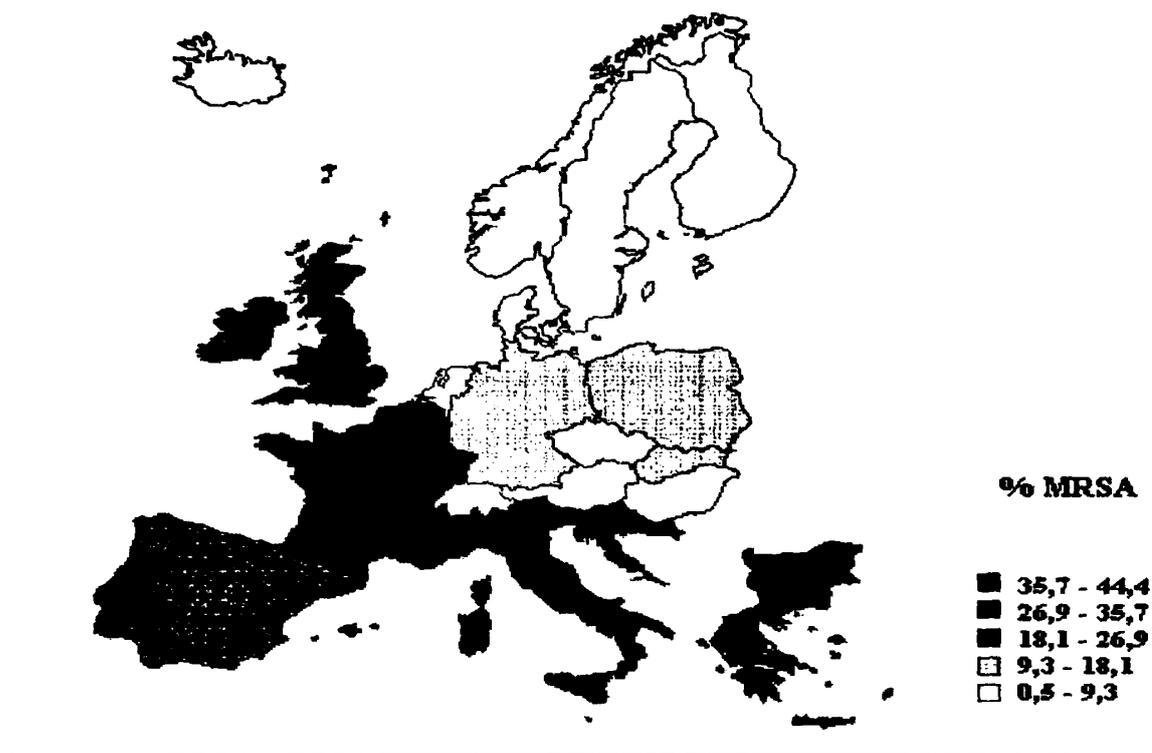
Η ανθεκτικότητα εμφανίσθηκε πολύ γρήγορα. Μελέτες που έγιναν σε Νοσοκομεία του Λονδίνου έδειξαν μία σημαντική αύξηση στο ποσοστό των πενικιλίναςοπαραγωγών στελεχών *S. aureus* ως τα τέλη της δεκαετίας του '40 (Levy και Marshall, 2004). Ο Sir Alexander Fleming, σε συνέντευξή του στους New York Times το 1945, προειδοποιούσε ότι η αλόγιστη χρήση της πενικιλίνης μπορούσε να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα των στελεχών *S. aureus* και στην εμφάνιση σοβαρότερων λοιμώξεων και είχε δίκιο (Alanis, 2005). Έτσι μόλις το 1946 το 6% των σταφυλοκοκκικών στελεχών παρήγαγαν πενικιλινάσες, ενώ στα τέλη του 1948 πάνω από το 50% των νοσοκομειακών στελεχών *S. aureus* ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη (Livermore, 2000). Οι λόγοι αυτής της ταχείας ανάπτυξης ανθεκτικότητας δεν είναι γνωστοί, ακολούθησε ωστόσο αλόγιστη χρήση της πενικιλίνης με αποτέλεσμα σε όλες ανεξαιρέτως τις πληγές να χρησιμοποιούν πενικιλίνη σε σκόνη, ενώ διέθεταν και σκόνη πενικιλίνης για εισπνοές στις λοιμώξεις του αναπνευστικού (Livermore, 2000).

Στη συνέχεια η χρήση των αντισταφυλοκοκκικών πενικιλινών οδήγησε γρήγορα και στην εμφάνιση των MRSA στελεχών, αφού η διάθεση της μεθικιλίνης στο εμπόριο τον Οκτώβριο του 1960, συνοδεύτηκε από την εμφάνιση τριών MRSA στελεχών στη Μ. Βρετανία μόλις 6 μήνες αργότερα (Grundmann και συν., 2006).

Σήμερα το 40-60% των νοσοκομειακών στελεχών *S. aureus* στις Η.Π.Α και στο Ηνωμένο Βασίλειο είναι MRSA στελέχη (Levy και Marshall, 2004, Zetola και συν., 2005) και οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνισή τους σχετίζονται με πρόσφατη νοσηλεία και αντιμικροβιακή θεραπεία, χρόνια νόσο, χειρουργική επέμβαση και στενή επαφή με πάσχοντα ή φορέα MRSA στελέχους (Salgado και συν., 2003). Το ποσοστό των MRSA στελεχών που απομονώθηκαν από νοσοκομεία 26 ευρωπαϊκών χωρών την περίοδο 1999-2002 κυμαινόταν από 1% στη Β. Ευρώπη έως και πάνω από 40% στη Νότια και Δυτική Ευρώπη (Σχήμα 1) (Appelbaum, 2006).

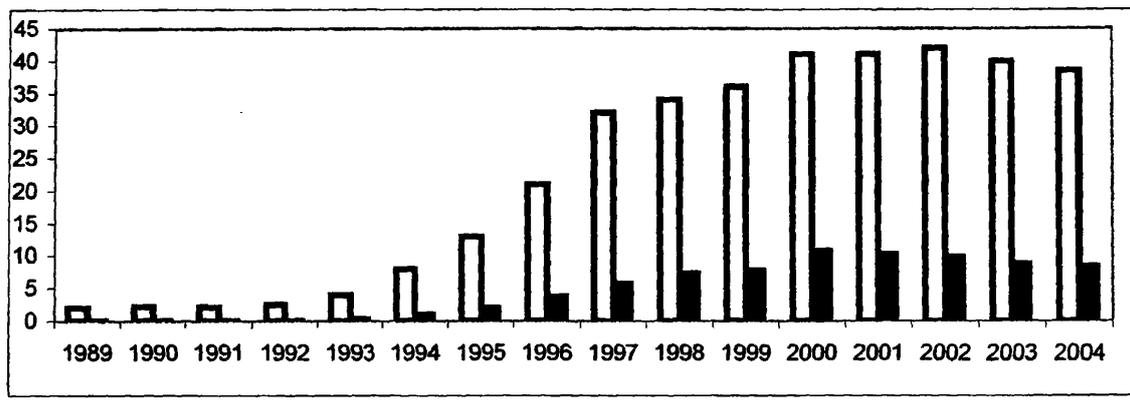


Σχήμα 1: Ποσοστό εμφάνισης MRSA νοσοκομειακών στελεχών στην Ευρώπη, 1999-2002 (Appelbaum, 2006).



Σε πολυκεντρική 5ετή (1996-2000) μελέτη σε νοσοκομεία της Γαλλίας το ποσοστό των MRSA στελεχών ήταν 38,4% (Albertini και συν., 2002), σε άλλη μελέτη στις Η.Π.Α το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 36% (Diekema και συν., 2004a), στα νοσοκομεία της Ταϊβάν αυξήθηκε από 39% το 1991 σε 75% το 2003 (Hsueh και συν., 2005), ενώ σε πολυκεντρική μελέτη στη Βραζιλία το 87,7% των coagulase-negative Staphylococci (CNS) στελεχών που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος, ήταν ανθεκτικά στη μεθικιλίνη (Caieraο και συν., 2004). Όπως φαίνεται στο σχήμα 2, το ποσοστό βακτηριαιμιών στα νοσοκομεία του Ηνωμένου Βασιλείου που οφείλονται σε MRSA στελέχη αυξήθηκε από 1-2% το 1990 σε 40% το 2000 (Livermore, 2006).

Σχήμα 2: Βακτηριαμίες από MRSA στελέχη στο Ηνωμένο Βασίλειο (1989-2004) (Livermore, 2006). (□ : % βακτηριαμιών από MRSA σε σχέση με το σύνολό τους από *S. aureus*, ■ : % βακτηριαμιών από MRSA σε σχέση με το συνολικό αριθμό από κάθε μικροβιακό αίτιο)



Η εξάπλωση των MRSA στελεχών όμως, δεν αφορά μόνο το νοσοκομειακό περιβάλλον, αλλά και την κοινότητα (community-acquired MRSA strains, C-MRSA) (Levy, 2005) και σε χώρες όπως η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία, οι Η.Π.Α, το Ηνωμένο Βασίλειο και ο Καναδάς υπάρχουν αντίστοιχες αναφορές (Ma και συν., 2002). Σε μελέτες στις Η.Π.Α η φορεία υγιών ατόμων με MRSA στελέχη ανερχόταν στο 1,3% (0,2%-7,4%) (Salgado και συν., 2003), στη Γαλλία στο 1% (Ficca και συν., 2006), το ποσοστό αυτό όμως αυξάνει σε κλειστές κοινωνίες όπως των Αυστραλών ιθαγενών και φθάνει στο 42% (Salgado και συν., 2003). Χαρακτηριστική τέλος είναι και η εμφάνιση παιδιατρικών λοιμώξεων στην κοινότητα από MRSA στελέχη, χωρίς να προϋπάρχουν παράγοντες κινδύνου, όπως πρόσφατη νοσηλεία ή λήψη αντιβιοτικών.

Η παρουσία των MRSA στελεχών αποτέλεσε την αφετηρία για χρήση της βανκομυκίνης, που με τη σειρά της οδήγησε στην εμφάνιση VRE στελεχών με σχετική καθυστέρηση μιας 30ετίας, στελεχών MRSA με ενδιάμεση ευαισθησία στη βανκομυκίνη (VISA) (Ιαπωνία, 1997) και πρόσφατα στελεχών MRSA ανθεκτικών στη βανκομυκίνη (VRSA), με απρόβλεπτες κλινικές επιπτώσεις (Song και συν., 2004).

Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις προκαλούνται συχνότερα από στελέχη *Enterococcus faecium* (85-90%), που είναι και τα περισσότερα VRE στελέχη, σε σχέση με τα στελέχη *Enterococcus faecalis* (5-10%), οι δε παράγοντες κινδύνου για τον αποικισμό και λοίμωξη από VRE στελέχη είναι η σοβαρότητα της νόσου, τυχόν χειρουργικές επεμβάσεις, ενδοφλέβιοι καθετήρες, η χρονική διάρκεια λήψης και το είδος των αντιβιοτικών, κυρίως βανκομυκίνης,



αλλά και 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορινών, σπιροφλοξασίνης, αζτρεονάμης, κλινδαμυκίνης (De Lisle και Perl, 2005).

Στις Η.Π.Α το ποσοστό των VRE νοσοκομειακών στελεχών αυξήθηκε από 0,3% το 1989, σε 7,9% το 1993 (De Lisle και Perl, 2005), σε 10% το 1995 (Struelens, 1998) και σε 16,5% το 1997 (Jones και Pfaller, 1998), ενώ σε πρόσφατη μελέτη με συμμετοχή 494 νοσοκομείων των Η.Π.Α το ποσοστό των VRE στελεχών ήταν 10% (Diekema και συν., 2004a).

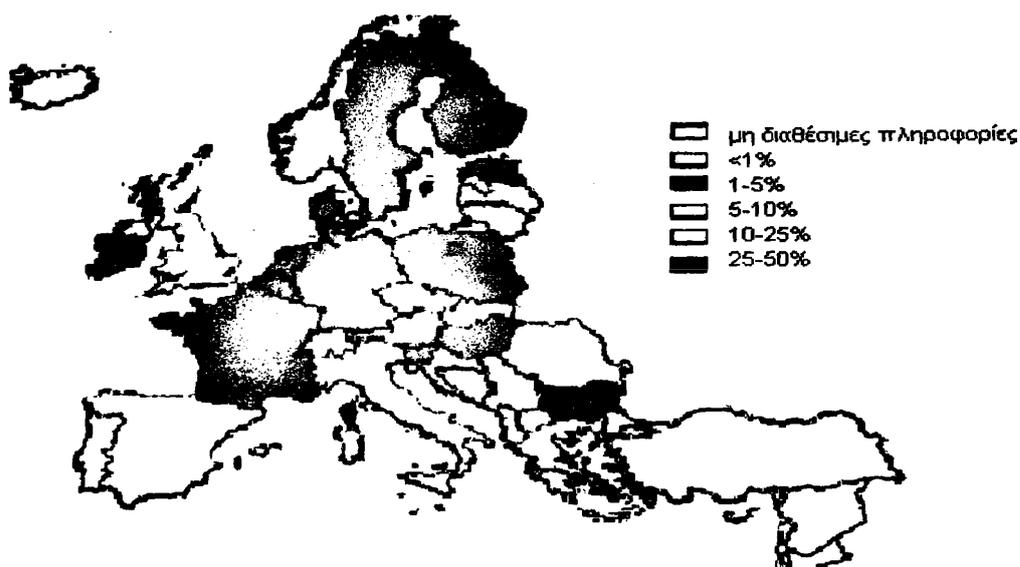
Τα MRSA και VRE στελέχη έχουν πρόσφατα χαρακτηριστεί από την SHEA (Society for Healthcare Epidemiology of America) ως τα «περισσότερο εκτός ελέγχου» στελέχη στα νοσοκομεία, αφού ενοχοποιούνται για περισσότερες του 50% και 25% των σταφυλοκοκκικών και εντεροκοκκικών λοιμώξεων αντίστοιχα, που αυξάνονται συνεχώς, όπως και ο κίνδυνος για μία εν δυνάμει μεταφορά της ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη από τα VRE στα MRSA στελέχη (Diekema και συν., 2004b).

Σημαντική είναι και η εμφάνιση στελεχών πνευμονιοκόκκου που εμφανίζουν αντοχή στην πενικιλίνη. Ποσοστά ανθεκτικότητας από 5% έως 45% έχουν αναφερθεί σε μελέτες που έγιναν στο Ηνωμένο Βασίλειο, Γερμανία, Βέλγιο, Ιταλία, Γαλλία και Ισπανία, ενώ υψηλή ανθεκτικότητα παρουσιάζεται και έναντι των μακρολίδων: Η.Π.Α (19%), Ισπανία (18%), Γαλλία (30%), Βέλγιο (30%). Επίσης υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας για τον *Streptococcus pyogenes* έναντι της ερυθρομυκίνης έχουν αναφερθεί στην Αυστραλία (18%), Ιαπωνία (60%), Φινλανδία (20%), Ηνωμένο Βασίλειο (23%), Ιταλία (81%) και Ισπανία (19%) (Goosens και Sprenger, 1998).

Η εμφάνιση εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν ESBLs αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα μικροβιακής αντοχής που ακολούθησε την κατάχρηση των κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς και της αζτρεονάμης (Σχήμα 3). Στη Γαλλία σε σύνολο 6121 νοσοκομειακών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* το 11,4% παρήγαγαν ESBLs, ενώ σε 2353 στελέχη *Enterobacter aerogenes* το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 47,7%. (Albertini και συν., 2002). Σύμφωνα με τους Luzzaro και συν. (2006), η Ελλάδα κατέχει την πρώτη θέση πανευρωπαϊκά σε εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBLs με ποσοστό 27,4% (2001-2002), ενώ ακολουθεί η Πορτογαλία με ποσοστό 15,5%.



Σχήμα 3: Ποσοστό ανθεκτικών στελεχών *E. coli* στις 3^ης γενιάς κεφαλοσπορίνες, Ευρώπη, 2005 (Denton, 2007).

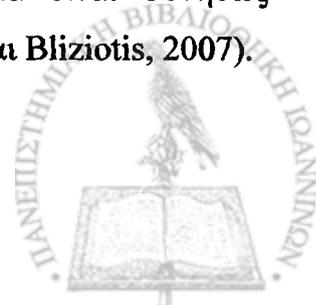


Σε μελέτη με τη συμμετοχή 17 εργαστηρίων από την Ασία και τη Νότιο Αφρική βρέθηκε ότι το 36% των στελεχών *Enterobacter cloacae* παρήγαγαν ESBLs (Bell και συν., 2003).

Σε άλλη μελέτη με τη συμμετοχή 100 Μονάδων Εντατικής Θεραπείας σε διάφορα κράτη της Ευρώπης, η παραγωγή ESBLs από στελέχη *K. pneumoniae* κυμαινόταν από 3% (Σουηδία) έως 34% (Πορτογαλία) (Hanberger και συν., 1999), ενώ σε αντίστοιχη μελέτη στις Η.Π.Α το ποσοστό ανήλθε στο 13% και σε χώρες της Λατινικής Αμερικής κυμαινόταν από 30% έως 60% (Paterson και Bonomo, 2005).

Σε εθνικές μελέτες τα στελέχη *E. coli* που παρήγαγαν ESBLs ήταν 5-8% σε Κορέα, Ιαπωνία, Μαλαισία και Σιγκαπούρη, 12-24% σε Ταϊλάνδη, Ταϊβάν, Φιλιππίνες και Ινδονησία, ενώ τα στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν ESBLs ήταν στην Ιαπωνία και στην Αυστραλία 5% και σε διάφορες Ασιατικές χώρες από 20% έως 50% (Paterson και Bonomo, 2005).

Οι επιδημίες από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν ESBLs, φάνηκε ότι μπορεί να ελεγχθούν με τη μείωση της κατανάλωσης της κεφαταζιδίμης και άλλων κεφαλοσπορινών, η αύξηση όμως της κατανάλωσης των καρβαπενεμών οδηγεί στην εμφάνιση καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* και *Acinetobacter* spp, τα οποία είναι συνήθως πολυανθεκτικά σε όλες τις ομάδες των αντιβιοτικών (Levy, 2005, Falagas και Bliziotis, 2007).



Σήμερα τόσο το *A. baumannii*, όσο και η *P. aeruginosa* αποτελούν πιθανώς τα περισσότερο προβληματικά Gram-αρνητικά νοσοκομειακά παθογόνα, ευθυνόμενα για την πρόκληση λοιμώξεων (π.χ πνευμονίας σε ασθενείς που λάμβαναν πριν αντιβιοτική αγωγή), ενώ η πλειοψηφία αυτών των στελεχών παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε όλα τα γνωστά αντιβιοτικά (Payne και Tomasz, 2004).

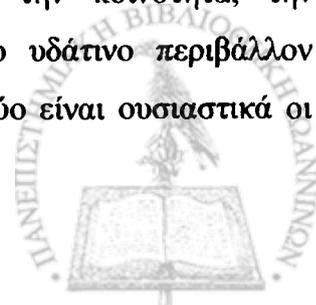
Η υπερκατανάλωση ωστόσο των αντιβιοτικών, καθώς και η εμφάνιση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών αφορά και την κτηνοτροφία, καθώς και τη βιομηχανία τροφίμων. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία, την πρόληψη και την αύξηση του σωματικού βάρους των παραγωγικών ζώων εδώ και 50 χρόνια και η προσθήκη τους σε υποθεραπευτικές δόσεις στις ζωοτροφές αποσκοπεί στην ταχύτερη αύξηση και στην πρόληψη των λοιμώξεων (Παπαδοπούλου, 2006).

Από το ένα περίπου εκατομμύριο τόνων αντιβιοτικών που έχουν απελευθερωθεί τα τελευταία 50 χρόνια στη βίοςφαιρα, το 50% ρέουν στα γεωργικά και κτηνοτροφικά κανάλια. Η FEDESA (European Federation of Animal Health) σε στατιστική μελέτη για την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ελβετία το 1997, ανέφερε ότι οι χορηγούμενες δόσεις αντιβιοτικών σε χώρες με αυξημένη ζωική παραγωγή ήταν για τις Αυστρία, Δανία, Φινλανδία, Ιρλανδία και Σουηδία 6, 24, 24, 12 και 24 mg/kg σωματικού βάρους, ενώ για τις Ισπανία, Ελλάδα και Βρετανία ήταν 103, 134 και 148 mg/kg σ.β. αντίστοιχα, αποδεικνύοντας την αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών στις τελευταίες (Teuber, 2001).

Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στη ζωική παραγωγή σήμερα είναι οι β-λακτάμες, οι τετρακυκλίνες, οι αμινογλυκοσίδες, οι μακρολίδες, οι σουλφοναμίδες και οι κινολόνες (Johnston, 1998).

Οι πρώτοι φόβοι για τη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών μικροοργανισμών πρωτοδιατυπώθηκαν από Βρετανούς επιστήμονες τη δεκαετία του 1960 και για αυτό το λόγο συντάχθηκε ειδική έκθεση (Swann Report, 1969) που απαγόρευε την προσθήκη αντιβιοτικών στις ζωοτροφές (Παπαδοπούλου, 2006). Οι φόβοι αυτοί επιβεβαιώθηκαν αργότερα με την εμφάνιση VRE στελεχών. Η χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στη ζωική παραγωγή είναι ωστόσο αναγκαία, αρκεί να πληροί τις προϋποθέσεις διαφύλαξης της δημόσιας υγείας.

Συμπερασματικά, η υπερκατανάλωση των αντιβιοτικών οδηγεί στην αύξηση της μικροβιακής αντοχής και αφορά το νοσοκομειακό περιβάλλον, την κοινότητα, την κτηνοτροφία, τα τρόφιμα ζωικής και φυτικής προέλευσης και το υδάτινο περιβάλλον (Johnston, 1998, Levy, 1998, Wise και συν., 1998, Teuber, 2001). Δύο είναι ουσιαστικά οι



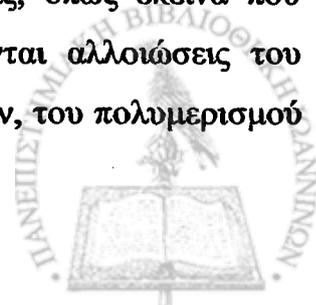
επιλογές καταπολέμησης της ανάπτυξης και της εξάπλωσης των ανθεκτικών στελεχών. Η ελάττωση της χρήσης των αντιβιοτικών και η βελτίωση των συνθηκών υγιεινής. Οι πιθανότητες «μεταφοράς» της μικροβιακής ανθεκτικότητας από τα ζώα στους ανθρώπους θα μπορούσε να ελαττωθεί κατά πολύ με αυστηρότερα μέτρα υγιεινής στην παραγωγή τροφίμων. Από τη στιγμή δε που η έκθεση των βακτηρίων σε υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών σχετίζεται με την αύξηση της επιλογής της ανθεκτικότητας, κάτι τέτοιο πρέπει να αποφευχθεί (Mc Kellar, 1998).

Η σωστή χρήση των αντιβιοτικών με τη σειρά της βοηθάει στην πρόληψη της επικράτησης ανθεκτικών στελεχών, ενώ η αυστηρή τήρηση των μέτρων πρόληψης των λοιμώξεων βοηθάει στην αποφυγή μεταφοράς τους. Παράλληλα γίνεται προσπάθεια χρήσης και άλλων ουσιών με πιθανή αντιμικροβιακή δράση, συμπεριλαμβανομένων και των αιθέριων ελαίων που εξετάζονται ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση, αλλά και ως προς τη δυνατότητα χρησιμοποίησής τους με ασφάλεια σε τομείς, όπως η βιομηχανία τροφίμων.

A.6. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Πρόκειται για μείγματα πτητικών συστατικών ελαιώδους σύστασης, με χαρακτηριστική οσμή και γεύση. Συνίστανται από πολλές χημικές ουσίες που μπορούν να φθάσουν τις 150, ενώ το υπερσχύον συστατικό καθορίζει και το χαρακτήρα τους (Χαρβάλα, 1994). Ο όρος «αιθέριο έλαιο» (essential oil), χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Paracelsus von Hohenheim τον 16^ο αιώνα για το χαρακτηρισμό του δραστικού συστατικού ενός φαρμάκου (Quinta essential) (Edris, 2007). Τα υπερσχύοντα συστατικά είναι δυνατόν να αποτελούν το 85% της συνολικής συγκέντρωσης του ελαίου, ενώ τα υπόλοιπα εμφανίζονται ως ίχνη (Burt, 2004). Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων, 500 περίπου ενώσεις συνολικά, χωρίζονται σε δύο ομάδες, τους υδρογονάνθρακες ελαιώδους υφής και τους οξυγονωμένους υδρογονάνθρακες στερεάς υφής, που συνιστούν το ελαιοπτένιο και το στεαροπτένιο αντίστοιχα (Χαρβάλα, 1994). Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 3000 γνωστά αιθέρια έλαια από τα οποία τα 300 είναι διαδεδομένα στο εμπόριο (Prabuseenivasan και συν., 2006).

Τα αιθέρια έλαια είναι εύφλεκτα, ελαιώδη και πτητικά υγρά. Το ειδικό τους βάρος είναι συνήθως μικρότερο από 1 και έχουν ισχυρό δείκτη διάθλασης και στροφική ικανότητα. Έχουν αυξημένη διαλυτότητα σε λιπόφιλους διαλύτες και λιπαρά έλαια και ελάχιστη στο νερό. Όταν είναι καθαρά είναι άχρωα έως υποκίτρινα με κάποιες εξαιρέσεις, όπως εκείνα που περιέχουν αζουλένιο είναι μπλε. Σε μακροχρόνια παραμονή υφίστανται αλλοιώσεις του χρώματος και της οσμής και ρητινοποίηση, εξαιτίας των αυτοοξειδώσεων, του πολυμερισμού



και της υδρόλυσης εστέρων. Επηρεάζονται από την υγρασία, τη θερμότητα, το φως και τον όξινο αέρα, εκείνα με υψηλή περιεκτικότητα σε ακόρεστα τερπένια υφίστανται αυτοοξειδώσεις, ενώ η φύλαξή τους πρέπει να γίνεται σε μικρά, γεμάτα, ερμητικά κλεισμένα και προστατευμένα από το φως και τη θερμότητα δοχεία (Χαρβάλα, 1994).

A.6.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Η παραγωγή των αιθέριων ελαίων από τα φυτά γίνεται με διάφορες μεθόδους όπως απόσταξη, ζύμωση, έκθλιψη, εκχύλιση, υδρόλυση και αερισμό, αλλά η πιο συχνή μέθοδος είναι η απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation) (Χαρβάλα, 1994, Burt, 2004, Prabuseenivasan και συν., 2006). Τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό είναι άνθη, κάλυκες, σπόροι, φύλλα, κλαδιά, ρίζες, φλοιώδη και ξυλώδη τμήματα (Prabuseenivasan και συν., 2006). Η απομόνωση των επιμέρους συστατικών επιτυγχάνεται με χρωματογραφικές μεθόδους, κυρίως με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματογράφο μάζας (GC-MS) (Burt, 2004).

Η απόσταξη ως μέθοδος παραλαβής αιθέριων ελαίων πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τους Αιγύπτιους, Ινδούς και Πέρσες πολύ πριν από δύο χιλιετίδες και βελτιώθηκε από τους Άραβες τον 9^ο μ.Χ. αιώνα. Η πρώτη αυθεντική γραπτή περιγραφή της μεθόδου αποδίδεται στο Villanova, Καταλανό γιατρό του 13^{ου} αιώνα (Burt, 2004).

Η χρωματογραφία αποτελεί σημαντική μέθοδο διαχωρισμού και απομόνωσης οργανικών ενώσεων από μείγμα αυτών και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον βοτανολόγο Tswett (1903) για το διαχωρισμό μείγματος φυτικών χρωστικών μετά από εκχύλιση φύλλων (Αρσένη και συν., 1991, Δεμέτζος και συν., 1996). Πρόκειται για σύστημα δύο φάσεων, μιας σταθερής και μιας κινητής. Η αέριος χρωματογραφία είναι μέθοδος κατανομής αερίου-υγρού και εφαρμόζεται για το διαχωρισμό πτητικών αερίων και πτητικών υγρών και στερεών (Δεμέτζος και συν., 1996). Το αναλυόμενο δείγμα διοχετεύεται σε ρεύμα αερίου και το μείγμα διέρχεται μέσω ειδικής στήλης. Η ανάλυση γίνεται είτε με προσρόφηση επάνω στην επιφάνεια της σταθερής φάσης, είτε με κατανομή τους ανάμεσα στην αέρια κινητή φάση και στην υγρή σταθερή φάση που είναι εμποτισμένη πάνω σε ένα αδρανές στερεό υπόστρωμα (Αρσένη και συν., 1991). Εκτός της GC-MS χρησιμοποιούνται επίσης η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η οποία αποτελεί μέθοδο αναφοράς στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, είναι ταχεία και οικονομική (Pothier και συν., 2001) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Anthony και συν., 2005, Gurib-Fakim, 2006).



A.6.2. ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Η σύσταση των αιθέριων ελαίων εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η εποχή και η ώρα της ημέρας που συλλέγεται το φυτό, η σύσταση του εδάφους και οι μέθοδοι καλλιέργειας, η διαδικασία διύγρανσης, οι συνθήκες αποθήκευσης έως την παραγωγή του ελαίου, η μέθοδος παραλαβής και ανάλυσης των επιμέρους συστατικών (Marotti και συν., 1994, Daferera και συν., 2000, Burt και Reinders, 2003, Suhr και Nielsen, 2003, Smith και συν., 2005). Είναι δυνατόν επίσης να υπάρχει ουσιαστική διαφορά στη σύσταση όταν η παραλαβή γίνεται από διαφορετικά μέρη του ίδιου φυτού. Για παράδειγμα το αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται από τους σπόρους του κοριάνδρου (*Coriandrum sativum* L.), έχει απολύτως διαφορετική σύσταση από το αντίστοιχο που λαμβάνεται από τα ανώριμα φύλλα του ίδιου φυτού (Delaquis και συν., 2002).

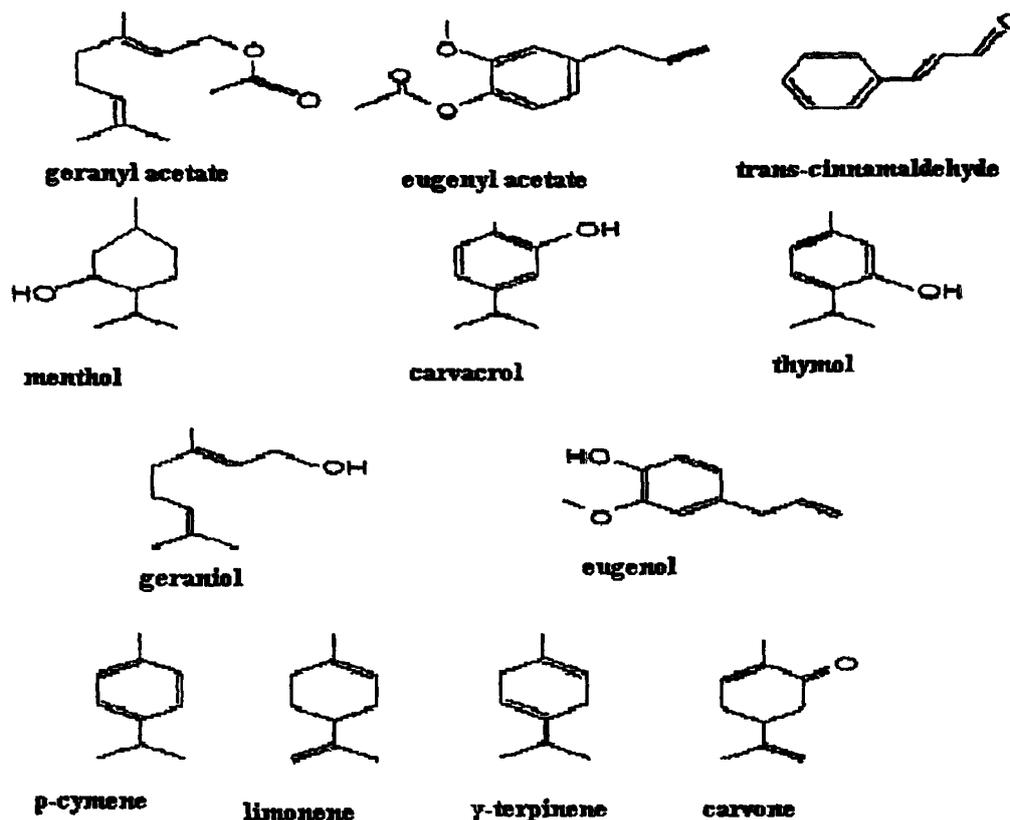
Οι ομάδες των χημικών ουσιών στις οποίες ανήκουν τα συστατικά των αιθέριων ελαίων περιλαμβάνουν υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, φαινόλες, φαινολαιθέρες, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, λακτόνες και οξείδια (Σχήμα 4) (Χαρβάλα, 1994, Burt, 2004, Rota και συν., 2004, Smith και συν., 2005).

Οι υδρογονάνθρακες είναι αλειφατικοί, αρωματικοί και αλκυκλικοί, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το ο-κυμένιο (*Ocimum basilicum*), το παρακυμένιο (αιθέρια έλαια θυμαριού, ρίγανης) και τα τερπένια αντίστοιχα. Τα τελευταία, μονοκυκλικά ή δικυκλικά, απαντώνται ως βασικά ή επιμέρους συστατικά σε διάφορα αιθέρια έλαια, είναι υπεύθυνα για τις θεραπευτικές, εδεσματολογικές και αρωματικές ιδιότητες των ελαίων (Dorman και Deans, 2000) και τέτοια είναι το λιμονένιο, τα τερπινένια, τα πινένια, τα διτερπένια (C_{20}), τα σεσκιτερπένια (C_{15}) (εδώ ανήκουν και τα παράγωγα αζουλενίου, όπως το χαμαζουλένιο που απαντά στο χαμομήλι) (Χαρβάλα, 1994).

Οι αλκοόλες είναι τα σταθερότερα οξυγονωμένα παράγωγα και διακρίνονται σε αλειφατικές (λιναλοόλη, συστατικό των αιθέριων ελαίων βασιλικού και λεβάντας), αρωματικές και αλκυκλικές (μινθόλη, πιπεριτόλη, τερπινεόλη, βορνεόλη, κεδρόλη). Δύο φαινόλες με μεγάλη σημασία και ισχυρή αντιμικροβιακή δράση είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη, συστατικά των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και του θυμαριού (Valero και Salmeron, 2003) ενώ σε άλλα έλαια ανιχνεύονται η ανηθόλη, η ευγενόλη και η π-κρεσόλη (Χαρβάλα, 1994).



Σχήμα 4: Δομές βασικών συστατικών αιθέριων ελαίων (Burt, 2004)



Άλλες ενώσεις με μικρότερη ή μεγαλύτερη σημασία που απαντούν στα αιθέρια έλαια είναι οι κιτρονελλάλη, κιτράλη, βενζαλδεΰδη, κινναμαλδεΰδη, βανιλίνη (αλδεΰδες), πιπεριτόνη, μινθόνη (κετόνες), κουμαρίνη, μπεργκαπτόλη (λακτόνες), κινεόλη, ασκαριδόλη (οξειδία), εστέρες αρωματικών και αλειφατικών οξέων (Χαρβάλα, 1994).

Οι δυνατότητες που προκύπτουν από τις αναλυτικές μεθόδους ταυτοποίησης των επιμέρους συστατικών των ελαίων, επιτρέπουν την ανίχνευση συστατικών εκατοστιαίας περιεκτικότητας 0,01%, ωστόσο ένα ποσοστό συνήθως μικρότερο του 5% της συνολικής συγκέντρωσης δεν ταυτοποιείται (Smith και συν., 2005).

A.6.3. ΔΡΑΣΗ-ΧΡΗΣΕΙΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

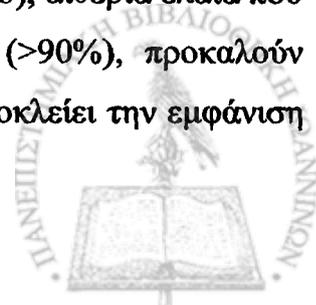
Στα φυτά τα αιθέρια έλαια έχουν εντομοαπωθητικό ρόλο, ενώ άλλες φορές προσελκύνουν έντομα προκειμένου να γίνει γονιμοποίηση. Επίσης χρησιμεύουν για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων προϊόντων μεταβολισμού και ως διαλυτικά μέσα ρητινών σε τραυματισμό του φυτού (Χαρβάλα, 1994).



Η χρήση τους από τον άνθρωπο είναι ευρεία και καλύπτει τους τομείς της κοσμετολογίας, αρωματοποιίας, βιομηχανίας τροφίμων, ποτοποιίας, φαρμακευτικής και ιατρικής (Hayes και Markovic, 2002). Έτσι τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ως συστατικά σε καλλυντικά, αρώματα, προϊόντα περιποίησης σώματος και μαλλιών, αλλά και σε προϊόντα καθαρισμού επιφανειών και αποσμητικά χώρων (Aburjai και Natsheh, 2003). Εμφανίζουν επίσης ευρεία χρήση ως στοματικά αντισηπτικά διαλύματα και οδοντόκρεμες, εξαιτίας της δράσης έναντι βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας (Wallace, 2004), όπως ο *Streptococcus mutans*, υπεύθυνων για τη δημιουργία οδοντικής πλάκας, δυσσομίας του στόματος, ουλίτιδας και τερηδόνας (Seymour, 2003).

Η αρωματοθεραπεία, που αποτέλεσε από την αρχαιότητα θεραπευτική πρακτική σε λαούς όπως οι Αιγύπτιοι και οι Ινδοί, είναι και σήμερα ευρέως διαδεδομένη και μάλιστα υπό την εποπτεία επίσημων φορέων, όπως το Συμβούλιο των Οργανισμών Αρωματοθεραπείας στο Ηνωμένο Βασίλειο (Aromatherapy Organizations Council). Στηρίζεται στη χρήση των αιθέριων ελαίων που μέσω της δυνατότητάς τους να απορροφώνται εύκολα από το δέρμα, χρησιμοποιούνται για την ανακούφιση συμπτωμάτων σε αλλεργικές και ρευματικές νόσους, εμφανίζοντας αντιγηραντική, αναζωογονητική ή και αντιφλεγμονώδη δράση, ωστόσο η αποτελεσματικότητα της μεθόδου τίθεται πολλές φορές υπό αμφισβήτηση από τον επίσημο ιατρικό κόσμο (Cooke και Ernst, 2000, Cox και συν., 2000, Maguyama και συν., 2005). Σε μελέτες έχει αποδειχθεί ότι έλαια όπως της λεβάντας (lavender oil) και του τεϊόδενδρου (tea tree oil) ανακουφίζουν από αλλεργικά συμπτώματα αναστέλλοντας την απελευθέρωση ισταμίνης και την παραγωγή κυτταροκινών *in vitro* και *in vivo* (Maguyama και συν., 2005), ενώ άλλα έχουν προστατευτικό ρόλο ή δρουν ως τοπικά αντισηπτικά π.χ το αιθέριο έλαιο του τεϊόδενδρου (Cox και συν., 2000).

Τα αιθέρια έλαια σε υπερδοσολογία είναι δυνατόν να προκαλέσουν τοπικές (δερματικές εκδηλώσεις) ή συστηματικές διαταραχές (δηλητηριάσεις). Χρόνιες μελέτες σχετικά με πιθανή καρκινογόνο δράση περισσότερων των 30 βασικών δομικών συστατικών των αιθέριων ελαίων σε πειραματόζωα, έδειξαν ότι παρά τις μεγάλες χορηγούμενες δόσεις δεν υπήρξαν φαινόμενα καρκινογένεσης, ενώ η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου σχετίστηκε με το είδος και το φύλο του πειραματόζωου, την οδό χορήγησης και το όργανο στόχο. Ωστόσο ουσίες όπως η εστραγόλη και η μεθυλοευγενόλη, συστατικά του αιθέριου ελαίου του βασιλικού, έχουν ενοχοποιηθεί για καρκινογένεση (Schulz και συν., 2003b), αιθέρια έλαια που περιέχουν κιτράλη (citral), π.χ το έλαιο του *Backhousia citriodora* (>90%), προκαλούν δερματικό ερεθισμό (Wilkinson και Cavanagh, 2005), ενώ κανείς δεν αποκλείει την εμφάνιση



τέτοιων εκδηλώσεων και από άλλα συστατικά που δεν έχουν μελετηθεί ακόμη και που είναι δυνατόν να χορηγούνται σε υψηλές δόσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα (Smith και συν., 2005).

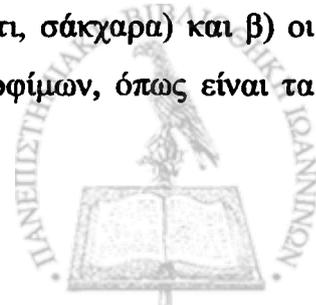
Οδηγίες για τη σωστή χρήση των αιθέριων ελαίων δίνονται από πολλούς διεθνείς οργανισμούς: Flavour and Extract Manufacturers Association (FEMA), British Essence Manufacturers Association (BEMA), International Organization of Flavour Industries (IOFI), Research Institute for Fragrance Materials (RIFM), International Fragrance Association (IFRA), International Federation of Essential Oils and Aroma Trades (IFEAT), British Essential Oil Association (BEOA). Τέλος ο International Standards Organization (ISO), έχει θεσπίσει κανόνες σωστής διαχείρισης των ελαίων που περιλαμβάνουν και προδιαγραφές συσκευασίας, τυποποίησης και εμπορίας των προϊόντων (Aburjai και Natsheh, 2003).

A.6.4. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Ένας από τους κύριους στόχους του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), των Ηνωμένων Εθνών (UN) και του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), είναι η εξασφάλιση θρεπτικών και ασφαλών τροφίμων, στόχος που εξακολουθεί να αποτελεί έναν από τους κύριους σκοπούς της Βιομηχανίας Τροφίμων. Η βιομηχανική επεξεργασία και συντήρηση των τροφίμων ξεκίνησε στο τέλος της δεκαετίας του 1800 και από τη δεκαετία του 1950 μέχρι σήμερα η χρήση χημικών μεθόδων τείνει να αντικαταστήσει τις φυσικές μεθόδους συντήρησης, ενώ μόλις τώρα αναπτύσσονται και οι αρκετά υποσχόμενες βιολογικές μέθοδοι (Παπαδοπούλου, 2006).

Με δεδομένο ότι οι παραδοσιακές μέθοδοι συντήρησης (αλάτιση, κάπνιση, ξήρανση) δεν επαρκούν να εγγυηθούν την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων τη σύγχρονη εποχή, εναλλακτικές μέθοδοι όπως η τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified Atmosphere Packaging) (Lopez και συν., 2005, Matan και συν., 2006), το παλλόμενο φως, τα ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία, η βιολογική συντήρηση και η ακτινοβολήση (Gould, 2001, Lopez και συν., 2005), χρησιμοποιούνται επιπλέον των συμβατικών μεθόδων της αφυδάτωσης, ζύμωσης, θερμικής επεξεργασίας, κατάψυξης, χημικής επεξεργασίας και της προσθήκης συντηρητικών (Παπαδοπούλου, 2006).

Τα συντηρητικά είναι χημικές ενώσεις οι οποίες όταν βρίσκονται στα τρόφιμα σε πολύ μικρή συγκέντρωση, έχουν αντιμικροβιακή ή μικροβιοστατική δράση και εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες: α) τα κοινά ή φυσικά συστατικά των τροφίμων (π.χ. αλάτι, σάκχαρα) και β) οι ειδικές ουσίες που εμποδίζουν ή αναστέλλουν την αλλοίωση των τροφίμων, όπως είναι τα



προσθετικά και οι ουσίες που παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων (Παπαδοπούλου, 2006).

Οι φυσικές και οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά περιλαμβάνουν τα αιθέρια έλαια φυτών, το ένζυμο λακτοπεροξειδάση του γάλακτος, την αντιμικροβιακή ουσία αλλισίνη, που παράγεται από τα σκόρδα και τα κρεμμύδια, φαινολικές ουσίες (υδροκινόνη, τανίνες, κρεζόλες, υδροξυκιμινικά οξέα, φλαβονοειδή κ.ά.) που υπάρχουν σε φρούτα και σε λαχανικά και πολλές άλλες ουσίες (Παπαδοπούλου, 2006). Παραδείγματα αποτελούν η φαινολική ουσία καρβακρόλη, βασικό συστατικό των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και του θυμαριού, η οποία παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση και χρησιμοποιείται ως προσθετικό σε αρτοπαρασκευάσματα, γλυκά και ποτά (Kisko και Roller, 2005) και η κινναμαλδεΐδη με αντίστοιχη δράση και χρήση που αποτελεί συστατικό του αιθέριου ελαίου της κανέλας (Chang και συν., 2001). Άλλωστε οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών ουσιών και των ελαίων τους στα τρόφιμα είναι γνωστές από το παρελθόν, με τα πρώτα δημοσιεύματα το 1880 να περιγράφουν τις ιδιότητες της μουστάρδας, του γαρύφαλλου, της κανέλας και των ελαίων τους (Shelef, 1983).

Τα περισσότερα αιθέρια έλαια έχουν χαρακτηριστεί διεθνώς από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α (U.S. Food and Drug Administration) ως «Γενικώς Αναγνωρισμένα Ασφαλή Συστατικά» (Generally Regarded as Safe, GRAS) (21 CFR Sec. 182.10, 182.20, 482.40, 182.50), κατατάσσονται στα φυσικά προϊόντα και μπορούν να χρησιμοποιούνται από τους καταναλωτές με ασφάλεια (Lambert και συν., 2001, Aburjai και Natsheh, 2003, Guynot και συν., 2003, Ponce και συν., 2003, Moreira και συν., 2005, Preuss και συν., 2005, Smith και συν., 2005, Si και συν., 2006). Θεωρούνται ως «φυσικά εναλλακτικά» των χημικών συντηρητικών και η χρήση τους στα τρόφιμα συναντά τις καταναλωτικές απαιτήσεις για ήπια ή φυσικά προϊόντα (Moreira και συν., 2005), ενώ τα περισσότερα από τα 100 περίπου που χρησιμοποιούνται ως αρωματικά προσθετικά προέρχονται από τα ίδια τα τρόφιμα, όπως τα έλαια του βασιλικού, του λεμονιού, του κάρδαμου κ.ά. (Smith και συν., 2005). Ωστόσο η πρακτική εφαρμογή τους περιορίζεται εξαιτίας των αρωματικών χαρακτηριστικών τους (Chorianopoulos και συν., 2006), καθώς οι αποτελεσματικά αντιμικροβιακές συγκεντρώσεις υπερβαίνουν συνήθως τα όρια της οργανοληπτικής αποδοχής, δηλαδή έχουν έντονη οσμή ή/και γεύση (Smith-Palmer και συν., 1998, Lambert και συν., 2001), αλλά και από το γεγονός ότι η δράση τους μετριάζεται λόγω αλληλεπίδρασης με τα συστατικά των τροφίμων (Skandamis και Nychas, 2001). Οδηγίες σχετικά με τα όρια στη χημική σύσταση των ελαίων που χρησιμοποιούνται ως αρωματικά



προσθετικά καταγράφονται στο Food Chemical Codex (FCC, 4th Ed., 1996) (Smith και συν., 2005).

Στα τρόφιμα απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση ελαίου σε σχέση με τα *in vitro* πειράματα για την επίτευξη του ίδιου αποτελέσματος σε ό,τι αφορά την αντιμικροβιακή δράση (Smith-Palmer και συν., 1998, Gould, 2001, Burt, 2004) και αυτό γιατί η βακτηριακή ευαισθησία επηρεάζεται από τα εγγενή συστατικά ενός τροφίμου (λίπος, περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, νερό, αντιοξειδωτικά, συντηρητικά, pH, αλάτι και άλλα προσθετικά) και εξωγενή χαρακτηριστικά (θερμοκρασία, είδος μικροοργανισμού, συσκευασία) (Burt, 2004).

Μοντέλα τροφίμων στα οποία έχει δοκιμασθεί η δραστηριότητα των αιθέριων ελαίων έναντι μικροβίων που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα, όπως *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Photobacterium phosphoreum*, είναι η ταραμοσαλάτα, το ημιαποβουτυρωμένο γάλα, η μοτσαρέλα και άλλα μαλακά τυριά, το γιαούρτι και το τζατζίκι, το πατέ, η μελιτζανοσαλάτα, τα φιλέτα ψαριών και κρέατος, ο κιμάς, το μαγειρεμένο χοιρινό και κοτόπουλο, τα συσκευασμένα τρόφιμα σε κενό ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, το ρύζι, τα φρούτα, οι χυμοί και τα λαχανικά (Koutsoumanis και συν., 1999, Tsigarida και συν., 2000, Menon και Garg, 2001, Gill και συν., 2002, Mejlholm και Dalgaard, 2002, Valero και Salmeron, 2003, Burt, 2004, Friedman και συν., 2004, Lin και συν., 2004).

Σε μελέτες που περιλάμβαναν έως και 52 αιθέρια έλαια και τα βασικά τους συστατικά έναντι ευρέος φάσματος μικροοργανισμών που σε κάποιες εργασίες έφθασαν τους 25, αποδείχθηκε ότι τα αιθέρια έλαια γαρύφαλλου, κανέλας, λεμονόχορτου, σκόρδου, ρίγανης, δάφνης και θυμαριού εμφάνισαν αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση έναντι βακτηρίων και μυκήτων που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα (Suhr και Nielsen, 2003).

Γενικά τα αιθέρια έλαια που παρουσιάζουν την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών, όπως θυμόλη, καρβακρόλη και ευγενόλη (Burt, 2004), ενώ οι χαμηλές βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις αρκετών από αυτά, ενισχύουν τη δυνατότητα χρήσης τους στη βιομηχανία τροφίμων (Smith-Palmer και συν., 1998).

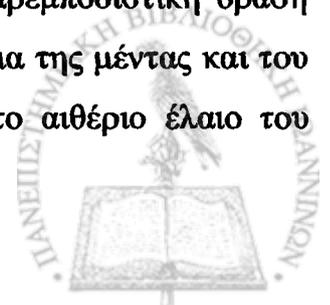


A.6.5. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων, έναντι κυρίως παθογόνων που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα. Η δράση αυτή είναι συνυφασμένη με την ύπαρξη επιμέρους βασικών συστατικών όπως οι ισομερείς φαινόλες καρβακρόλη και θυμόλη που εμπεριέχονται στα αιθέρια έλαια ρίγανης και θυμαριού, η αλλισίνη στο αντίστοιχο του σκόρδου, η κινναμαλδεΐδη (αιθέριο έλαιο κανέλας) και η ευγενόλη (αιθέρια έλαια κανέλας και γαρύφαλλου) (Tassou και συν., 2000, Delaquis και συν., 2002, Valero και Salmeron, 2003, Gill και Holley, 2004). Η αντιμικροβιακή δράση για παράδειγμα της θυμόλης την έχει αναδείξει σε βασικό συστατικό στοματικών διαλυμάτων, ενώ η ευγενόλη χρησιμοποιείται ευρέως στην οδοντιατρική (Walsh και συν., 2003). Η καρβακρόλη παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων, μυκήτων, ιών και παρασίτων (Veldhuizen και συν., 2006). Αρκετές μελέτες έχουν γίνει με επιμέρους δομικά συστατικά ελαίων έναντι βακτηρίων, όπως αυτή των Yamazaki και συν. (2004), στην οποία η καρβακρόλη παρουσίασε την ισχυρότερη δράση έναντι της *L. monocytogenes*, ακολουθούμενη κατά σειρά ισχύος από τη θυμόλη, την ευγενόλη, την κινναμαλδεΐδη και την ισοευγενόλη, ενώ η λιναλοόλη ήταν ανενεργής. Σε αντίστοιχες μελέτες η καρβακρόλη έδρασε παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των *Pseudomonas fluorescens*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, ακολουθούμενη σε ισχύ από την ευγενόλη και τη μινθόλη (Arfa και συν., 2006) και έναντι του *B. cereus* (Ultee και συν., 1998), ενώ η κινναμαλδεΐδη και η ευγενόλη ανέστειλαν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε μελέτη των Gill και Holley (2004) και η καρβακρόλη και η θυμόλη ήταν περισσότερο δραστικές σε σχέση με την ευγενόλη, τη γερανιόλη και την κιτράλη στην αναστολή ανάπτυξης της *S. typhimurium* (Nazer και συν., 2005).

Γενικά τα Gram (+) βακτήρια και οι μύκητες εμφανίζονται περισσότερο ευαίσθητα στη δράση των αιθέριων ελαίων σε σχέση με τα Gram (-) βακτήρια (Shelef, 1983, Cosentino και συν., 1999, Tassou και συν., 2000, Marino και συν., 2001, Rabanal και συν., 2002, Chorianoopoulos και συν., 2004), γεγονός που αποδίδεται πιθανόν στην παρουσία εξωτερικής μεμβράνης των τελευταίων, η οποία προσδίδει στη βακτηριακή επιφάνεια ισχυρό υδρόφιλο χαρακτήρα και λειτουργεί παρεμποδιστικά ως προς τη διαπερατότητα (Smith-Palmer και συν., 1998, Burt, 2004).

Τα αιθέρια έλαια της ρίγανης και του θυμαριού εμφάνισαν παρεμποδιστική δράση έναντι του στελέχους *E. coli* O157:H7 και ακολούθησαν σε ισχύ τα έλαια της μέντας και του γαρύφαλλου (Burt και Reinders, 2003), ενώ σε αντίστοιχη εργασία το αιθέριο έλαιο του



γαρύφαλλου ήταν το ισχυρότερο από συνολικά 10 που εξετάστηκαν έναντι της *E. coli* O157:H7 ακολουθούμενο σε ισχύ από τα έλαια του τεϊόδενδρου και του ευκάλυπτου, καθώς το έλαιο της ρίγανης είχε ασθενή δράση. Οι διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ διαφορετικών μελετών αποδόθηκαν στην ετερογένεια των μειγμάτων που αποτελούν τα αιθέρια έλαια, στις ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές των συστατικών τους, στις συνθήκες ανάπτυξης των φυτών και της παραλαβής των ελαίων (Moreira και συν., 2005).

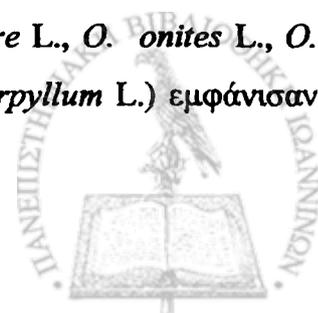
Σε άλλη μελέτη το έλαιο της μέντας ήταν δραστικό έναντι των παθογόνων βακτηρίων *S. enteritidis* και *S. aureus* που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα (Tassou και συν., 2000), ενώ μεταξύ 11 αιθέριων ελαίων που εξετάστηκαν έναντι του *B. cereus*, αυτό της κανέλας παρουσίασε την ισχυρότερη δράση και ακολούθησαν τα έλαια της ρίγανης και του θυμαριού (Valero και Salmeron, 2003).

Σε μελέτη που περιελάμβανε 21 αιθέρια έλαια και πέντε βασικά παθογόνα βακτήρια, αποδείχθηκε πως τα έλαια δάφνης, κανέλας, γαρύφαλλου και θυμαριού είχαν την ισχυρότερη βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση έναντι των *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* και *S. aureus* (Smith-Palmer και συν., 1998).

Σε άλλη μελέτη που περιελάμβανε 45 αιθέρια έλαια από 13 αρωματικά φυτά και επτά παθογόνα βακτήρια που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα, αποδείχθηκε ότι τα έλαια των *Satureja montana* και *Thymus vulgaris* με κύρια συστατικά την καρβακρόλη το πρώτο, και καρβακρόλη και θυμόλη το δεύτερο, εμφάνισαν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση κυρίως κατά των Gram (+) *L. monocytogenes* και *S. aureus* και ακολούθως κατά των Gram (-) *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* και *Shigella flexneri* (Rota και συν., 2004).

Το αιθέριο έλαιο του *Satureja spinosa*, που περιέχει ως βασικά του συστατικά θυμόλη και καρβακρόλη, εμφάνισε αντιβακτηριακή δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, ενώ ασθενέστερη ήταν η δράση του έναντι της *S. enteritidis* (Chorianopoulos και συν., 2006) και σε αντίστοιχη μελέτη με την προσθήκη όμως και των ελαίων της ρίγανης (*Origanum vulgare*) και του θυμαριού (*Thymus vulgaris*), το έλαιο του *Satureja spinosa* εμφάνισε υψηλότερη ή ισοδύναμη ισχύ με τα προαναφερόμενα, έναντι των ίδιων παθογόνων, ενώ τα Gram (-) εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τα Gram (+) βακτήρια (Chorianopoulos και συν., 2004).

Τα αιθέρια έλαια τριών ειδών του γένους *Origanum* (*O. vulgare* L., *O. onites* L., *O. majorana* L.) και δύο ειδών του γένους *Thymus* (*T. vulgaris* L., *T. serpyllum* L.) εμφάνισαν



ανασταλτική δράση έναντι τεσσάρων πρότυπων στελεχών *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* και *Y. enterocolitica* (Sagdic, 2003), ενώ από 10 συνολικά αιθέρια έλαια που εξετάστηκαν έναντι τεσσάρων στελεχών *E. coli* (δύο πρότυπα), το αιθέριο έλαιο του γαρύφαλλου παρουσίασε την ισχυρότερη δράση και ακολούθησαν τα αντίστοιχα των τειόδενδρου, δενδρολίβανου, ευκάλυπτου και μέντας, ενώ ασθενέστερα έδρασαν τα έλαια της ρίγανης και του θυμαριού (Moreira και συν., 2005).

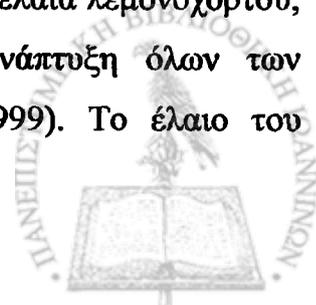
Από τρία αιθέρια έλαια του γένους *Eucalyptus* που εξετάστηκαν έναντι πρότυπων στελεχών *E. coli* και *S. aureus*, το έλαιο του *E. robusta* παρουσίασε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση, αποτέλεσμα που αποδίδεται στην ύπαρξη μονοτερπενίων στη δομή του (Sartorelli και συν., 2007).

Τα αιθέρια έλαια οκτώ ελληνικών ειδών του γένους *Stachys* με υψηλή περιεκτικότητα σε σεσκιτερπένια εμφάνισαν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη πρότυπων στελεχών *B. subtilis*, *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis* και ενός κλινικού βακτηριακού στελέχους *B. cereus*, με εξαίρεση ένα πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* που εμφανίστηκε ανθεκτικό (Skaltsa και συν., 2003), ενώ από τα τρία ελληνικά είδη του γένους *Paeonia* που δοκιμάστηκαν έναντι πρότυπων βακτηριακών στελεχών *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* και *P. aeruginosa*, το αιθέριο έλαιο του *P. clusii* εμφανίστηκε δραστικότερο και η *P. aeruginosa* ήταν και πάλι ανθεκτική (Papandreou και συν., 2002).

Σε άλλη μελέτη στην οποία δοκιμάστηκαν τρία αιθέρια έλαια ειδών του γένους *Thymus* με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά έναντι πρότυπων και βακτηριακών στελεχών που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα, το αποτέλεσμα έδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση των ελαίων έναντι των συγκεκριμένων στελεχών (Cosentino και συν., 1999).

Το αιθέριο έλαιο του *Achillea millefolium* εμφάνισε μόλις μέτρια αντιμικροβιακή ισχύ έναντι των *S. pneumoniae* και *Clostridium perfringens* από τα συνολικά 12 πρότυπα βακτηριακά στελέχη στα οποία μελετήθηκε η δράση του (Candan και συν., 2003), ενώ το έλαιο του *Chrysanthemum indicum* της οικογένειας των Συνθέτων παρουσίασε αξιόλογη ανασταλτική δράση έναντι πέντε πρότυπων και επτά κλινικών Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων (Shunying και συν., 2005).

Από 52 αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν έναντι εννέα Gram (+) και Gram (-) πρότυπων στελεχών βακτηρίων (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *Aeromonas sobria*, *E. faecalis*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*), τα έλαια λεμονόχορτου, ρίγανης και μέντας ήταν τα δραστικότερα, αναστέλλοντας την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών σε συγκέντρωση $\leq 2\%$ (v/v) (Hammer και συν., 1999). Το έλαιο του



λεμονόχορτου (*Cymbopogon citratus*) ήταν και το δραστικότερο από συνολικά 13 εξεταζόμενα αιθέρια έλαια στην *in vitro* αναστολή της ανάπτυξης του *Helicobacter pylori* σε μελέτη των Ohno και συν. (2003).

Το αιθέριο έλαιο του *Ocimum micranthum*, πλούσιο σε ευγενόλη, παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση έναντι των *E. faecalis*, *P. aeruginosa* και *E. coli*, ισχυρότερη από την αντίστοιχη του *O. basilicum* (χημειότυπος λιναλοόλης) και ισοδύναμη με του *T. vulgaris* (χημειότυπος θυμόλης) (Sacchetti και συν., 2004).

Το αιθέριο έλαιο του *Origanum scabrum*, με υψηλή περιεκτικότητα σε καρβακρόλη, ήταν δραστικό έναντι πρότυπων στελεχών *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* και *K. pneumoniae*, το αντίστοιχο του *O. acutidens* επίσης πλούσιο σε καρβακρόλη ήταν δραστικό στα 27 από τα 35 εξεταζόμενα βακτήρια (Sokmen και συν., 2004), το *O. syriacum*, με βασικά συστατικά καρβακρόλη, π-κυμένιο και γ-τερπινένιο, ανέστειλε την ανάπτυξη όλων των βακτηρίων που εξετάστηκαν (Alma και συν., 2003), ενώ το *O. microrhylum*, που υπολείπεται σε φαινολικά συστατικά, παρουσίασε ασθενέστερη δράση και μάλιστα ήταν εντελώς ανενεργό έναντι των *P. aeruginosa* και *K. pneumoniae* (Aligiannis και συν., 2001). Η *P. aeruginosa* ήταν επίσης ανθεκτική και σε συνολικά 18 αιθέρια έλαια φυτών της αυστραλέζικης χλωρίδας, στην πλειοψηφία τους του γένους *Melaleuca* (Wilkinson και Cavanagh, 2005).

Το αιθέριο έλαιο του είδους *Lantana achyranhifolia* που απαντά στην Αμερική, αποτελούμενο από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια, επέδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των *Vibrio cholerae*, *Shigella boydii* και *Y. enterocolitica* σε μελέτη των Hernandez και συν. (2005).

Αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση επέδειξαν και τέσσερα αιθέρια έλαια προερχόμενα από το γένος *Melaleuca* (*M. ericifolia*, *M. leucadendron*, *M. styphelioides* και *M. armillaris*) που εξετάστηκαν έναντι των στελεχών *B. subtilis* και *E. coli* (Farag και συν., 2004), ενώ το αιθέριο έλαιο του τειόδενδρου (ΤΤΟ, *Melaleuca alternifolia*) ήταν το δραστικότερο έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών *S. aureus*, συγκρινόμενο με τα έλαια γεράνιου, λεβάντας και πατσουλί (Edward-Jones και συν., 2004). Ωστόσο οι Hayes και Markovic (2002) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το ΤΤΟ υπολείπεται σε δραστικότητα σε σχέση με το έλαιο του *Backhousia citriodora* όταν εξετάστηκαν από κοινού έναντι στελεχών *S. aureus*, MRSA, *Propionibacterium acnes*, *P. aeruginosa* και *K. pneumoniae*.



Σε άλλη μελέτη που περιελάμβανε πέντε αιθέρια έλαια και 15 Gram (+) και Gram (-) βακτήρια, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης παρουσίασε ισχυρή βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση, ενώ τα έλαια φασκομηλιάς, μέντας, χαμομηλιού και ήσσωπου εμφάνισαν ασθενέστερη, αποκλειστικά βακτηριοστατική, δράση (Marino και συν., 2001).

Τα έλαια της ρίγανης (*Origanum vulgare*) και του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) εμφάνισαν βακτηριοστατική δράση έναντι πέντε Gram (+) και οκτώ Gram (-) βακτηριακών στελεχών, ισχυρότερη της αντίστοιχης του ελαίου του βασιλικού (*Ocimum basilicum*), πιθανώς οφειλόμενη στην παρουσία μεθυλοχαβικόλης στο τελευταίο, η οποία αν και οξυγονωμένο φαινολικό μονοτερπένιο, στερείται των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων της θυμόλης και της καρβακρόλης (Bozin και συν., 2006).

Τέλος το αιθέριο έλαιο του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) παρουσίασε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του *S. epidermidis* και της *E. coli* από συνολικά εννέα αιθέρια έλαια (πορτοκαλιού, ευκάλυπτου, μάραθου, γεράνιου, κέδρου, πιπερόριζας, τερεβενθίνης, δενδρολίβανου, τεϊόδενδρου) που εξετάστηκαν από τους Schelz και συν. (2006), ενώ τα αιθέρια έλαια τριών ειδών του γένους *Hypericum* (*H. scabrum*, *H. scabroides*, *H. triquetrifolium*) παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι οκτώ στελεχών των βακτηρίων *E. coli*, *B. cereus*, *Bacillus brevis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (Kizil και συν., 2004).

A.6.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Δεν υπάρχουν πρότυπες μέθοδοι προσδιορισμού της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων, ωστόσο οι ερευνητές χρησιμοποιούν τις αντίστοιχες πρότυπες μεθόδους ελέγχου ευαισθησίας και αντοχής στα αντιβιοτικά και αντιμυκητιασικά φάρμακα τροποποιώντας αυτές ανάλογα.

Γενικά οι μέθοδοι χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: μέθοδοι διάχυσης (diffusion), αραίωσης (dilution) και βιοαυτογραφίας (bioautographic), ενώ τα αποτελέσματα εξαρτώνται από παράγοντες όπως η συγκέντρωση του ελαιώματος, η σύνθεση του ενοφθαλμισθέντος μέσου και η θερμοκρασία επώασης (Rios και συν., 1988).

Έτσι χρησιμοποιούνται μέθοδοι διάχυσης σε άγαρ με τη μορφή διαλυμάτων σε εμβυθίσματα, κυλίνδρων και εμποτισμένων δίσκων, στις οποίες μετράται η ζώνη αναστολής της μικροβιακής ανάπτυξης (Rios και συν., 1988, Suppakul και συν., 2003), καθώς και μέθοδοι αραιώσεων σε άγαρ και σε ζυμό με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής (MIC)



και της ελάχιστης μικροβιοκτόνου συγκεντρώσεως (MBC) των εξεταζόμενων αιθέριων ελαίων (Burt, 2004).

Η μέθοδος αραιώσεων σε ζωμό διακρίνεται σε μακρομέθοδο και σε μικρομέθοδο που εκτελείται σε ειδικές πλάκες μικροτιτλοποίησης και ο προσδιορισμός της MIC και της MBC μπορεί να επιτευχθεί με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optical density method) και την καταμέτρηση αποικιών σε άγαρ (viable counts) (Hammer και συν., 1996, Ponce και συν., 2003, Preuss και συν., 2005).

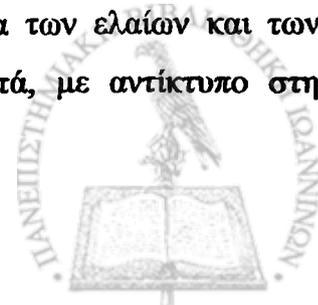
Στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, η θολερότητα του διαλύματος ελαίου και ζωμού, λαμβάνεται ως δείκτης βακτηριακής ανάπτυξης. Αυτό συμβαίνει όταν το έλαιο δεν είναι αρκετά δραστικό έναντι του εξεταζόμενου μικροοργανισμού και ο προσδιορισμός γίνεται φασματοφωτομετρικά (Rios και συν., 1988).

Τέλος η βιοαντογραφική μέθοδος είναι μία αναλυτική τεχνική κατά την οποία οι οργανικές ενώσεις διαχωρίζονται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) ή χρωματογραφία χαρτιού (PC) και στη συνέχεια μελετάται η δράση τους σε μικροοργανισμούς. Οι υπό εξέταση ουσίες μεταφέρονται κατευθείαν από τη χρωματογραφική στήλη σε τρυβλία με άγαρ στα οποία έχει ενοφθαλμισθεί ο μικροοργανισμός και μετράται η ζώνη αναστολής (Rios και συν., 1988, Nostro και συν., 2000).

Πολλές φορές εφαρμόζεται συνδυασμός κάποιων από τις παραπάνω μεθόδους προκειμένου να υπάρξουν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Έτσι σε μελέτη σύγκρισης της μικρομεθόδου αραιώσεων σε ζωμό με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα με κάποιες διαφορές που αποδόθηκαν στο μέγεθος των βακτηριακών κυττάρων, στην παρουσία κατεστραμμένων κυττάρων, καθώς και στην οξείδωση που υφίστανται τα έλαια, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι τιμές απορρόφησης (Ponce και συν., 2003).

Οι Hammer και συν. (1999) σε μελέτη 52 αιθέριων ελαίων έναντι 10 μικροοργανισμών και χρησιμοποιώντας τις μεθόδους αραιώσεως σε άγαρ και σε ζωμό, κατέληξαν σε διαφορετικά αποτελέσματα σε ό,τι αφορά τον προσδιορισμό των MIC και MBC, κάτι που αποδόθηκε σε παράγοντες όπως η ανάπτυξη του μικροοργανισμού και η έκθεση στο αιθέριο έλαιο, η διαλυτότητα του ελαίου και των συστατικών του, η χρήση και η ποιότητα γαλακτωματοποιητών.

Η χρήση διαλυτών, σταθεροποιητών (stabilizers) και γαλακτωματοποιητών (emulsifiers), προκειμένου να αυξήσουν την ήδη φτωχή διαλυτότητα των ελαίων και των συστατικών τους, εμπεριέχει τον κίνδυνο αλληλεπιδράσεων με αυτά, με αντίκτυπο στη



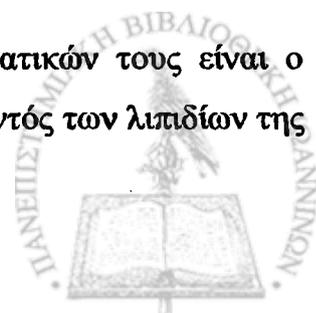
βιωσιμότητα και στην ευαισθησία των μικροοργανισμών (Holley και Patel, 2005). Επιπλέον οι γαλακτωματοποιητές βοηθούν τους αντιμικροβιακούς παράγοντες να εισχωρήσουν στο κυτταρικό τοίχωμα ή στη μεμβράνη των βακτηρίων (Suprakul και συν., 2003). Τέτοιες ενώσεις είναι οι: αιθανόλη, ακετόνη, διμεθυλο-σουλφοξίδη (dimethyl sulphoxide, DMSO), Tween 20 (polyoxyethylene 2 sorbitan monolaurate), Tween 80 (poly-sorbate 80), αλλά και το βακτηριολογικό άγαρ (bacteriological agar) (Holley και Patel, 2005). Ωστόσο όπως προκύπτει από διάφορες μελέτες, ειδικά για τα ευρέως χρησιμοποιούμενα Tween 20, Tween 80 και βακτηριολογικό άγαρ, δεν φαίνεται να επηρεάζουν άμεσα τη δράση των ελαίων, παρόλο που υπάρχουν αναφορές ακόμη και για ελάττωση της αντιμικροβιακής δράσης των ελαίων παρουσία αυτών των συστατικών (Suhk και Nielsen, 2003, Suprakul και συν., 2003).

Οι Mann και Markham (1997) ανέφεραν ότι η παρουσία 0,5% Tween 20 ή Tween 80 δεν επηρέασε τη δράση του αιθέριου ελαίου του τεϊόδενδρου, αλλά ο διαχωρισμός του ελαίου από το διαλύτη πραγματοποιήθηκε σε τρεις ώρες, σε αντίθεση με τη χρησιμοποίηση 0,15% άγαρ που δεν επέφερε διαχωρισμό για τουλάχιστον 19 ώρες, ενώ οι Oliva και συν. (2003) εξετάζοντας το ίδιο έλαιο με την προσθήκη 0,5% Tween 80, συμπέραναν ότι το τελευταίο δεν επηρέαζε την ανάπτυξη των στελεχών *Candida* που μελετούσαν. Αντίθετα οι Inouye και συν. (2001) μελετώντας την αντιμυκητιασική δράση επτά αιθέριων ελαίων, διαπίστωσαν ότι η παρουσία του Tween 80 ενίσχυε τη δράση ορισμένων από αυτά με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ και την ελάττωνε αντίστοιχα με τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό. Σε αντίστοιχη μελέτη των Burt και Reinders (2003), που χρησιμοποίησαν αιθέρια έλαια δάφνης, γαρύφαλλου, ρίγανης και θυμαριού έναντι της *E. coli* O157:H7, με μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό Mueller Hinton, η προσθήκη 0,05% άγαρ δεν προκάλεσε διαχωρισμό του ελαίου από το διαλύτη για τουλάχιστον 24 ώρες στους 37°C.

A.6.7. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Μέχρι σήμερα έχουν διατυπωθεί αρκετές θεωρίες, χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινισθεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης των αιθέριων ελαίων έναντι των μικροοργανισμών. Με δεδομένο ότι υπάρχει πληθώρα διαφορετικών χημικά δομικών συστατικών, πιστεύεται ότι η αντιμικροβιακή δράση αφορά αρκετούς κυτταρικούς στόχους και δεν είναι αποτέλεσμα ενός μόνο συγκεκριμένου μηχανισμού (Burt, 2004).

Σημαντικό χαρακτηριστικό των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους είναι ο υδρόφοβος χαρακτήρας τους, ο οποίος τους επιτρέπει να διαχωρίζονται εντός των λιπιδίων της



κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, διαταράσσοντας τις δομές και καθιστώντας αυτές περισσότερο διαπερατές. Τότε μπορεί να επισυμβεί απώλεια (διαρροή) ιόντων και άλλων κυτταρικών συστατικών και παρόλο που κάποιος βαθμός διαρροής από τα βακτηριακά κύτταρα μπορεί να γίνει ανεκτός χωρίς απώλεια βιωσιμότητας, εκτεταμένη απώλεια κυτταρικού περιεχομένου ή έξοδος σημαντικών μορίων και ιόντων οδηγεί στο θάνατο (Burt, 2004). Αυτή η απώλεια του εκλεκτικού χαρακτήρα της διαπερατότητας της μεμβράνης συχνά χαρακτηρίζεται ως αίτιο του κυτταρικού θανάτου (Holley και Pattel, 2005).

Άλλα συμβάντα που είναι δυνατόν να προκαλέσουν δυσλειτουργία της μεμβράνης περιλαμβάνουν διαταραχές στη βαθμίδωση του pH και στο ηλεκτρικό δυναμικό της αντλίας πρωτονίων (proton motive force) (Lambert και συν., 2001). Κάτι τέτοιο προκαλείται με μετατροπές στη μεταφορά ιόντων και αποπόλωση μέσω δομικών αλλαγών στη μεμβράνη αντίστοιχα (Holley και Pattel, 2005). Επίσης αλληλεπίδραση με το σύστημα παραγωγής ενέργειας (ATP) του κυττάρου, με αποτέλεσμα αυξομειώσεις στα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια επίπεδα των αποθηκών του ATP, ενδεικτικά της δράσης στη μεμβράνη (Helander και συν., 1998) και ενζυμική αναστολή που παρεμποδίζει τη χρήση υποστρώματος για παραγωγή ενέργειας (Holley και Pattel, 2005).

Γενικά τα αιθέρια έλαια που παρουσιάζουν τις ισχυρότερες αντιβακτηριακές ιδιότητες, περιέχουν υψηλό ποσοστό φαινολικών ενώσεων, όπως καρβακρόλη, ευγενόλη και θυμόλη (Dogman και Deans, 2000). Η χημική δομή των μεμονωμένων συστατικών των αιθέριων ελαίων επηρεάζει τον ακριβή τρόπο της αντιβακτηριακής τους δράσης (Burt, 2004). Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό μεταβολισμό επιτυγχάνεται με διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως διαταραχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, της αντλίας πρωτονίων (PMF), της ροής ηλεκτρονίων, της ενεργητικής μεταφοράς και πήξης των συστατικών των κυττάρων, ενώ έχει επιβεβαιωθεί και η σημασία της παρουσίας της υδροξυλομάδας στο μόριό τους και η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με ενεργά κέντρα ενζύμων (Cowan, 1999, Burt, 2004). Η σχετική θέση της υδροξυλομάδας στο φαινολικό δακτύλιο θεωρείται ότι δεν επηρεάζει την αντιμικροβιακή ισχύ των ενώσεων (Burt, 2004), αν και σε μελέτη των Dogman και Deans (2000) η καρβακρόλη και η θυμόλη εμφάνισαν διαφορετική δράση έναντι Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων. Σύμφωνα τέλος με άλλη μελέτη, η αύξηση του αριθμού των υδροξυλομάδων που περιέχονται στο μόριο των φαινολικών ενώσεων, αυξάνει αντίστοιχα και τη δράση τους (Cowan, 1999).

Μελέτες που αφορούσαν τη δράση των φαινολικών ουσιών έδειξαν ότι οι συγκεκριμένες ουσίες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση δομικών και λειτουργικών

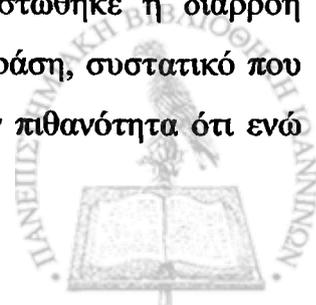


διαταραχών στην κυτταρική μεμβράνη. Η απέκκριση K^+ είναι συνήθως πρώιμο σημείο βλάβης και συχνά ακολουθείται από απέκκριση κυτταροπλασματικών συστατικών (Walsh και συν., 2003, Holley και Pattel, 2005). Έτσι έκθεση σε θυμόλη και σε καρβακρόλη προκάλεσε αποδόμηση της εξωτερικής μεμβράνης των στελεχών *E. coli* και *S. typhimurium* (Helander και συν., 1998), ενώ παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν έναντι ενός διαφορετικού στελέχους *E. coli* και της *P. aeruginosa* (Holley και Pattel, 2005). Οι μύκητες και τα Gram (+) βακτήρια δεν επέδειξαν τον ίδιο βαθμό αλλαγών στη μορφολογία του κυτταρικού τοιχώματος, κάτι που πιθανώς οφείλεται στη διαλυτότητα των λιποπολυσακχαριτών (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης των Gram (-) βακτηρίων στις φαινολικές ουσίες (Holley και Pattel, 2005).

Σε άλλη μελέτη των Ultee και συν. (2002), χρησιμοποιήθηκαν φθορίζοντες ανιχνευτές (probes) και αποδείχθηκε ότι τα αιθέρια έλαια αύξαναν τη διαπερατότητα της μεμβράνης, ενώ τα συστατικά τους καρβακρόλη και η πρόδρομή της ένωση π-κυμένιο πρακτικά διαλύονταν στο εσωτερικό της, προκαλώντας εξοίδηση και περιορισμό της λειτουργικότητας. Επίσης ο βαθμός αραίωσης αυτών των συστατικών, αν και σημαντικός, δεν σχετιζόταν με τη συνολική αντιμικροβιακή δράση, ενώ τέλος η διευκόλυνση απέκκρισης K^+ και η καταστροφή της βαθμίδωσης του pH προκαλούσαν εξάντληση των αποθεμάτων ATP και κυτταρικό θάνατο.

Ο μηχανισμός δράσης του αιθέριου ελαίου του τεϊόδενδρου (TTO) έναντι των βακτηρίων βασίζεται στην υδρογοναθρακική δομή και στη λιποφιλία του. Επειδή οι υδρογονάνθρακες εισχωρούν εκλεκτικά εντός των βιολογικών μεμβρανών και διαταράσσουν τις ζωτικές λειτουργίες τους, το TTO και τα συστατικά του πιστεύεται ότι συμπεριφέρεται κατά αυτό τον τρόπο, κάτι που προκύπτει και από τη δυνατότητά του να καθιστά διαπερατά διάφορα μοντέλα λιποσωματικών συστημάτων (Carson και συν., 2006). Μελέτες σε τέτοια συστήματα απέδειξαν ότι οι κυκλικοί τερπενικοί υδρογονάνθρακες συσσωρεύονται στη μεμβράνη, προκαλώντας διαταραχή της διαπερατότητάς της και παρεμπόδιση του μηχανισμού μετακίνησης των πρωτονίων (PMF) (Sikkema και συν., 1995). Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις από μελέτες με TTO ότι ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να επισυμβεί πριν τη λύση του κυττάρου (Burt, 2004). Μελέτη με TTO έναντι *S. aureus*, *E. coli* και *Candida albicans* έδειξε ότι το έλαιο ανέστειλε την οξειδωτική φωσφορυλίωση και προήγαγε την εξοίδηση και την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης (Cox και συν., 2000).

Όταν εξετάσθηκε η δράση της τερπινεν-4-όλης και της 1,8-κινεόλης στο *S. aureus*, καμία δεν βρέθηκε ότι «επάγει» την αυτόλυση, ενώ αντίθετα διαπιστώθηκε η διαρροή κυτταροπλασματικού υλικού. Η 1,8-κινεόλη εμφάνισε την εντονότερη δράση, συστατικό που συχνά θεωρείται ότι έχει οριακή αντιμικροβιακή ισχύ. Αυτό εγείρει την πιθανότητα ότι ενώ



δεν είναι εκ των δραστικών συστατικών, ίσως καθιστά διαπερατές τις βακτηριακές μεμβράνες και διευκολύνει την είσοδο άλλων, περισσότερο δραστικών ουσιών (Carson και συν., 2006).

Σε αντίθεση με την απουσία πλήρους λύσης του κυττάρου που παρατηρήθηκε στα στελέχη *S. aureus* που επεξεργάστηκαν με ΤΤΟ, στα στελέχη *E. coli* εμφανίσθηκε πλήρης λύση, επιβεβαιώνοντας ότι το ΤΤΟ παραβιάζει τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των βακτηριακών μεμβρανών (Carson και συν., 2006).

Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων τέλος, φαίνεται ότι δρουν επίσης και σε κυτταρικές πρωτεΐνες που είναι εμπυθισμένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ένζυμα όπως οι ΑΤΡ-άσες βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη περιχαρακωμένα από μόρια λιπιδίων και οι κυκλικοί υδρογονάνθρακες με τα λιπόφιλα μόριά τους μπορούν να συσσωρευτούν στο διπλό διαμοριακό στρώμα των λιπιδίων διαταράσσοντας την αλληλεπίδραση λιπιδίων-πρωτεϊνών, ή να αλληλεπιδράσουν άμεσα με υδρόφοβα μέρη των πρωτεϊνών (Sikkema, 1995).

A.6.8. ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Η αντιμυκητιασική δράση των αιθέριων ελαίων είναι άμεσα εξαρτώμενη από την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές αλκοόλες, κάτι που επιβεβαιώνει τη γενική παραδοχή ότι η ισχύς των ουσιών αυτών καθορίζεται από τη χημική τους σύσταση (Giordani και συν., 2004). Αρκετά είναι τα αιθέρια έλαια που έχουν επιδείξει σημαντική αντιμυκητιασική δράση σε ζύμες, δερματόφυτα και στελέχη ασπέργιλλου, μάλιστα η πλειοψηφία αυτών των αιθέριων ελαίων αποτελείται από φαινολικά δομικά συστατικά όπως η θυμόλη, η καρβακρόλη και η ευγενόλη (Cavaleiro και συν., 2006). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από διάφορες μελέτες δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμα, κάτι που αποδίδεται στις ποιοτικές διαφορές των συλλεγόμενων φυτών, στις διαφορές ανάμεσα στα εξεταζόμενα στελέχη μυκήτων, καθώς και στη μεθοδολογία που εφαρμόζεται (Tampieri και συν., 2005).

Σε μελέτη που περιελάμβανε 16 αιθέρια έλαια, τα οποία δοκιμάστηκαν έναντι στελεχών μυκήτων που απομονώθηκαν από αρτοπαρασκευάσματα, εκείνα που παρουσίασαν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση ήταν τα έλαια κανέλας, λεμονόχορτου, θυμαριού, μέντας και γαρύφαλλου (Guynot και συν., 2003).

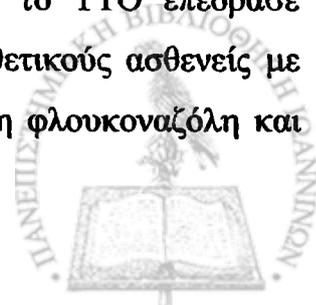
Οι Giordani και συν. (2004) απέδειξαν ότι η ανάπτυξη της *C. albicans* υπέστη αναστολή από το αιθέριο έλαιο του χημειότυπου του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) που ήταν πλούσιος σε θυμόλη και το αντίστοιχο της ρίγανης (*Origanum vulgare*) με υψηλή περιεκτικότητα σε καρβακρόλη, ενώ η δράση άλλων χημειότυπων του θυμαριού φτωχότερων σε φαινολικά συστατικά, ήταν ηπιότερη. Το αιθέριο έλαιο του *Lippia sidoides* Cham., που είχε



επίσης υψηλή περιεκτικότητα σε θυμόλη, επέδειξε ισχυρή δράση έναντι 18 στελεχών *C. albicans*, *Candida tropicalis* και *Microsporium canis* (Fontenelle και συν., 2007). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα έρευνας των Pina-Vaz και συν. (2004), που εξετάζοντας τα αιθέρια έλαια τριών χημειότυπων του θυμαριού (*T. vulgaris*, *T. zygis*, *T. mastichina*) έναντι επτά στελεχών *Candida* spp, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα έλαια των *T. vulgaris* και *T. zygis* με υψηλή περιεκτικότητα σε καρβακρόλη και θυμόλη αντίστοιχα, παρουσίασαν ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε σχέση με το έλαιο του *T. mastichina* που είχε ως βασικό συστατικό την 1,8-κινεόλη. Σε αντίστοιχη μελέτη των Manohar και συν. (2001) το αιθέριο έλαιο της ρίγανης και η καρβακρόλη επέδρασαν ανασταλτικά στην ανάπτυξη της *C. albicans* τόσο in vitro όσο και in vivo, ενώ ίδιο αποτέλεσμα in vitro και in vivo προέκυψε και από τη δράση των δύο φαινολικών ενώσεων των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και του γαρύφαλλου, καρβακρόλης και ευγενόλης αντίστοιχα, έναντι έξι κλινικών στελεχών *C. albicans* (Chami και συν., 2005) καθώς και του αιθέριου ελαίου του *Origanum virens* πλούσιου σε καρβακρόλη, έναντι στελεχών *Candida* spp (Salgueiro και συν., 2003). Εξίσου ισχυρή ήταν και η αντιμυκητιασική δράση που επέδειξαν το αιθέριο έλαιο του *Thymus poulegioides*, με υψηλή συγκέντρωση θυμόλης και καρβακρόλης, έναντι στελεχών *Candida* spp, *Aspergillus* spp και δερματόφυτων (Pinto και συν., 2006) και του *Ocimum gratissimum*, με υψηλή περιεκτικότητα σε ευγενόλη, έναντι των *C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* και *C. tropicalis* (Nakamoura και συν., 2004).

Οι Tampieri και συν. (2005) εξέτασαν 16 αιθέρια έλαια έναντι ενός κλινικού στελέχους *C. albicans*, από τα οποία τα έλαια των *Cinnamomum verum*, *Cymbopogon flexuosus*, *Mentha piperita*, *Origanum vulgare*, *Satureja montana* εμφάνισαν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση, σε αντίθεση με τα έλαια των *Santalum album* (sandalwood oil) και *Pinus mugo* που ήταν ανενεργά ακόμη και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αντίθετα οι Hammer και συν. (1998) ανέφεραν ότι το έλαιο του σανταλόξυλου (sandalwood oil) ήταν το δραστικότερο αντιμυκητιασικό από τα 24 συνολικά έλαια που εξετάστηκαν έναντι 114 στελεχών *Candida* spp.

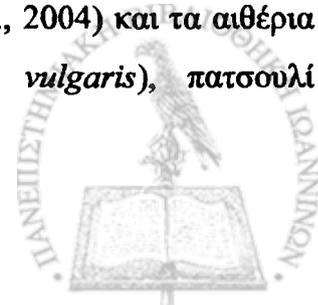
Οι Mondello και συν. (2003) διαπίστωσαν ότι το αιθέριο έλαιο του τεϊόδενδρου (TTO) ανέστειλε την ανάπτυξη στελεχών *Candida* spp που απομονώθηκαν από το στοματοφάρυγγα HIV-οροθετικών ασθενών, αρκετά εκ των οποίων ήταν ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη (fluconazole) και στην ιτρακοναζόλη (itraconazole). Σε άλλη μελέτη το TTO επέδρασε ανασταλτικά στην ανάπτυξη 118 στελεχών *Candida* spp από HIV-οροθετικούς ασθενείς με στοματοφαρυγγική καντιτίαση, πολλά από τα οποία ήταν ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη και



στην αμφοτερικίνη Β (amphotericin B) (Vazquez και συν., 2000). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Bagg και συν. (2006) που απομόνωσαν 301 στελέχη *Candida* spp από 199 καρκινοπαθείς, 41 εκ των οποίων ήταν ανθεκτικά στις αζόλες, ενώ το ίδιο έλαιο (ΤΤΟ) έδρασε ανασταλτικά στην ανάπτυξη των *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* (Hammer και συν., 2004), *Schizosaccharomyces pombe*, *Debaryomyces hansenii* (D'Augia και συν., 2001) και σε στελέχη *Trichophyton* spp, *Aspergillus* spp, *Microsporum* spp και *Penicillium* spp (Concha και συν., 1998). Σε άλλη μελέτη των Mondello και συν. (2006) το ΤΤΟ και το βασικό του συστατικό τερπινεν-4-όλη, που δρα μεμονωμένα ή σε συνέργεια με τα επιμέρους συστατικά (Farag και συν., 2004), επέδειξαν ισχυρή ανασταλτική δράση in vivo σε 49 ευαίσθητα και ανθεκτικά στις αζόλες κλινικά στελέχη *Candida* spp, ενώ σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Banes-Marshall και συν. (2005) μελετώντας το ίδιο έλαιο έναντι 11 κλινικών στελεχών *C. albicans*. Αξιοσημείωτη αντιμυκητιασική δράση επέδειξαν και τέσσερα αιθέρια έλαια προερχόμενα από το ίδιο γένος (*Melaleuca* spp). Πρόκειται για έλαια των ειδών *M. ericifolia*, *M. leucadendron*, *M. styphelioides* και *M. armillaris* που εξετάστηκαν έναντι στελεχών *Candida* spp και *Aspergillus* spp (Farag και συν., 2004).

Οι D' Augia και συν. (2005) σε μελέτη του αιθέριου ελαίου της λεβάντας έναντι 50 κλινικών στελεχών *C. albicans*, παρατήρησαν ότι η λιναλοόλη, που ήταν εκ των βασικών συστατικών του ελαίου, παρουσίασε μεγαλύτερη ανασταλτική ισχύ από το έλαιο όταν χορηγήθηκε μεμονωμένα. Σε ανάλογα αποτελέσματα κατέληξαν και οι Shin και Kang (2003) οι οποίοι μελέτησαν την αντιμυκητιασική δράση του αιθέριου ελαίου της *Agastache rugosa* και της εστραγόλης, που είναι το βασικό της συστατικό, η οποία εμφάνισε μεγαλύτερη ισχύ από το ίδιο το έλαιο.

Τα αιθέρια έλαια του *Juniperus oxycedrus* παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιμυκητιασική δράση έναντι όλων των δερματοφύτων και αρκετών από τα στελέχη *Candida* spp που εξετάστηκαν, ενώ μέτρια δράση εμφάνισαν έναντι κλινικών στελεχών ασπέργιλλου (Cavaleiro και συν., 2006). Σε μελέτη των Kizil και συν. (2004) τα αιθέρια έλαια τριών ειδών του γένους *Hypericum* spp (*H. scabrum*, *H. scabroides*, *H. triquetrifolium*) έδρασαν παρεμποδιστικά έναντι της *C. albicans*, ενώ ανάλογη δράση παρουσίασαν τα αιθέρια έλαια 13 από τα 35 φυτά της παραδοσιακής βραζιλιάνικης θεραπευτικής έναντι της *C. albicans* με ισχυρότερα τα έλαια των *Achillea millefolium*, *Mikania glomerata* και *Stachys byzantina* (Duarte και συν., 2005). Το αιθέριο έλαιο του *Anthemis xylopada* εμφανίστηκε δραστικό έναντι στελεχών *C. albicans*, *C. krusei* και *C. tropicalis* (Uzel και συν., 2004) και τα αιθέρια έλαια λεμονόχορτου (*Cymbopogon citratus*), θυμαριού (*Thymus vulgaris*), πατσουλί



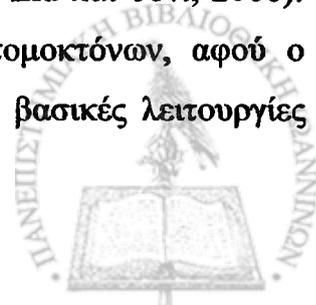
(*Pogostemon cablin*) και κέδρου (*Cedrus atlantica*) έδρασαν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη της *C. albicans* (Abe και συν., 2003), ενώ το έλαιο του λεμονόχορτου εμφανίστηκε δραστικό και έναντι του *Aspergillus flavus* (Paranagama και συν., 2003).

Από τα επτά αιθέρια έλαια κανέλας, λεμονόχορτου, περίλλα, θυμαριού, τειόδενδρου, λεβάντας και κίτρου και των βασικών τους συστατικών που εξετάστηκαν έναντι των *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes* και *C. albicans*, το αιθέριο έλαιο της κανέλας (Cinnamon oil) εμφάνισε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση και του κίτρου (Citron oil) την ασθενέστερη (Inouye και συν., 2001). Το αιθέριο έλαιο της κανέλας παρουσίασε επίσης την ισχυρότερη αντιμυκητιασική δράση, όπως και το αντίστοιχο του γαρύφαλλου από τα έξι έλαια που μελετήθηκαν (κανέλας, γαρύφαλλου, βασιλικού, δενδρολίβανου, άνηθου, πιπερόριζας) έναντι των *C. albicans*, *A. flavus* και *Penicillium islandicum* (Lopez και συν., 2005), ενώ τα αιθέρια έλαια της κανέλας και του θυμαριού ήταν τα ισχυρότερα αντιμυκητιασικά από τα 12 συνολικά έλαια που εξετάστηκαν έναντι των *A. flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* και *Fusarium moniliforme* (Soliman και Badeaa, 2002).

Τέλος τα αιθέρια έλαια των *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citrates*, *Callistemon lanceolatus*, *Cinnamomum camphora*, *Citrus limon* και *Tagetes petula* εμφάνισαν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη της *C. albicans*, που ήταν ισχυρότερη των συμβατικών αντιμυκητιασικών μικοναζόλης (miconazole) και κλοτριμαζόλης (clotrimazole) (Dutta και συν., 2007), ενώ το αιθέριο έλαιο του κουρκουμά, του λεμονόχορτου και του δενδρολίβανου ήταν τα δραστικότερα από 11 συνολικά έλαια έναντι των *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula glutinis* και *Yarrowia lipolytica* υπεύθυνων για την πρόκληση τροφιμογενών νοσημάτων (Saccheti και συν., 2005).

A.6.9. ΑΝΤΙΠΑΡΑΣΙΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Λίγες είναι οι μελέτες που αφορούν την αντιπαρασιτική δράση των αιθέριων ελαίων, αν και στις παραδοσιακές λαϊκές θεραπευτικές γίνεται συχνά λόγος για τέτοιου είδους χρήση, χωρίς ωστόσο να υπάρχει πειραματική επιβεβαίωση. Πολλά από τα αιθέρια έλαια και τα επιμέρους συστατικά τους έχουν αναγνωρισμένη εντομοαπωθητική δράση με πολλές εφαρμογές όπως στην πρόληψη νόσων (ελονοσία, φιλαρίαση) (Prajapati και συν., 2005) και στη γεωργία σε μια προσπάθεια αντικατάστασης των χημικών εντομοαπωθητικών και αποφόρτισης της περιβαλλοντικής καταστροφής (Lamiri και συν., 2001, Liu και συν., 2006). Θεωρούνται μάλιστα σημαντικοί φυσικοί πόροι προέλευσης των εντομοκτόνων, αφού ο υδρόφοβος χαρακτήρας τους δίνει τη δυνατότητα να παρεμβαίνουν σε βασικές λειτουργίες



μεταβολισμού, βιοχημείας, φυσιολογίας, αλλά και συμπεριφοράς των εντόμων (Prajapati και συν., 2005). Με αυτό τον τρόπο εκτός από την ιδιότητά τους να δρουν άμεσα εναντίον διαφόρων αρθρόποδων, έχουν και την ικανότητα να παρεμβαίνουν στον κύκλο ζωής και στο ρυθμό ανάπτυξης και αναπαραγωγής τους (Parachristos και συν., 2004). Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενώσεων με άμεση εντομοκτόνο δράση αποτελούν πολλά από τα αιθέρια έλαια της οικογένειας των Χειλανθών (Lamiaceae), πλούσια σε καρβακρόλη, θυμόλη, κυμένια, μονοτερπένια και σεσκιτερπένια (Sampson και συν., 2005).

Οι αβορίγινες της Αυστραλίας χρησιμοποιούσαν φαρμακευτικά αρωματικά φυτά και τα έλαιά τους για την καταπολέμηση δυσεντεριών, ελονοσίας, και ελμινθώσεων (Bogeham, 1995), ενώ για πολλά χρόνια φυτά της εγχώριας χλωρίδας των Βραζιλιάνων χρησιμοποιούνταν από τους ντόπιους πληθυσμούς όχι μόνο για τη θεραπεία βακτηριακών και μυκητιασικών λοιμώξεων, αλλά και για τη θεραπεία της λεισμανίασης, της ελονοσίας και της σχιστοσωμίας (Duarte και συν., 2005). Το πρώτο ανθελονοσιακό φάρμακο (κινίνη), απομονώθηκε από το φλοιώδες τμήμα των ειδών του φυτού *Cinchona* και δημοσιεύθηκε από τους Γάλλους επιστήμονες Caventou και Pelletier στα 1820, η χρήση του ωστόσο από τους ιθαγενείς του Αμαζονίου χρονολογείται αρκετά χρόνια πριν, ενώ η εισαγωγή του στην Ευρώπη για τη θεραπεία της ελονοσίας πραγματοποιήθηκε στις αρχές του 1600 (Gurib-Fakim, 2006).

Το δραστικότερο ίσως αιθέριο έλαιο έναντι των πρωτόζωων είναι αυτό του σκόρδου (Garlic oil), κυρίως χάρη στην ύπαρξη της αλλισίνης (allicin) ως δομικό συστατικό, η δράση του οποίου στην αντιμετώπιση ελμινθικών παρασιτώσεων και δυσεντεριών ήταν γνωστή από την αρχαιότητα (Ankri και Mirelman, 1999). Η αλλισίνη, σύμφωνα με τους Ankri και συν. (1997), αναστέλλει τη δράση εκκρινόμενων πρωτεϊνών της κυστεΐνης που δρουν έναντι πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, συστατικά της οποίας αποδομούνται κατά την πορεία διείσδυσης της *Entamoeba histolytica* στους ιστούς, έχει όμως μικρό χρόνο ημίσειας ζωής στους ιστούς, με αποτέλεσμα να αμφισβητείται κατά πόσο η ενεργότητα στα in vitro πειράματα μπορεί να συγκριθεί με την αντίστοιχη στα in vivo (Harris και συν., 2000). Η δραστικότητα του ελαίου αφορά την αναστολή της ανάπτυξης 12 τουλάχιστον διαφορετικών παρασίτων (τρυπανόσωμα, πλασμώδιο, λεισμάνια, γκιάρντια, κρυπτοσπορίδιο, αμοιβάδα κ.ά), ενώ μικρότερο εύρος δράσης έχουν παρουσιάσει και τα αιθέρια έλαια της ρίγανης, θυμαριού, κανέλας, τεϊόδενδρου, λεμονιού, βασιλικού, λεβάντας και άλλων (Anthony και συν., 2005). Έτσι το έλαιο της ρίγανης (*Origanum vulgare*) έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό in vivo έναντι των *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* και *Blastocystis hominis* (Force και συν., 2000), το αντίστοιχο του τεϊόδενδρου (*Melaleuca alternifolia*) έναντι των *Leishmania major*,



Trypanosoma brucei και *Trichomonas vaginalis* (Carson και συν., 2006), ενώ το αιθέριο έλαιο της λεβάντας έναντι των *Giardia duodenalis* και *T. vaginalis* (Moon και συν., 2006).

Οι Boyom και συν. (2003) μελέτησαν τη δράση πέντε αιθέριων ελαίων από αντίστοιχα φυτά της αφρικανικής ηπείρου, έναντι του στελέχους W2 του *Plasmodium falciparum*, το οποίο εμφανίζει ανθεκτικότητα στη χλωροκίνη και σε άλλα ανθελνοσοσιακά φάρμακα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο του *Hexalobus crispiflorus*, αποτελούμενο κατά 95% από σεσκιτερπένια, παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι του συγκεκριμένου στελέχους, ενώ αντίστοιχη δράση έναντι του *P. falciparum* εμφανίζει και το αιθέριο έλαιο του *Cochlospermum planchonii* (Anthony και συν., 2005), καθώς και τα αιθέρια έλαια των *Artemisia annua* (sweet wormwood), *Quillaja saponaria* (soap bark tree), *Strychos myrtoides*, *Calophyllum* sp., *Garsinia* sp. (Gurib-Fakim, 2006).

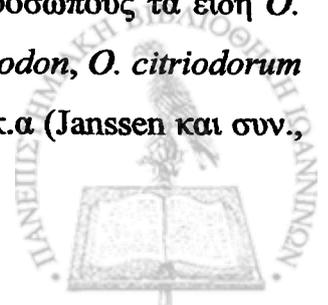
Σε μελέτη των Rosa και συν. (2003) το αιθέριο έλαιο που προερχόταν από τα φύλλα του *Croton cajucara*, φυτό με υψηλή περιεκτικότητα σε λιναλοόλη που απαντά στη Ν. Αμερική, εμφάνισε σε *in vitro* πειράματα ανασταλτική δράση έναντι αμαστιγωτών και προμαστιγωτών μορφών της *Leishmania amazonensis*. Παρόμοια δράση έναντι του ίδιου μαστιγοφόρου είχε και το αιθέριο έλαιο του *Ocimum gratissimum* (Ueda-Nakamura και συν., 2006).

Τα αιθέρια έλαια δρουν επίσης και κατά των Νηματωδών, με χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτά των *Ocimum gratissimum* Linn. και του βασικού συστατικού του ευγενόλης έναντι του *Haemonchus contortus* (Pessoa και συν., 2002), καθώς και του *Ocimum sanctum* και της ευγενόλης έναντι του *Caenorhabditis elegans* (Asha και συν., 2001).

A.6.10. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΒΑΣΙΛΙΚΟΥ

Ο βασιλικός, *Ocimum basilicum* L. (ώκιμον κατά το Διοσκουρίδη), ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (*Labiatae*). Η οικογένεια *Labiatae* ή *Lamiaceae*, αποτελεί μία από τις σπουδαιότερες οικογένειες, αριθμώντας περισσότερα από 5000 είδη φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών, από τα οποία εξάγονται αιθέρια έλαια με πολλαπλές εφαρμογές (Gurib-Fakim, 2006).

Το γένος *Ocimum* L. αποτελείται από 30 είδη που συναντώνται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές της Ασίας, Αφρικής, Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (Jayasinghe και συν., 2003, Suprakul και συν., 2003), αλλά και στη Μεσόγειο, με εκπροσώπους τα είδη *O. americanum* L., *O. canum*, *O. gratissimum* L., *O. tenuiflorum* L., *O. trichodon*, *O. citriodorum* L., *O. minimum* L., *O. micranthum*, *O. grandiflorum* L., *O. urticifolium* κ.α (Janssen και συν.,

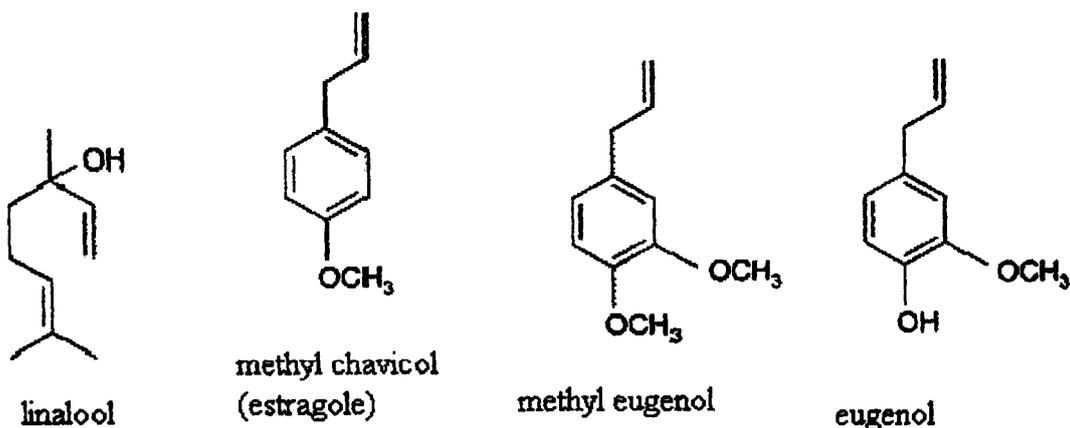


1989, Grayer και συν., 1996, Schulz και συν., 2003b, Vieira και συν., 2003, Trevisan και συν., 2006).

Το όνομά του προέρχεται από τη λέξη «βασιλεύς» και είναι ιερό φυτό για πολλούς λαούς, όπως και για τους Έλληνες. Σύμφωνα με την παράδοση μάλιστα φύτευσε στο σημείο ταφής του Τιμίου Σταυρού και με το άρωμά του οδήγησε την Αγία Ελένη στην ανεύρεσή του (Νεώτερον Εγκυκλοπαιδικόν Λεξικόν «Ηλίου», 1975).

Τα φύλλα του βασιλικού περιέχουν αιθέριο έλαιο σε ποσοστό 0,2-1% με κύρια συστατικά τη λιναλοόλη (linalool) και τη μεθυλοχαβικόλη (methyl chavicol) (εστραγόλη) (Lachowicz και συν., 1997, Orpalchenova και Obreshkova, 2003), αλλά και τα ο-κυμένιο, κινράλη, α-πινένιο, καμφένιο, β-πινένιο (Λουκής, 2000), γερανιόλη και γερανιάλη (Grayer και συν., 1996) (Σχήμα 5). Εξαιτίας ωστόσο των παραλλαγών στη μορφολογία του φυτού και στη σύσταση του ελαίου, έχουν περιγραφεί αρκετοί χημειότυποι με μεμονωμένα ή και ως μείγματα τα βασικά συστατικά λιναλοόλη και μεθυλοχαβικόλη, αλλά και με συνδυασμούς λιναλοόλης και ευγενόλης ή μεθυλοχαβικόλης και μεθυλοευγενόλης (Lewinsohn και συν., 2000, Villalobos και Acosta, 2003). Έτσι για παράδειγμα αναφέρονται έξι χημειότυποι για το *O. basilicum* και τρεις για το *O. gratissimum* (Vieira και συν., 2003).

Σχήμα 5: Μοριακές δομές βασικών συστατικών αιθέριου ελαίου βασιλικού (Grayer και συν., 1996, Supprakul και συν., 2003)



Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι βασιλέλαιου που είναι διαδεδομένοι στο εμπόριο. Ο πρώτος ('Reunion Type'), αποτελείται κυρίως από μεθυλοχαβικόλη σε ποσοστό 80%, ενώ ο δεύτερος ('European Type') προέρχεται από τη Γαλλία, Ιταλία, Αίγυπτο και Νότια Αφρική και αποτελείται τόσο από λιναλοόλη (35-50%), όσο και από μεθυλοχαβικόλη (15-25%) (Schulz και συν., 2003b).

Ο βασιλικός έχει χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια στη λαϊκή ιατρική ως αντιφλεγμονώδες και αναλγητικό, για την αντιμετώπιση συμπτωμάτων όπως η δυσπεψία και ο βήχας, αλλά διαθέτει και αντιοξειδωτική δράση (Jayasinghe και συν., 2003, Trevisan και συν., 2006) και έχει χρησιμοποιηθεί ως καρύκευμα στη μαγειρική (Opalchenova και Obreshkova, 2003), ως προσθετικό σε προϊόντα με βάση τη ντομάτα με υψηλή οξύτητα και που είναι επιρρεπή σε μόλυνση από οξεάντοχα βακτήρια (Lachowicz και συν., 1998), καθώς και σε είδη ζαχαροπλαστικής, κονσερβοποιημένα προϊόντα κρέατος και λουκάνικα (Wan και συν., 1998). Αποτελεί επίσης συστατικό οδοντιατρικών σκευασμάτων και στοματικών διαλυμάτων, ενώ παρουσιάζει και εντομοαπωθητική δράση, κυρίως χάρη στην ύπαρξη της λιναλοόλης (Schulz και συν., 2003b, Villalobos και Acosta, 2003).

Το αιθέριο έλαιο του βασιλικού εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση που αποδίδεται στα βασικά συστατικά του, λιναλοόλη και μεθυλοχαβικόλη, με την πρώτη να παρουσιάζεται δραστικότερη της δεύτερης, ενώ τα κατά Gram (+) βακτήρια εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία από τα Gram (-) (Lachowicz και συν., 1998). Το φάσμα δραστηριότητας περιλαμβάνει βακτήρια και μύκητες, όπως *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. marcescens*, *Y. enterocolitica*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* κ.ά. (Fyfe και συν., 1998, Lachowicz και συν., 1998, Opalchenova και Obreshkova, 2003, Sacchetti και συν., 2004).

Σε ό,τι αφορά την τοξικότητα του ελαίου, θεωρείται ότι η μεθυλοευγενόλη και η μεθυλοχαβικόλη (εστραγόλη) είναι υπεύθυνες για κυτταροτοξικές βλάβες και καρκινογένεση, γι' αυτό σύμφωνα με το Συμβούλιο της Ευρώπης (Council of Europe) η μεν πρώτη δεν πρέπει να ανιχνεύεται, η δε δεύτερη δεν πρέπει να ξεπερνά το όριο των 0,05 mg/kg στα προϊόντα τροφίμων (Schulz και συν., 2003b).



A.6.11. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΘΥΜΑΡΙΟΥ

Το θυμάρι (thyme) ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (*Labiatae*) και με το όνομα αυτό ανευρίσκονται περίπου 350 είδη του γένους *Thymus* που συναντώνται στην Ευρώπη, Βόρεια Αφρική και Ασία. Αποτελεί αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό αυξημένου οικονομικού ενδιαφέροντος και αντιπροσωπευτικά είδη του γένους αποτελούν το άγριο θυμάρι (*T. serpyllum*) και το κοινό θυμάρι (*T. vulgaris*) (Badi και συν., 2004, Δαφερέρα και συν., 2006).

Άλλα είδη διαδεδομένα στη λεκάνη της Μεσογείου είναι τα: *T. satureioides* (Μαρόκο), *T. willkomii*, *T. carnosus* (Ιβηρική), *T. moroderi* (Ισπανία), *T. grandulosus* (Ισπανία και Β. Αφρική), *T. villosus*, *T. capitellatus*, *T. camphoratus* (Πορτογαλία), *T. longicaulis*, *T. poulegioides* (Ιταλία), *T. lotocephalus*, *T. herba-barona* (Senatore, 1996).

Η δρόγη περιέχει αιθέριο έλαιο 1-2,5%, που συνίσταται κυρίως από θυμόλη και καρβακρόλη σε εκατοστιαία περιεκτικότητα πάνω από 50%, ενώ η καρβακρόλη αποτελεί το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου στο ελληνικό είδος *Thymus capitatus* (*Coridothymus capitatus*) (Λουκής, 2000). Σήμερα στην Ελλάδα υπάρχουν 31 αυτοφυή φυτά του γένους (πέντε ενδημικά) με αντιπροσωπευτικότερο είδος το *T. sibthorpii*, ενώ το *T. capitatus* διακινείται εμπορικά ως «ρίγανη» λόγω της παρόμοιας οσμής και σύστασης σε καρβακρόλη (Δαφερέρα και συν., 2006).

Το αιθέριο έλαιο του *T. vulgaris* είναι δυνατόν να περιέχει έως και 30 μονοτερπένια, με αποτέλεσμα η χημική πολυμορφία στη σύσταση των αιθέριων ελαίων μεταξύ φυτών του ίδιου είδους να είναι μεγάλη και να προκύπτουν διαφορετικοί χημειότυποι. Έτσι στη Νότια Γαλλία για παράδειγμα συναντώνται έξι χημειότυποι ελαίων του είδους *T. vulgaris*, ανάλογα με το συστατικό που επικρατεί (geraniol, α -terpineol, thuyanol-4, linalool, carvacrol, thymol) (Thompson και συν., 2003), ενώ στην Ισπανία έχει περιγραφεί χημειότυπος με βασικό συστατικό την 1,8-κινεόλη (Guillen και Manzanos, 1998).

Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού αποτελεί ένα από τα 10 πιο εμπορικά έλαια παγκοσμίως, διαθέτει αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές ιδιότητες, χρησιμοποιείται δε και ως φυσικό συντηρητικό τροφίμων (Badi και συν., 2004, Rasooli και συν., 2006). Αποτελεί αρωματικό προσθετικό σε ποικιλία τροφίμων και ποτών και βρίσκει εφαρμογές στην αρωματοποιία ως συστατικό καλλυντικών σκευασμάτων, π.χ αποσμητικά σαπούνια και στοματικά διαλύματα, ενώ έχει και θεραπευτική χρήση λόγω των αντιμικροβιακών του ιδιοτήτων (Cosentino και συν., 1999, Schulz και συν., 2003a).



Η αντιμικροβιακή του δράση περιλαμβάνει ευρύ φάσμα βακτηρίων και μυκήτων, όπως *B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *S. flexneri*, *C. jejuni*, *P. aeruginosa*, *S. sonnei*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae*, *T. mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* (Smith-Palmer και συν., 1998, Cosentino και συν., 1999, Chorianopoulos και συν., 2004, Pina-Vaz και συν., 2004, Rota και συν., 2004, Bozin και συν., 2006, Schelz και συν., 2006).

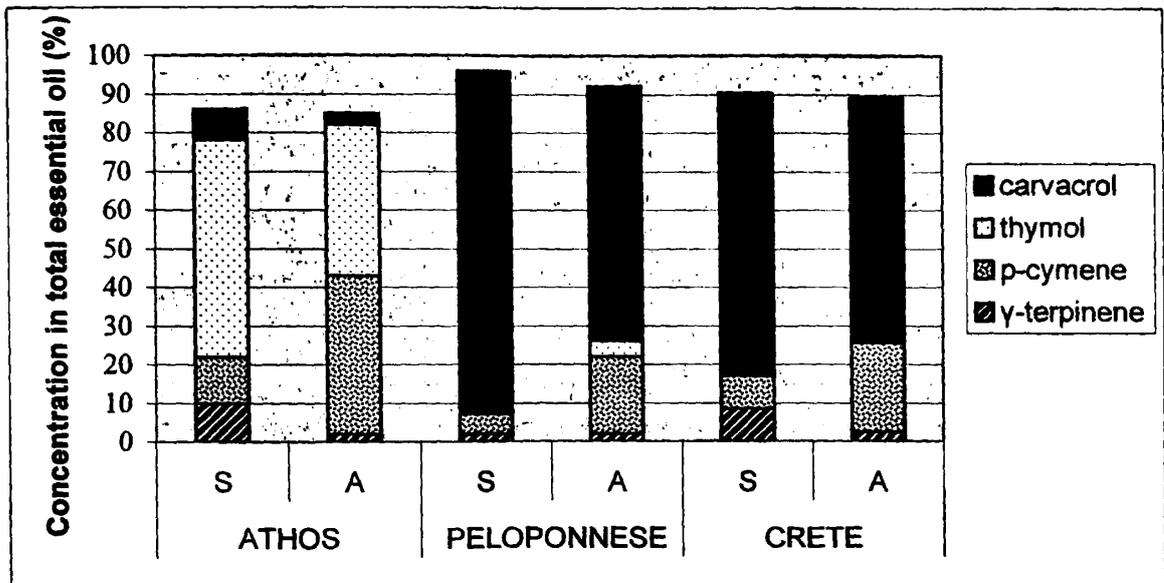
A.6.12. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ

Ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (*Labiatae*) με κύριο εκπρόσωπο το είδος *Origanum vulgare*. Ετυμολογικά η ονομασία «Origanum» προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «όρος» (βουνό) και «γάνος» (λαμπρότητα, ακτινοβολία, κάλλος), αφού η ρίγανη φύεται σε απaráμιλλης ομορφιάς τοπία σε υψόμετρα 400-1800 m (De Mastro, 1996, Leto και Salamone, 1996, Spada και Perrino, 1996, Dulger, 2005). Η περιεκτικότητα της δρόγης σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται από 0,5% έως 2% (Kokkini, 1996, Λουκής, 2000), έως και 7% για το *O. vulgare* (Skoula και Kamenopoulos, 1996, Gounaris και συν., 2002), ενώ τα βασικά του συστατικά αποτελούν οι ισομερείς φαινόλες καρβακρόλη (carvacrol) και θυμόλη (thymol) σε ποσοστό 45-80% (Λουκής, 2000), καθώς και τα μονοτερπένια π-κυμένιο (p-cymene) και γ-τερπινένιο (γ-terpinene), που είναι πρόδρομες ενώσεις των παραπάνω και απαντούν σε μικρότερη αναλογία που κυμαίνεται από 5% έως 7% (Kokkini, 1996, Florou-Paneri και συν., 2005), ωστόσο υπάρχουν παραδείγματα όπου οι συγκεντρώσεις διαφοροποιούνται έως 80% και 64% για την καρβακρόλη και θυμόλη αντίστοιχα και μέχρι 52% για καθένα από τα πρόδρομα μόριά τους (Burt και συν., 2005).

Η περιεκτικότητα σε καρβακρόλη διαφόρων χημειότυπων του *O. vulgare* ποικίλλει και είναι δυνατόν να φθάνει το 95% (Gounaris και συν., 2002), ενώ γενικά η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου εξαρτάται από το είδος, την εποχή συλλογής του φυτού, τη γεωγραφική θέση (Burt, 2004), το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται και τη μέθοδο έκλυσης του ελαίου (Burt και συν., 2005). Όσο όμως και αν παρουσιάζεται μεταβλητότητα στις συγκεντρώσεις των τεσσάρων βασικών συστατικών στα διάφορα είδη, το συνολικό τους άθροισμα είναι ισοδύναμο, όπως προκύπτει από τα είδη της ελληνικής ρίγανης που έχουν συλλεχθεί από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και φθάνει μέχρι το 90% της σύστασης του ελαίου (Σχήμα 6) (Kokkini και συν., 1997).

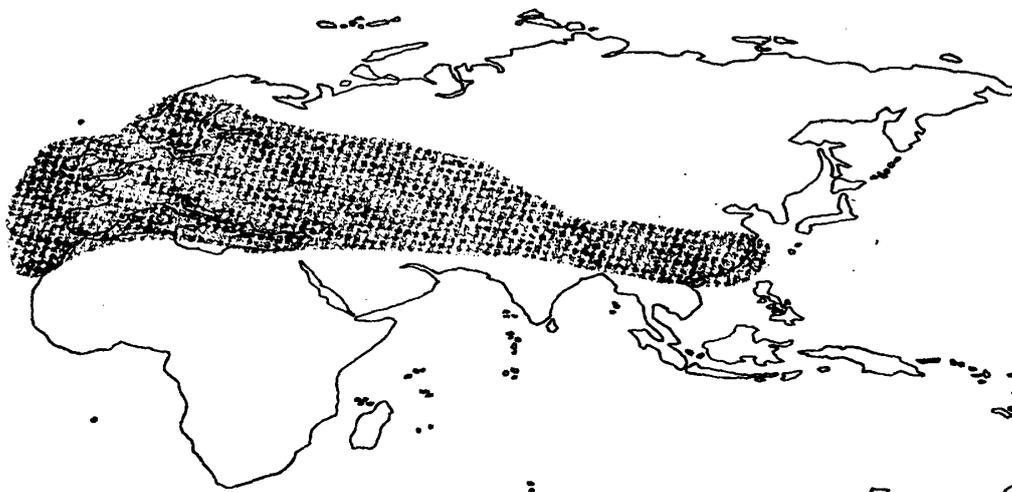


Σχήμα 6: Εκατοστιαία περιεκτικότητα των τεσσάρων βασικών συστατικών του αιθέριου ελαίου του *O. vulgare* subs. *hirtum*. Συλλογή από τρεις διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας κατά τις περιόδους του καλοκαιριού (S) και του φθινοπώρου (A) (Kokkini και συν., 1997).



Το γένος *Origanum* L. περιλαμβάνει 49 είδη με μορφολογική και χημική ποικιλότητα, 38 από τα οποία στην περιοχή της Μεσογείου και κυρίως στην Ανατολική Μεσόγειο, ενώ στην Ελλάδα απαντούν 11 είδη στην πλειοψηφία τους στην περιοχή της Κρήτης (Σχήμα 7) (Spada και Perrino, 1996, Skoula και συν., 1999, Aligiannis και συν., 2001).

Σχήμα 7: Γεωγραφική κατανομή γένους *Origanum* (Spada και Perrino, 1996).



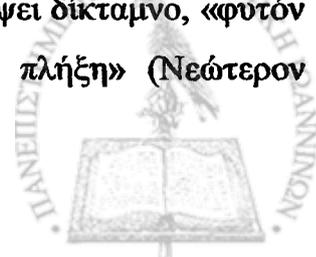
Τα σημαντικότερα είδη είναι το *O. vulgare* με τα υποείδη *O. vulgare* L. subsp. *vulgare*, *O. vulgare* subsp. L. *glandulosum*, *O. vulgare* subsp. L. *gracile*, *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. vulgare* subsp. L. *viridulum*, *O. vulgare* subsp. L. *virens* (Kokkini, 1996), το *O. heracleoticum* (Λουκής, 2000) που αναφέρεται από το Διοσκουρίδη ως «ορίγανος η ηρακλεοτική» και το *O. dictamnus* (*Amaracus dictamnus*) της Κρήτης (Skoula και Kamenopoulos, 1996, Chorianoopoulos και συν., 2004), από το οποίο παραλαμβάνεται η πόα του Κρητικού Δικτάμου.

Άλλα είδη είναι τα: *O. microphyllum* (Κρήτη), *O. scabrum* (Στερεά και Νότια Ελλάδα) (Aligiannis και συν., 2001), *O. tournefortii* (Κρήτη και Κυκλάδες), *O. dubium* (Κύπρος) (Karioti και συν., 2006), η τουρκική ρίγανη *O. onites* που ενδημεί στη Σικελία και στην Α. Μεσόγειο (Skoula και συν., 1999), *O. symes* (Ελλάς), *O. akhdarensis* και *O. cyrenaicum* (Λιβύη), *O. libanoticum* (Λίβανος), *O. bargyli* (Συρία), *O. dayi* και *O. ramonense* (Ισραήλ), *O. elongatum* και *O. grosii* (Μαρόκο), *O. floribundum* (Αλγερία), *O. petraeum*, *O. punonense* και *O. jordanicum* (Ιορδανία) (Kokkini, 1996) και τα φυόμενα στην Τουρκία είδη *O. acutidens* (Sokmen και συν., 2004), *O. solymicum*, *O. bilgeri* (Dulger, 2005), *O. minutiflorum* (wild oregano) (Baydar και συν., 2003), *O. boissieri*, *O. saccatum*, *O. hypericifolium*, *O. brevidens*, *O. haussknechtii*, *O. leptocladum*, *O. rotundifolium*, *O. amanum*, *O. micranthum* (Kokkini, 1996).

Τα δύο πιο γνωστά εμπορικά είδη ρίγανης είναι η ελληνική (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) και η τουρκική (*O. onites*) των οποίων η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο υπερβαίνει το 2% (Kokkini, 1996).

Συγγενή είδη αποτελούν το *O. syriacum* (wild marjoram) ή za'atar κατά τους Άραβες, που φύεται στη Ν. Ευρώπη, Δ. Ασία και Α. Μεσόγειο και αποτελείται από καρβακρόλη, π-κυμένιο και γ-τερπινένιο σε ίσες περίπου συγκεντρώσεις (Putievsky και συν., 1996, Alma και συν., 2003) και το *O. marjorama* (Sagdic και συν., 2003) που προέρχεται από την Ασία, είναι η γνωστή μαντζουράνα ή «αείφυλος αμάρακος» κατά το Θεόφραστο και «σάμψυχο» κατά το Διοσκουρίδη, η δε σύστασή της διαφέρει, αφού αποτελείται από μονοτερπένια, κυρίως τερπινεν-4-όλη, α- και γ-τερπινένια και τερπινεόλη και σε μικρότερη συγκέντρωση φαινόλες, καρβακρόλη και θυμόλη (Vagi και συν., 2005).

Η ρίγανη αποτελεί από την αρχαιότητα διαδεδομένο άρτυμα, ενώ το αιθέριο έλαιο παρουσιάζει αντισηπτική και αντισπασμωδική δράση (Λουκής, 2000, Nostro και συν., 2004). Ο Βιργίλιος στο δωδέκατο βιβλίο της «Αινειάδας» διηγείται ότι όταν πληγώθηκε ο Αινείας από βολή βέλους η μητέρα του Αφροδίτη έσπευσε στο όρος Ίδη να μαζέψει δίκταμο, «φυτόν όπερ επιζητεί η αγρία αίξ, όταν το ταχύ βέλος του κυνηγού την πλήξη» (Νεώτερον



Εγκυκλοπαιδικόν Λεξικόν «Ηλίου», 1975). Μέλη του γένους χρησιμοποιούνται ευρέως ως αρωματικά σε προϊόντα τροφίμων και αλκοολούχων ποτών (Aligiannis και συν., 2001), αλλά και ως αντιοξειδωτικά, αφού μελέτες έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης, πλούσιο σε θυμόλη και σε καρβακρόλη, εμφανίζει την εντονότερη αντιοξειδωτική ισχύ, παρουσιάζοντας αξιοσημείωτη δράση στην παρεμπόδιση οξειδωσης των λιπών (Kulisic και συν., 2004, McKay και Blumberg, 2006). Ωστόσο η χρήση του αιθέριου ελαίου ως συντηρητικό είναι περιορισμένη εξαιτίας του ισχυρού αρώματος που διαθέτει, με αποτέλεσμα να επιδρά αρνητικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου (Lambert και συν., 2001).

Σε ό,τι αφορά την αντιμικροβιακή δράση, αυτή καλύπτει ευρύ φάσμα και φαίνεται ότι οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία των φαινολικών συστατικών καρβακρόλης και θυμόλης, κάτι που προκύπτει και από την απουσία αντιμικροβιακής δράσης των πρόδρομων μορίων π-κυμένιου και γ-τερπινένιου έναντι των μεθικιλίνη ανθεκτικών στελεχών *S. aureus* (Nostro και συν., 2004). Έτσι το *O. scabrum* με περιεκτικότητα σε καρβακρόλη 74,86% παρουσιάζει ισχυρότερη δράση έναντι βακτηρίων και μυκήτων σε σχέση με το *O. microphyllum* που περιέχει κυρίως τερπινεν-4-όλη (24,86%) (Aligiannis και συν., 2001), ενώ θεωρείται πιθανόν να μην υπάρχει και συνεργική δράση μεταξύ των φαινολικών συστατικών (Penalver και συν., 2005).

Έχει περιγραφεί τόσο μικροβιοστατική όσο και μικροβιοκτόνος δράση του ελαίου έναντι βακτηρίων, όπως methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Serratia liquefaciens*, *Lactobacillus carvatus*, *Lactobacillus sakes*, μυκήτων όπως *A. flavus*, *A. niger* (Bernath, 1996, Lambert και συν., 2001, Chorianopoulos και συν., 2004, Nostro και συν., 2004), *C. albicans* (Hammer και συν., 1998, Manohar και συν., 2001, Giordani και συν., 2004, Tampieri και συν., 2005), *Trichophyton rubrum* (Manohar και συν., 2001), παρασίτων όπως *Blastocystis hominis*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* (Anthony και συν., 2005), δεν είναι όμως σαφής ο μηχανισμός δράσης τόσο του ελαίου όσο και των βασικών του συστατικών (Lambert και συν., 2001).



A.6.13. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΤΕΪΟΔΕΝΔΡΟΥ

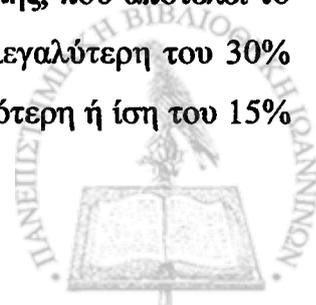
Το τεϊόδενδρο (Tea tree) ανήκει στην οικογένεια των Μυρτωδών (*Myrtaceae*), που περιλαμβάνει περίπου 140 γένη και 3.800 είδη, που εμφανίζονται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, κυρίως στην Αυστραλία, Κεντρική και Νότια Αμερική (Sartorelli και συν., 2007). Τα αντιπροσωπευτικότερα γένη της οικογένειας είναι τα *Leptospermum* spp και *Melaleuca* spp (Smith και Navilliat, 1997), ενώ τα αιθέρια έλαια της οικογένειας διαθέτουν αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Sartorelli και συν., 2007). Χαρακτηριστικά είδη από τα 100 περίπου του γένους *Melaleuca* αποτελούν τα *M. alternifolia*, *M. ericifolia*, *M. leucadendron*, *M. armillaris*, *M. styphelioides*, *M. bracteata*, *M. quinquenervia*, *M. squamohpic* και *M. uncinata* (Frag και συν., 2004, Wilkinson και Cavanagh, 2005).

Το αιθέριο έλαιο (Tea Tree Oil, TTO) παραλαμβάνεται από τα φύλλα και τα τελικά κλαδιά της δρόγης *Melaleuca alternifolia* με τη μέθοδο της απόσταξης με υδρατμούς (steam distillation method) (Hammer και συν., 1996, Carson και συν., 2006) και δεν σχετίζεται με το κοινό τσάι (*Camellia sinensis*) της οικογένειας των Τεϊοειδών (*Camelliaceae*) (Kim και συν., 2004). Η δρόγη απαντά στην Αυστραλία, κυρίως στη Νέα Νότια Ουαλία και ευδοκίμει σε πεδινές παράκτιες περιοχές (Smith και Navilliat, 1997).

Οι ιδιότητες του ελαίου δημοσιεύθηκαν για πρώτη φορά το 1928 από Αυστραλούς επιστήμονες (Smith και Navilliat, 1997), η δε σύστασή του περιλαμβάνει περίπου 100 ενώσεις, κυρίως μονοτερπένια, σесκιτερπένια και τα αλκοολικά παράγωγά τους (Hammer και συν., 2003a, Kim και συν., 2004, Longbottom και συν., 2004, Bagg και συν., 2006), η πλειοψηφία των οποίων έχει ταυτοποιηθεί με χρωματογραφικές μεθόδους (Smith και Navilliat, 1997).

Το βασικό συστατικό του είναι η τερπινεν-4-όλη (terpinen-4-ol) και σε μικρότερες συγκεντρώσεις τα γ-τερπινένιο (γ-terpinene), α-τερπινένιο (α-terpinene), α-τερπινεόλη (α-terpineol), α-τερπινολένη (α-terpinolene), 1,8-κινεόλη ή ευκαλυπτόλη (1,8-cineole), α-πινένιο (α-pinene) και β-πινένιο (β-pinene), που καθορίζουν και τους χημειότυπους του ελαίου ανάλογα με την εκατοστιαία περιεκτικότητά τους, με σημαντικότερο αυτόν της τερπινεν-4-όλης (Southwell και Russell., 2002, Hammer και συν., 2003b, Kim και συν., 2004).

Κατ' επέκταση η ποιότητα και η εμπορική χρήση του ελαίου καθορίζεται από τις προδιαγραφές του "Australian Standard for Oil of *Melaleuca* Terpinen-4-ol type, AS 2782-1997; ISO 4730:1996", που ορίζει το εύρος των συγκεντρώσεων για 14 συνολικά συστατικά και σύμφωνα με το οποίο η εκατοστιαία περιεκτικότητα της τερπινεν-4-όλης, που αποτελεί το πρωτεύον αντιμικροβιακό συστατικό του ελαίου, πρέπει να είναι ίση ή μεγαλύτερη του 30% και η αντίστοιχη της 1,8-κινεόλης που είναι ερεθιστική για το δέρμα, μικρότερη ή ίση του 15%



της συνολικής (Lee και συν., 2002, Kim και συν., 2004, Hammer και συν., 2006, Mondello και συν., 2006).

Οι Αβορίγινες ιθαγενείς της Αυστραλίας χρησιμοποίησαν το τειόδενδρο για πολλούς αιώνες σε διάφορες εφαρμογές και θεραπευτικά τα φύλλα του ως επουλωτικά καταπλάσματα (Smith και Navilliat, 1997) και άλλοτε ως εκχυλίσματα σε παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος και του δέρματος, ή με τη μορφή εισπνοών στην αντιμετώπιση του βήχα και του κοινού κρυολογήματος, ενώ η προφορική παράδοση κάνει λόγο για τη δημιουργία φυσικών «θεραπευτικών λιμών» μέσα στις οποίες έφεταν φύλλα που με την πάροδο του χρόνου υφίσταντο αποσύνθεση (Carson και συν., 2006).

Τα τελευταία 70 χρόνια έχει αυξηθεί κατά πολύ η χρήση του ΤΤΟ στην αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων, αφού διαθέτει αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική, αντική, αντιπαρασιτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Carson και συν., 2006).

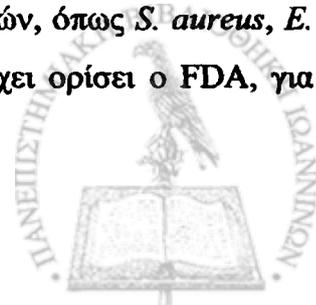
Μάλιστα ο προσδιορισμός της αντιμικροβιακής δράσης συναντά τις απαιτήσεις του Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ για ασφαλή και δραστικά τοπικά αντισηπτικά, με συνέπεια να αποτελεί το πρώτο φυσικό προϊόν αυτής της κατηγορίας (Smith και Navilliat, 1997).

Το αιθέριο έλαιο του τειόδενδρου διαθέτει επίσης και αντιοξειδωτική δράση που αποδίδεται στα τρία τερπενικά συστατικά του, α-τερπινένιο, γ-τερπινένιο και α-τερπινολένη και λιγότερο στην τερπινεν-4-όλη (Kim και συν., 2004).

Αναφέρεται ότι κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, οι Αυστραλοί στρατιώτες ήταν εφοδιασμένοι με αιθέριο έλαιο τειόδενδρου στα κυτία τους, εξαιτίας των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων και μάλιστα το προϊόν ήταν απαλλαγμένο και από τους κρατικούς δασμούς (Carson και συν., 2006).

Όπως αποδεικνύεται από κλινικές μελέτες το έλαιο είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί κατά της ακμής, της πιτυρίασης, της στοματικής και κολπικής καντιτίασης, του επιχειλίου έρπητα, του ποδιού του αθλητή, των ονυχομυκητιάσεων και στην εκρίζωση των μεθικιλίνη-ανθεκτικών στελεχών *S. aureus* (Hammer και συν., 1998, Carson και συν., 2002, Hammer και συν., 2003b, Halkon και Milkus, 2004), ενώ περιέχεται σε πληθώρα καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων, όπως αντισηπτικές κρέμες, σκευάσματα περιποίησης των μαλλιών, οδοντόκρεμες, στοματικά διαλύματα και αντισηπτικά σαπούνια (Hammer και συν., 1996, Hayes και Markovic, 2002).

Η αντιβακτηριακή δράση καλύπτει ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, όπως *S. aureus*, *E. coli* και *P. aeruginosa*, που περιλαμβάνονται στο πρωτόκολλο που έχει ορίσει ο FDA, για



προσδιορισμό της *in vitro* αντιμικροβιακής δράσης των ουσιών που προορίζονται για χρήση ως αντισηπτικά (Smith και Navilliat, 1997), αλλά και πολλούς άλλους, όπως methicillin-resistant *S. aureus*, coagulase-negative staphylococci, vancomycin-resistant enterococci, beta-haemolytic streptococci, *Micrococcus* spp, *A. baumannii*, *B. cereus*, *Bacteroides* spp, *Corynebacterium* spp, *K. pneumoniae*, *Lactobacillus* spp, *P. vulgaris*, *Pseudomonas* spp, *S. typhimurium* (Edward-Jones και συν., 2004, Banes-Marshall και συν., 2005, Wilkinson και Cavanagh, 2005, Carson και συν., 2006, LaPlante, 2007), καθώς και πολλά παθογόνα της στοματικής κοιλότητας (Hammer και συν., 2003b, Takarada και συν., 2004). Μάλιστα η MIC του ελαίου για την πλειοψηφία των μικροοργανισμών ανευρίσκεται μικρότερη του 1% (v/v), με εξαιρέσεις όπως των *E. faecalis* και *P. aeruginosa* που εμφανίζονται ανθεκτικότεροι (Carson και συν., 2006).

Διαθέτει επίσης αντιϊκή δράση έναντι ερπητοϊών (Bagg και συν., 2006) και ισχυρή αντιμυκητιασική δράση έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών στις αζόλες στελεχών *Candida* spp, όπως *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* (Hammer και συν., 1998, Vazquez και συν., 2000, Mondello και συν., 2003, Oliva και συν., 2003, Banes-Marshall και συν., 2005), κρυπτόκοκκου (Mondello και συν., 2003), *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Debaryomyces hansenii* (D'Auria και συν., 2001, Hammer και συν., 2004), *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton interdigitale*, *A. fumigatus*, *A. flavous*, *A. niger*, *Penicillium* spp, *Microsporium gypsum*, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, (Concha και συν., 1998, Hammer και συν., 2002), ενώ σε μελέτη των Hammer και συν. (2003a) τα επιμέρους συστατικά τερπινεν-4-όλη, α-τερπινεόλη, 1,8-κινεόλη και λιναλοόλη εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές MIC έναντι στελεχών μυκήτων από το αυτούσιο έλαιο, αποδεικνύοντας μεμονωμένα την ισχυρή αντιμυκητιασική τους δράση.

Το αιθέριο έλαιο του τεϊόδενδρου όταν χορηγηθεί σε υψηλές δόσεις είναι τοξικό προκαλώντας δερματικές ή και γενικευμένες αλλεργικές αντιδράσεις (Halkon και Milkus, 2004, Hammer και συν., 2006).

Σύμφωνα με την American Association of Poison Control Centers, το 2003 καταγράφηκαν 7310 περιστατικά δηλητηριάσεων με αιθέρια έλαια και το ΤΤΟ κατείχε τη δεύτερη θέση, με 787 περιπτώσεις, ενώ έχουν επίσης περιγραφεί συστηματικές διαταραχές και ωτοτοξικότητα σε πειραματόζωα, καθώς και *in vitro* κυτταροτοξικότητα (Hammer και συν., 2006).

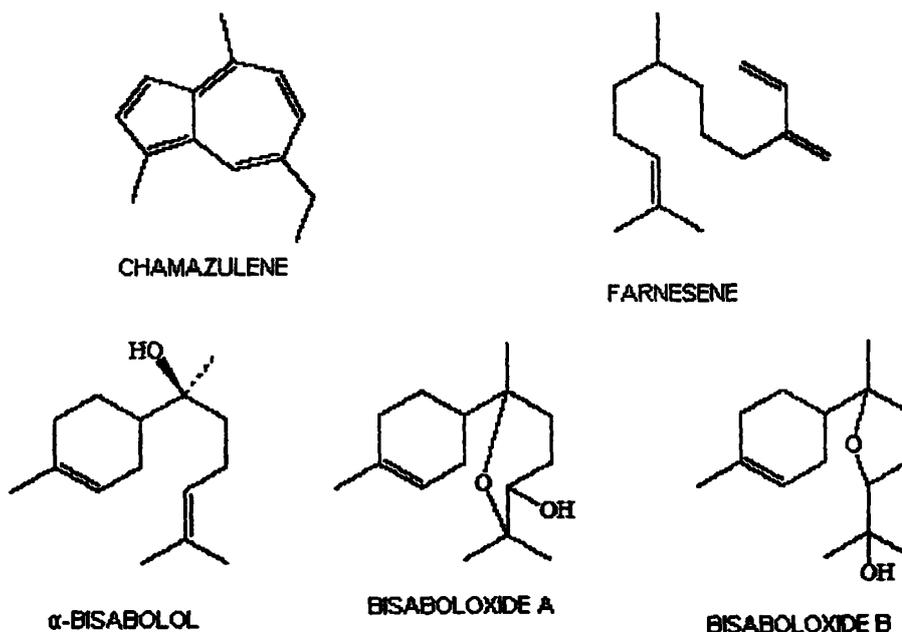


A.6.14. ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΜΠΛΕ ΧΑΜΟΜΗΛΙΟΥ

Το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού λαμβάνεται από τα άνθη και τα μισχωτά τμήματα φυτών του είδους *Chamomilla recutita* L. (συν. *Matricaria recutita*, *Matricaria chamomilla*) της οικογένειας των Συνθέτων (*Asteraceae* ή *Compositae*) που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα φυτά παγκοσμίως (Schulz και συν., 2003a). Ενδημεί στην Ευρώπη και στη Δ. Ασία και αναφέρεται επίσης με τα ονόματα German chamomile και Hungarian chamomile (McKay και Blumberg, 2006).

Τα κύρια συστατικά του ελαίου, που βρίσκεται σε ποσοστό 0,4-2% στα άνθη της δρόγης, είναι το σεσκιτερπένιο α-bisabolol με τα οξειδιά του ($\leq 78\%$) και τα παράγωγα αζουλενίου, συμπεριλαμβανομένου του χαμαζουλενίου (chamazulene) (1-15%) (Σχήμα 8) (Szentmihalyi και συν., 2001, Ganzera και συν., 2006, McKay και Blumberg, 2006). Σε αντίθεση με τα οξειδιά του, το σεσκιτερπένιο α-bisabolol καθώς και το χαμαζουλένιο προσφέρουν τα καλύτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά της σύστασης του αιθέριου ελαίου (Piccaglia και Marotti, 1993).

Σχήμα 8: Μοριακές δομές χημικών συστατικών αιθέριου ελαίου χαμομηλιού (Ganzera και συν., 2006).



Το έλαιο έχει χαρακτηριστικό άρωμα και πικρή γεύση, ενώ το βαθύ μπλε χρώμα του οφείλεται στην παρουσία του χαμαζουλένιου. Σήμερα τα έλαια που είναι πλούσια σε *a-bisabolol* προτιμούνται στο εμπόριο λόγω των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων των σεσκιτερπενικών τους συστατικών (Schulz και συν., 2003a).

Το έλαιο παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση, ήπια αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση και η εμπορική χρήση του αφορά καλλυντικά προϊόντα (σαπούνια, λοσιόν, κρέμες), απορρυπαντικά, προϊόντα ζαχαροπλαστικής και αρτοποιίας, αλκοολούχα ποτά και αρωματικά αφεψήματα. Η αντιμικροβιακή του δράση είναι ασθενής, κάτι που προκύπτει από αρκετές μελέτες, όπως η αντίστοιχη των McKay και Blumberg (2006) όπου η αντιμικροβιακή ισχύς υπολείπονταν αρκετά της αντίστοιχης δράσης που επέδειξαν τα έλαια μέντας, γαρύφαλλου, κανέλας και θυμαριού έναντι Gram(+) και Gram(-) βακτηρίων.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



B.1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων έναντι διαφόρων μικροβιακών στελεχών, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο οι παραπάνω ουσίες μπορούν να αποτελέσουν ανανεώσιμη πηγή για την ανακάλυψη νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων και συντηρητικών τροφίμων.

Συγκεκριμένα μελετήθηκε η δράση των αιθέριων ελαίων βασιλικού, θυμαριού, ρίγανης, τειόδενδρου και χαμομηλιού έναντι ευαίσθητων και πολυανθεκτικών βακτηριακών στελεχών και μυκήτων που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα, τρόφιμα και νερά, καθώς και έναντι πρότυπων στελεχών.

Παράλληλα έγινε συγκριτική μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ελαίων μεταξύ των πρότυπων στελεχών και των κλινικών βακτηριακών στελεχών και μυκήτων.



B.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.2.1. ΥΛΙΚΑ

B.2.1.1. Μικροβιακά στελέχη

Εξετάσθηκαν:

- 41 κλινικά στελέχη βακτηρίων, στην πλειοψηφία τους πολυανθεκτικά, που απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς
- 12 κλινικά στελέχη μυκήτων, που απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς
- 11 στελέχη από τρόφιμα και νερά (ένα στέλεχος ανά τρόφιμο και νερό)
- 9 πρότυπα στελέχη ATCC

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν :

- 6 κλινικά στελέχη *Acinetobacter baumannii*, πολυανθεκτικά, 2 εκ των οποίων παράγγααν metallo beta- lactamases (MBLs)
- 5 κλινικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, τα οποία παράγγααν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες (extended spectrum beta-lactamases, ESBLs)
- 2 κλινικά στελέχη *Enterobacter aerogenes*, που παράγγααν κεφαλοσπορινάσες (high level cefalosporinases)
- 5 κλινικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*, πολυανθεκτικά
- 4 κλινικά στελέχη *Salmonella enteritidis*
- 2 κλινικά στελέχη *Escherichia coli*, που παράγγααν ESBLs
- 6 κλινικά στελέχη *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA)
- 4 κλινικά στελέχη *Streptococcus pyogenes*
- 2 κλινικά στελέχη *Enterococcus faecium* vancomycin-resistant (VRE)
- 1 κλινικό στέλεχος *Morganella morganii*
- 1 κλινικό στέλεχος *Staphylococcus epidermidis* methicillin-resistant
- 1 κλινικό στέλεχος *Pantoea agglomerans*
- 1 κλινικό στέλεχος *Streptococcus agalactiae*
- 1 κλινικό στέλεχος *Enterobacter cloacae*
- 4 κλινικά στελέχη *Candida albicans*
- 5 κλινικά στελέχη *Candida parapsilosis*
- 2 κλινικά στελέχη *Candida tropicalis*
- 1 κλινικό στέλεχος *Candida glabrata*.



Η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε το διάστημα 2004-2006, από κλινικά δείγματα ούρων (n=10), τραύματος (n=17), κοπράνων (n=3), αίματος (n=7), πύου (n=1), αγγειακών καθετήρων (n=2) και πλευριτικού υγρού (n=1), ασθενών νοσηλευόμενων στη Μ.Ε.Θ (n=9), Παθολογική κλινική (n=4), Ορθοπαιδική κλινική (n=2), Παιδιατρική κλινική (n=3), Νευροχειρουργική κλινική (n=4), Χειρουργική κλινική (n=4), Ογκολογική κλινική (n=2), Αιματολογική κλινική (n=3), Νευρολογική κλινική (n=3), Καρδιοχειρουργική κλινική (n=1), Καρδιολογική κλινική (n=1) και Εξωτερικά ιατρεία (n=5) του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Η απομόνωση των στελεχών του γένους *Candida* spp πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάστημα από κλινικά δείγματα αίματος (n=8), ούρων (n=2), φαρυγγικού επιχρίσματος (n=1) και τραύματος (n=1), ασθενών νοσηλευόμενων στην Παθολογική κλινική (n=4), Παιδιατρική κλινική (n=1), Νευροχειρουργική κλινική (n=4), Χειρουργική κλινική (n=1) και Ογκολογική κλινική (n=2), του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Επίσης μελετήθηκαν τα εξής στελέχη που είχαν απομονωθεί από διάφορα τρόφιμα και νερά το διάστημα 2000-2007:

- 5 στελέχη *Listeria monocytogenes*, που απομονώθηκαν, τα τρία από ψάρια (κέφαλος, σολομός, καπνιστή πέστροφα) και τα δύο από νερά ποταμών της Ηπείρου
- 1 στέλεχος *Listeria innocua*, που απομονώθηκε από το νερό του ποταμού Καλαμά της Ηπείρου
- 2 στελέχη *Yersinia enterocolitica*, που απομονώθηκαν από μοσχαρίσιο κρέας και παστεριωμένο γάλα αντίστοιχα
- 1 στέλεχος *Staphylococcus aureus* που απομονώθηκε από μοσχαρίσιο κιμά
- 1 στέλεχος *Escherichia coli* που απομονώθηκε από παστεριωμένο γάλα και
- 1 στέλεχος *E. coli* 0157:H7 που απομονώθηκε από χωριάτικο λουκάνικο.

Τέλος εξετάστηκαν τα πρότυπα στελέχη από το American Type Culture Collection (ATCC), *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 51299, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. oxytoca* ATCC 700324, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *S. epidermidis* ATCC 12228, *C. albicans* 10231 (Becton Dickinson, Diagnostic Systems, France).

Για την ταυτοποίηση των στελεχών και τον έλεγχο ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK II (Bio-Merieux, France), η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ Bauer-Kirby (Αρσένη 1994, Lorian 2005, CLSI, 2006, Koneman, 2006) και



η μέθοδος προσδιορισμού της MIC με τη χρήση ταινιών που φέρουν διαβάθμιση πυκνότητας, E-test (De La Maza 2001, Lorian, 2005, Koneman, 2006).

B. 2.1.2. Αιθέρια έλαια

Χρησιμοποιήθηκαν τα αιθέρια έλαια:

- ρίγανης (Origanum oil FCC, W282812, *Thymus capitatus*, ισπανικής προέλευσης, Lot N. 21417CI-154),
- βασιλικού (Basil oil FCC, comoric type, W211907, *Ocimum basilicum*, Lot. N. 06903BS-184),
- τεϊόδενδρου (Tea tree oil, W390208, *Melaleuca alternifolia*, προέλευσης Αυστραλίας, Lot. N. 04823EB-275),
- θυμαριού (Thyme oil-white, FCC, Kosher, W306509, *Thymus vulgaris*, Lot. N. 04106JC-056) και,
- μπλε χαμομηλιού (Chamomile blue oil, W227307, *Matricaria chamomila*, αιγυπτιακής προέλευσης, Lot. N. 21927PI-154).

Όλα τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany.

Μέθοδος παρασκευής τους αποτελεί η μέθοδος απόσταξης με υδρατμούς (steam distillation method).

B.2.2. ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ

B.2.2.1. Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων

B.2.2.1.1. GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry)

Η τεχνική που χρησιμοποιήσαμε ήταν η αέρια χρωματογραφία. Το βασικότερο πλεονέκτημα αυτής είναι ο συνδυασμός της με ανιχνευτές εκλεκτικούς ως προς τις διάφορες χημικές κατηγορίες ενώσεων. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, ECD), αζώτου-φωσφόρου (Nitrogen Phosphorus Detector, NPD) και θερμοιονικής φλόγας (Flame Thermionic Detector, FTD) (Σακκάς, 2002).

Χρησιμοποιήσαμε μέθοδο αέριας χρωματογραφίας και φασματογραφίας μάζας (GC-MS). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επιτυγχάνεται συνήθως με τη χρήση τριχοειδών (capillary) στηλών, οι οποίες πλεονεκτούν στη διαχωριστική ικανότητα και την ευαισθησία.



Συνήθως χρησιμοποιούνται οι DB-1, DB-5 και Carbowax, με βάση το πληρωτικό υλικό πολυσιλοξάνιο (Σακκάς, 2002).

B.2.2.1.2. Χρωματογραφικές συνθήκες

Η ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ελέγχου Ρύπανσης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος, του Τομέα Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριου χρωματογράφου Shimadzu με ανιχνευτή μάζας εφοδιασμένο με στήλη DB-5MS (J&W Scientific) μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,32 mm, επικαλυμμένη με υλικό 95% phenyl και 5% methylpolysiloxane με πάχος φιλμ 0,25 μm. Το πρόγραμμα ανόδου θερμοκρασίας της στήλης που χρησιμοποιήθηκε με βάση το βέλτιστο χρωματογραφικό διαχωρισμό (Sakkas και συν., 2004) ήταν: 55°C μέχρι 200°C με ρυθμό αύξησης 5°C /λεπτό. Από 200°C μέχρι 210°C με ρυθμό αύξησης 1°C /λεπτό και παραμονή για 2 λεπτά και στους 270°C με ρυθμό αύξησης 20°C /λεπτό και παραμονή για 3 λεπτά. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 240°C, ενώ η πηγή ιόντων είχε θερμοκρασία 290°C και τα φάσματα μάζας ελήφθησαν στα 70 eV.

B.2.2.2. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριων ελαίων

B.2.2.2.1. Μέθοδος

Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων έναντι των βακτηριακών στελεχών και των στελεχών *Candida* spp που επιλέχθηκαν μελετήθηκε με τη μέθοδο των αραιώσεων σε ζωμό (broth dilution method), που αποτελεί παραλλαγή της αντίστοιχης μεθόδου όπως αυτή περιγράφεται από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), και θεωρείται μία από τις πιο ακριβείς για τον έλεγχο της ευαισθησίας αποτελώντας μέθοδο αναφοράς (CLSI, 2006).

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η μακρομέθοδος (macrodilution method) με την οποία προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) και η ελάχιστη βακτηριοκτόνος πυκνότητα (MBC) για κάθε αιθέριο έλαιο, καθώς και η κινητική της θανάτωσης των βακτηρίων (time-kill kinetic) (Carson και συν., 2002, Opalchenova και Obreshkova, 2002) με την καταμέτρηση αποικιών σε άγαρ (viable counts) και τη μέτρηση της απορρόφησης (absorbance) των διαλυμάτων σε μήκος κύματος (μ.κ) 600 nm (optical density method), με τη χρήση φασματοφωτομέτρου Jenway Spectrophotometer 6305 (Jenway, Essex, England) (Nazer και συν., 2005, Si και συν., 2006).



Για τους μύκητες έγινε προσδιορισμός της MIC με την καταμέτρηση αποικιών σε άγαρ (viable counts) και τη μέτρηση της απορρόφησης (absorbance) σε $\mu\text{.κ}$ 530 nm (optical density method) με τη χρήση φασματοφωτομέτρου Jenway Spectrophotometer 6305.

B.2.2.2.2. Θρεπτικά υποστρώματα

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο ζωμός Mueller Hinton Broth (MHB, CM0405, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England), και το άγαρ Mueller Hinton Agar (MHA, CM0337, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) για τα βακτήρια, ο ζωμός Sabouraud Broth- 2% dextrose (SB, 1.08339, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) και το άγαρ Sabouraud dextrose Agar (SA, 210950, Becton Dickinson and Company, Cockeysville, USA) για τους μύκητες.

- Ο θρεπτικός ζωμός MHB είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Beef, dehydrated infusion from 300

Casein hydrolysate 17,5

Starch 1,5

Για την παρασκευή του MHB αναμίχθηκαν 21 gr έτοιμης σκόνης (CM0405, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) σε 1 lt απιονισμένου νερού μέχρι πλήρους διάλυσης. Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min. Το pH του ζωμού ήταν $7,3\pm 0,1$ στους 25°C .

- Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MHA είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Beef, dehydrated infusion from 300

Casein hydrolysate 17,5

Starch 1,5

Agar 17,0

Για την παρασκευή του υποστρώματος προσθέσαμε 38 gr έτοιμης σκόνης (CM0337, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) σε 1 lt αποσταγμένου νερού, θερμάναμε μέχρι βρασμού και πλήρους διάλυσης και ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min (pH= $7,3\pm 0,1$), παραμονή σε υδατόλουτρο μέχρι πτώσεως της θερμοκρασίας στους 55°C και διανομή σε τρυβλία πετρί διαμέτρου 10 cm.



- Ο θρεπτικός ζωμός Sabouraud Broth είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Peptone from meat 5,0

Peptone from casein 5,0

D(+) Glucose 20,0

Για την παρασκευή του SB αναμίχθηκαν 30 gr έτοιμης σκόνης (1.08339, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) σε 1 lt απιονισμένου νερού μέχρι πλήρους διάλυσης. Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min. Το pH του ζωμού ήταν 5,6±0,2 στους 25°C.

- Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SA είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Pancreatic Digest of Casein 5,0

Peptic Digest of Animal Tissue 5,0

Dextrose 40,0

Agar 15,0

Για την παρασκευή του υποστρώματος προσθέσαμε 65 gr έτοιμης σκόνης (210950, Becton Dickinson and Company, Cockeysville, USA) σε 1 lt αποσταγμένου νερού, θερμάναμε μέχρι βρασμού και πλήρους διάλυσης για 1 min και ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min (pH=5,6±0,2), παραμονή σε υδατόλουτρο μέχρι πτώσεως της θερμοκρασίας στους 55°C και διανομή σε τρυβλία πετρί διαμέτρου 10 cm.

B.2.2.2.3. Παρασκευή διαλυμάτων διαδοχικών αραιώσεων του αιθέριου ελαίου

Για τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκε σειρά 10 αποστειρωμένων σωληναρίων (13x100 mm) με πώμα, σε καθένα από τα οποία προστέθηκαν άσηπτα:

α. θρεπτικός ζωμός Mueller Hinton Broth (CM0405, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England),

β. Tween-20 0,5% (SERVA, Cat. No. 39796, FeinBiochemica, Heidelberg, Germany), (Mann και Markham, 1997, Hammer και συν., 1999, Candan και συν., 2003) και

γ. Bacteriological agar no.1 0,05% (LP0011, Oxoid, LTD, Basingstoke, Hampshire, England), (Mann και Markham, 1997, Burt και Reinders, 2002).

Στη συνέχεια από το πυκνό (stock) διάλυμα κάθε αιθέριου ελαίου παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα εργασίας 8% (v/v), από το οποίο έγιναν διαδοχικές αραιώσεις από 4% (v/v) έως 0,008% (v/v), με τελικό όγκο 3ml σε κάθε ένα από τα παραπάνω σωληνάκια.



Για τους μύκητες χρησιμοποιήθηκε επίσης σειρά 10 αποστειρωμένων σωληναρίων (13x100 mm) με πόμα, στα οποία προστέθηκαν άσηπτα θρεπτικός ζωμός Sabouraud Broth (1.08339, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) και Tween-20 0,5% (SERVA, Cat. No. 39796, FeinBiochemica, Heidelberg, Germany). Στη συνέχεια από το πυκνό (stock) διάλυμα κάθε αιθέριου ελαίου παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα εργασίας 8% (v/v), από το οποίο έγιναν διαδοχικές αραιώσεις από 4% (v/v) έως 0,008% (v/v), με τελικό όγκο 3ml σε κάθε ένα από τα παραπάνω σωληνάρια.

Το Tween-20 (polyoxyethylene 2 sorbitan monolaurate) ενισχύει τη διαλυτότητα του ελαίου, χωρίς να επηρεάζει την αντιμικροβιακή του δράση, αφού δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το μικροοργανισμό (Mann και Markham, 1997, Supprakul και συν., 2003).

Το Bacteriological agar τέλος, σύμφωνα με τους Burt και Reinders (2002), παρεμποδίζει το διαχωρισμό του ελαίου από το διαλυτικό μέσο για τουλάχιστον 24 ώρες.

B.2.2.2.4. Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος

Για τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήσαμε 24ωρα ή 48ωρα (για τα βραδέως αναπτυσσόμενα μικρόβια) καθαρά καλλιεργήματα για την παρασκευή εναιωρήματος θολερότητας ίσης με το πρότυπο Mc Farland 0,5 (Vitek Densichek, bioMerieux, Marcy l' Etoile, France), που αντιπροσωπεύει περίπου $1-1,5 \times 10^8$ cfu/ml (Isenberg, 2004, CLSI, 2006).

Η απορρόφηση του εν λόγω εναιωρήματος ποικίλλει από 0,080 έως 0,100 σε μ.κ 600 nm (Isenberg, 2004).

Από το μικροβιακό εναιώρημα προστέθηκε όγκος 10 μl σε κάθε σωληνάριο (3ml) επιτυγχάνοντας τελική πυκνότητα του ενοφθαλμίσματος 5×10^5 cfu/ml.

Για τους μύκητες χρησιμοποιήσαμε 24ωρα καθαρά καλλιεργήματα για την παρασκευή εναιωρήματος θολερότητας ίσης με το πρότυπο Mc Farland 0,5 (Vitek Densichek, Biomerieux), που αντιπροσωπεύει περίπου 1×10^6 έως 5×10^6 cells/ml (CLSI, 2002). Από το αρχικό ενοφθάλμισμα έγινε αραιώση 1:100 και η τελική πυκνότητα που ενοφθαλμίστηκε στα σωληνάρια ήταν $0,5 \times 10^3$ έως $2,5 \times 10^3$ cells/ml (Manohar και συν., 2001, CLSI, 2002, Hammer και συν., 2003).

Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν:

- ένα σωληνάριο χωρίς ενοφθάλμισμα και αιθέριο έλαιο ως τυφλό για το φωτόμετρο.
- σειρά σωληναρίων με ζωμό και αιθέριο έλαιο σε υποδιπλάσιες αραιώσεις από 4% (v/v) έως 0,008% (v/v), που επωάστηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα εξεταζόμενα δείγματα και



χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ελαίου στις μετρήσεις που έγιναν με το φωτόμετρο μετά από 24 ώρες επώασης.

-ένα σωληνάριο με ζωμό και ενοφθάλμισμα που επώασθη στους 37°C και 35°C για 24h για τα βακτήρια και τους μύκητες αντίστοιχα και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας του μικροοργανισμού.

B.2.2.2.5. Επώαση και ανάγνωση

B.2.2.2.5.1. Βακτήρια

Τα σωληνάρια επώασθηκαν στους 37°C αεροβίως, ενώ παράλληλα στις 0, 1, 3, 6, 8, 12, 24 και 48 ώρες γινόταν ενοφθάλμισμός 10 μl από κάθε αραιώση σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα (ΜΗΑ) που επωάζονταν για 18-24 ώρες στους 37°C αεροβίως.

Ο προσδιορισμός της MIC έγινε με δύο τρόπους:

α. Με την ανάγνωση των τρυβλίων όλων των αραιώσεων που εμβολιάσθηκαν μετά από 24 h επώασης. Η μικρότερη αραιώση του ελαίου για την οποία δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μικροοργανισμού αποτέλεσε την MIC, αφού λόγω της προσθήκης του αιθέριου ελαίου ήταν αδύνατη η εκτίμηση διαυγών σωληναρίων και κατ' επέκταση ο προσδιορισμός της με αυτό το κριτήριο (κυρίως για τις υψηλές συγκεντρώσεις ελαίου).

β. Με προσδιορισμό της απορρόφησης με φωτομέτρηση (Jenway 6305 Spectrophotometer) σε μ.κ 600nm για κάθε σωληνάριο της πειραματικής σειράς. Σύμφωνα με τους Si και συν. (2006) η αναστολή ανάπτυξης του μικροοργανισμού (inhibition) εκφράζεται από τον τύπο:

$$\text{inhibition}\% = \{ \text{Abs}(M) - \text{Abs}(\delta) / \text{Abs}(M) \} \times 100, \text{ όπου,}$$

Abs(M): η απορρόφηση του μάρτυρα του μικροβιακού στελέχους μετά από επώαση 24 ωρών,

Abs(δ): η διαφορά απορροφήσεων ανάμεσα στο εξεταζόμενο δείγμα συγκεκριμένης αραιώσης του ελαίου στη χρονική στιγμή $t=24$ h και του μάρτυρα του ελαίου στην ίδια αραιώση και χρονική στιγμή.

Η αραιώση του αιθέριου ελαίου για την οποία η αναστολή ανάπτυξης του μικροοργανισμού είναι μεγαλύτερη ή ίση του 90%, αποτελεί την MIC (Hammer και συν., 1996, Ponce και συν., 2003).

Η MBC προσδιορίσθηκε με ανακαλλιέργεια από όλα τα σωληνάρια της σειράς στο θρεπτικό άγαρ στις 48 h επώασης και ήταν η μικρότερη αραιώση ελαίου για την οποία δεν υπήρξε ανάπτυξη μικροοργανισμού μετά από νέα επώαση 24 h (φονεύονται τουλάχιστον το



99,9% των μικροοργανισμών ή έχουμε ανάπτυξη που δεν υπερβαίνει τις τρεις αποικίες) (Preuss και συν., 2005, Papadopoulos και συν., 2006).

B.2.2.2.5.2. Μύκητες

Τα σωληνάκια επώασθησαν στους 35°C αεροβίως για 24 h, 48 h και 7 ημέρες και από κάθε αραιώση έγινε ανακαλλιέργεια 10 μl σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα (SA) που επώασθησαν για 24 ώρες στους 35°C αεροβίως.

Ο προσδιορισμός της MIC έγινε με 2 τρόπους:

α. Με την ανάγνωση των τρυβλίων όλων των αραιώσεων, που εμβολιάστηκαν μετά από 24 h και 48 h επώασης. Η μικρότερη αραιώση του ελαίου για την οποία δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μικροοργανισμού αποτέλεσε την MIC. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο M27-A2 του CLSI (2002) μπορούμε να δεχθούμε ως MIC και την τιμή που λαμβάνουμε μετά και τις 48 ώρες επώασης, αν και σύμφωνα με τους Manohar και συν. (2001) η τιμή αυτή αποτελεί την MFC (minimal fungicidal concentration) και είναι η μικρότερη αραιώση του ελαίου για την οποία δεν παρατηρείται ανάπτυξη στελέχους *Candida spp* (αναστολή ανάπτυξης κατά 99,9% ή ανάπτυξη μικρότερη των τριών αποικιών).

β. Με τη μέτρηση της απορρόφησης κάθε σωληναρίου όλων των αραιώσεων μετά από 24 h επώασης σε μ.κ 530nm. Η συγκέντρωση του ελαίου στην οποία η απορρόφηση ήταν ίση με την αντίστοιχη της ίδιας συγκέντρωσης του σωληναρίου μάρτυρα (χωρίς ενοφθάλμισμα) αποτέλεσε την MIC.

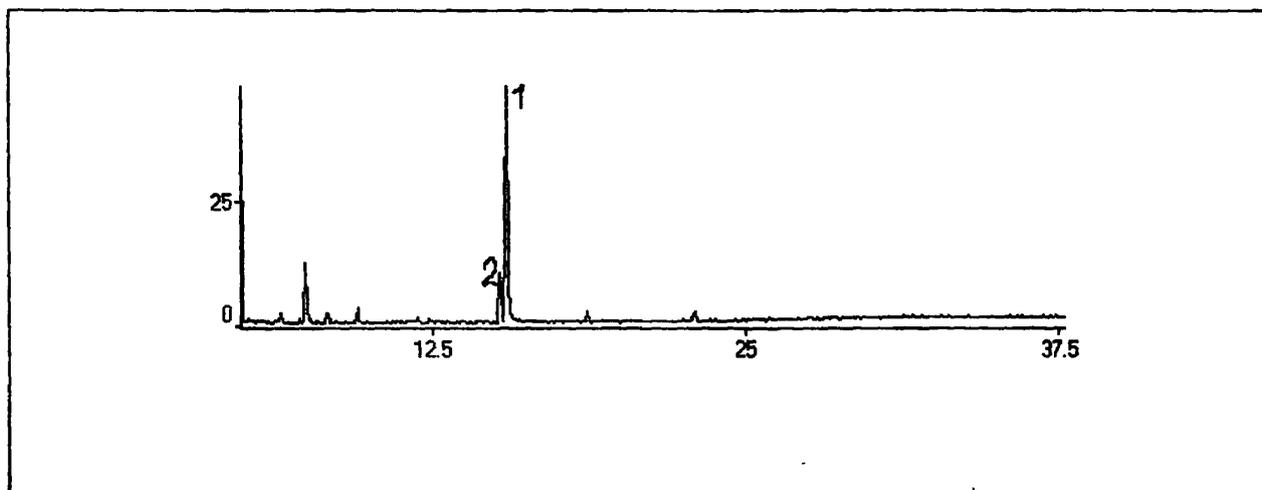


Β.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Β.3.1. ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με GC-MS ανέδειξαν τα παρακάτω δομικά συστατικά για τα αιθέρια έλαια που εξετάστηκαν:

Β.3.1.1. Αιθέριο έλαιο ρίγανης: Απομονώθηκαν η καρβακρόλη (1) (carvacrol) και η θυμόλη (2) (thymol) (Σχήμα 9) που αποτελούν τα βασικά συστατικά του ελαίου όπως προκύπτει και από αντίστοιχες μελέτες των Kokkini, 1996, Aligiannis και συν., 2001, Gounaris και συν., 2002, Valero και Salmeron, 2002, Giordani και συν., 2004, Holley και Pattel, 2004, Nostro και συν., 2004, Penalver και συν., 2005, Preuss και συν., 2005.



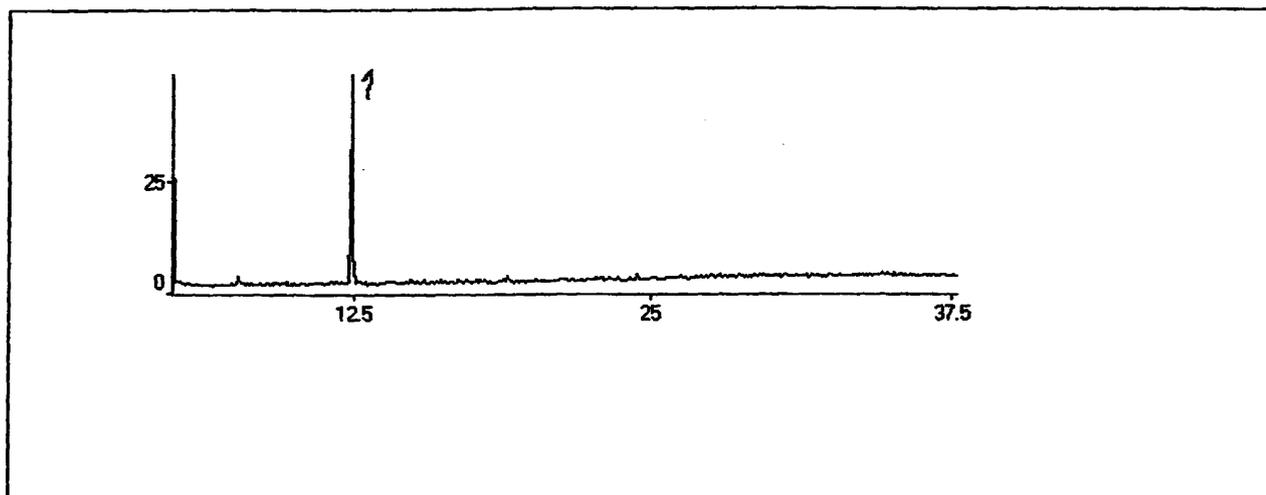
Σχήμα 9: GC-MS Origanum oil

Β.3.1.2. Αιθέριο έλαιο βασιλικού: Το κύριο συστατικό που προέκυψε από τη χρωματογραφική ανάλυση του αιθέριου ελαίου του βασιλικού ήταν η μεθυλοχαβικόλη (1) (methyl chavicol ή estragole ή 4allylanisole) (Σχήμα 10).

Το αιθέριο έλαιο του βασιλικού εμφανίζεται με διαφορετική σύσταση, εξαιτίας της ποικιλίας των παραλλαγών του φυτού, με βασικά συστατικά στη σύνθεσή του τη λιναλοόλη (linalool) (υπεύθυνη για την αντιμικροβιακή δράση του ελαίου) και τη μεθυλοχαβικόλη (methyl chavicol), μεμονωμένα ή και σε συνδυασμούς (Grayer και συν., 1996, Lachowicz και συν., 1998, Wan και συν., 1998, Oralchenova και Obreshkova, 2002, Supprakul και συν., 2003,

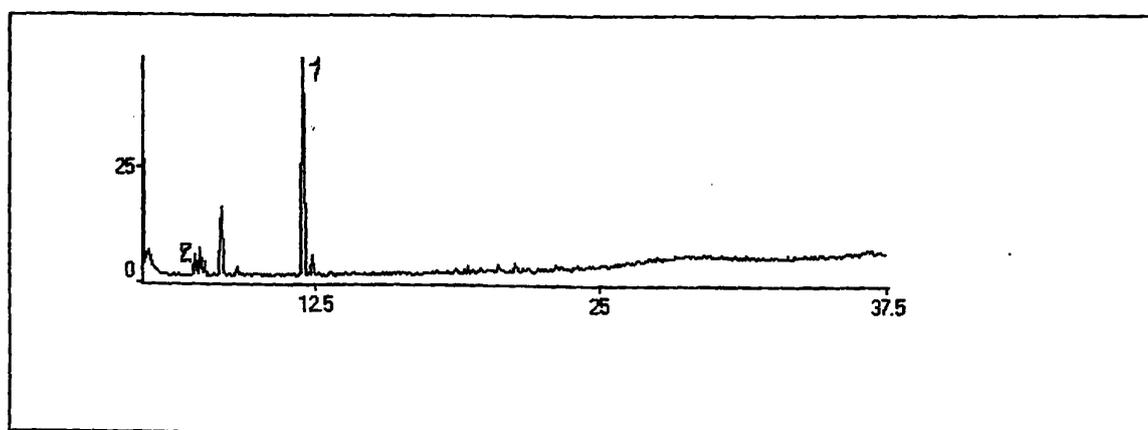


Vieira και συν., 2003, Villalobos και Acosta, 2003, Bagamboula και συν., 2004, Holley και Pattel, 2005).



Σχήμα 10: GC-MS Basil oil

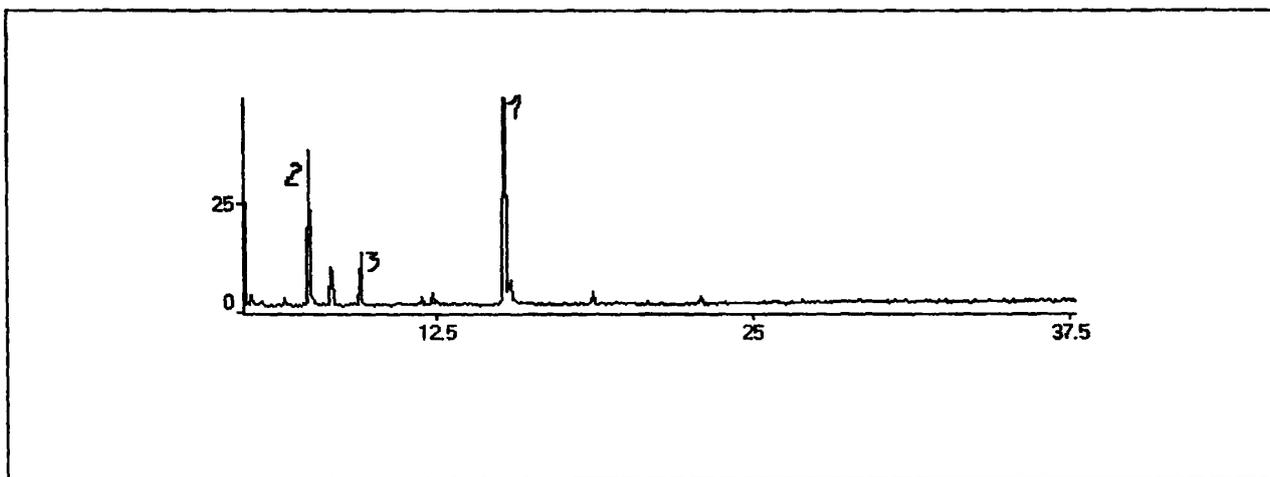
B.3.1.3. Αιθέριο έλαιο τεϊόδενδρου: Όπως προέκυψε από την ανάλυση τα κύρια συστατικά του ελαίου ήταν η τερπινεν-4-όλη (1) (terpinen-4-ol) και το π-κυμένιο (2) (p-cymene) (Σχήμα 11), κάτι που έρχεται σε πλήρη ή μερική συμφωνία με αντίστοιχες μελέτες σε διάφορες ποικιλίες τεϊόδενδρου (Hammer και συν., 1996, Carson και συν., 2002, Southwell και Russell., 2002, Candan και συν., 2003, Hammer και συν., 2003b, Halkon και Milkus, 2004, Kim και συν., 2004, Longbottom και συν., 2004).



Σχήμα 11: GC-MS Tea tree oil

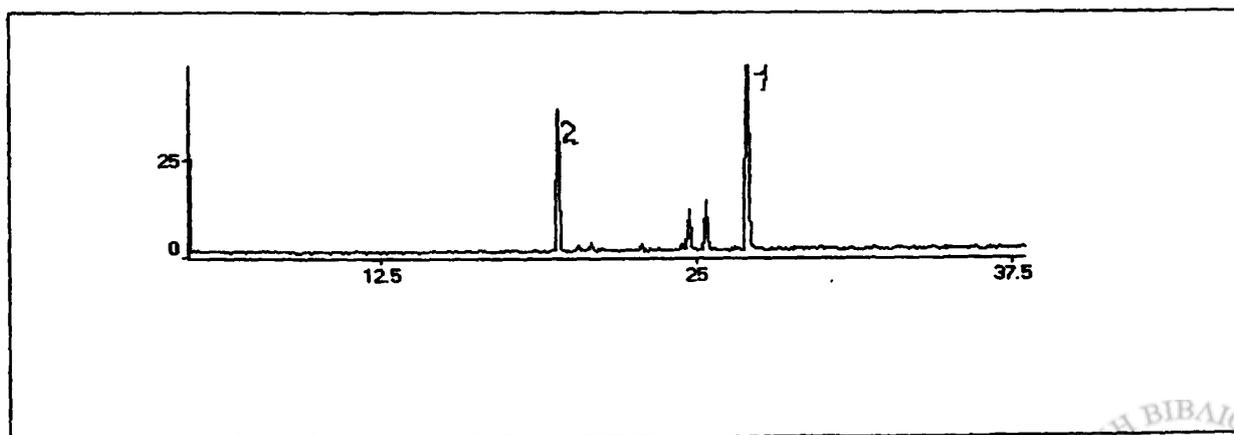
B.3.1.4. Αιθέριο έλαιο θυμαριού: Το χρωματογράφημα ανέδειξε τρία κύρια συστατικά που ήταν η θυμόλη (1) (thymol), το π-κυμένιο (2) (p-cymene) και η λιναλοόλη (3) (linalool) (Σχήμα 12).

Και σε αυτή την περίπτωση έχουν εμφανισθεί αιθέρια έλαια του συγκεκριμένου είδους *T. vulgaris* με διαφορετική σύσταση, ανάλογα με το συστατικό που επικρατεί (π.χ geraniol, α-terpineol, thuyanol-4, linalool, carvacrol, thymol, 1,8 cineole) (Guillen και Manzanos, 1998, Cosentino και συν., 1999, Valero και Salmeron, 2002, Schulz και συν., 2003a, Bagamboula και συν., 2004, Giordani και συν., 2004, Penalver και συν., 2005).



Σχήμα 12: GC-MS Thyme oil

B.3.1.5. Αιθέριο έλαιο χαμομηλιού: Τα βασικά συστατικά όπως προέκυψαν από τη χρωματογραφική ανάλυση για το έλαιο, ήταν η βισαβολόλη (1) (bisabolol) και η trans-b-farnesene (2) (Σχήμα 13) (Szentmihalyi και συν., 2000, Schulz και συν., 2003a, Ganzera και συν., 2006, Mc Kay και Blumberg, 2006).



Σχήμα 13: GC-MS Chamomile blue oil



B.3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ, ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΘΑΝΑΤΩΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ MIC ΚΑΙ MBC ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Εξετάσθηκαν συνολικά 60 βακτηριακά στελέχη, στην πλειοψηφία τους πολυανθεκτικά, που απομονώθηκαν κυρίως από κλινικά δείγματα, νερά και τρόφιμα, καθώς και πρότυπα στελέχη. Η ταυτοποίηση και ο έλεγχος ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά έγινε με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek II (bioMerieux, Marcy l' Etoile, France) και με τις μεθόδους Bauer-Kirby και E-test. Ο προσδιορισμός της MIC και MBC των πέντε αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο αραιώσεων σε ζωμό (broth macrodilution method) και τη φωτομετρική μέθοδο (optical density method), ενώ παράλληλα μελετήθηκε η κινητική θανάτωσης κάθε στελέχους ξεχωριστά. Οι πειραματισμοί έγιναν εις διπλούν.

B.3.2.1. *Acinetobacter baumannii*

Εξετάσθηκαν έξι στελέχη *A. baumannii* που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ούρων (αριθμός στελεχών 1 και 6), αίματος (αρ. 3 και αρ. 5) και τραύματος (αρ. 2 και αρ. 4). Τα δύο στελέχη (αρ. 1 και αρ. 4) παρήγαγαν metallo b-lactamases.

Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται ο έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών *A. baumannii* στα αντιβιοτικά, ενώ στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι τιμές MIC και MBC των αιθέριων ελαίων, καθώς και η τιμή της MIC με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας (OD). Στο γράφημα 1 παρουσιάζεται η σύγκριση των τιμών αυτών, ενώ στους πίνακες 4, 5, 6 και 7 η κινητική θανάτωσης των στελεχών *A. baumannii* (αρ.1, 2, 3, 4).



Πίνακας 2: Έλεγχος ευαισθησίας *A. baumannii* σε αντιβιοτικά

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ/ΣΤΕΛΕΧΗ	1 (MBL+)	2 (MBL-)	3 (MBL-)	4 (MBL+)	5 (MBL-)	6 (MBL-)
amikacin	R	R	R	R	R	R
aztreonam		R	R	R	R	
cefepime		R	R	R	R	
cefotaxime	R					R
ceftazidime	R	R	R	R		R
ciprofloxacin	R	R	R	R	R	R
gentamicin	R	I	I	I	I	S
imipenem	R	R	R	R	R	R
meropenem		R	I	I	I	
netilmicin	R	R	R	R	R	R
norfloxacin	R					R
ofloxacin	R					R
piperacillin/tazobac	R	R	R	R	R	R
ticarcillin/ca	R	R	R	R	R	R
tobramycin	R	I	I	I	I	I
trimethoprim/sulfa	R	R	R	R	R	R
nitrofurantoin	R					
ceftiofime		R	R	R	R	
isepamicin		R	R	R	R	
colistin	S	S	S	S	S	S

(R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο, I= ενδιάμεσης ευαισθησίας)

I/I-EDTA>8 για MBL(+) και I/I-EDTA<8 για MBL(-).

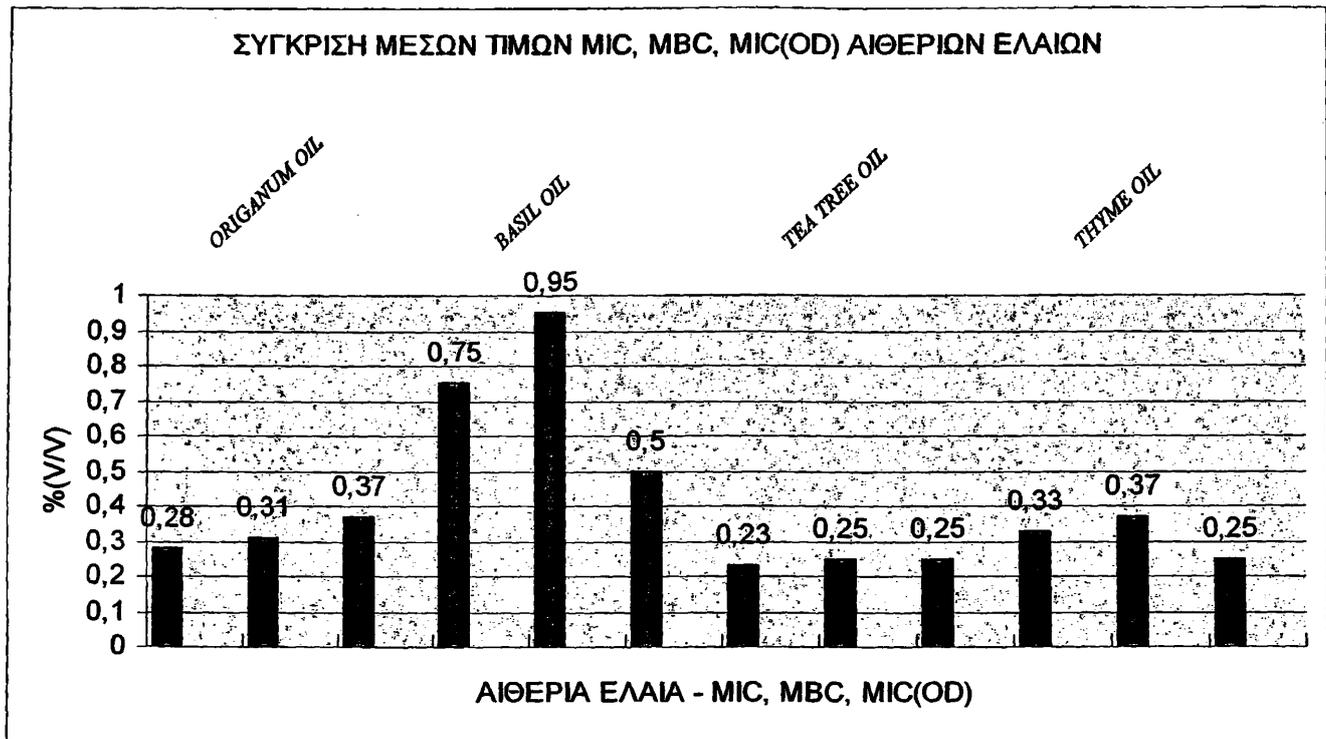
Πίνακας 3: Προσδιορισμός μέσω των τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων για τα στελέχη *A. baumannii*.

ΣΤΕΛΕΧΗ <i>A. baumannii</i> ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)
1 MBL(+)	0,25	0,37	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
2 MBL(-)	0,37	0,37	0,5	0,75	1,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,37	0,37	0,25
3 MBL(-)	0,37	0,37	NR	1,25	1,5	NR	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25
4 MBL(+)	0,25	0,25	0,5	1	1	NR	0,25	0,25	0,25	0,37	0,37	NR
5 MBL(-)	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,12	0,25	NR	0,25	0,5	NR
6 MBL(-)	0,25	0,25	NR	0,5	1	NR	0,25	0,25	NR	0,25	0,25	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,28	0,31	0,37	0,75	0,95	0,5	0,23	0,25	0,25	0,33	0,37	0,25
S.D	0,06	0,06	0,12	0,29	0,37	0	0,05	0	0	0,09	0,10	0
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	0,25	0,25	0,25	0,5-2	0,5-2	0,5	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	-0,5	-0,5	-0,5				-0,25			-0,5	-0,5	

(NR= χωρίς αποτέλεσμα , S.D= τυπική απόκλιση)



Γράφημα 1: Σύγκριση μέσων τιμών MIC, MBC, MIC (OD) για τα εξεταζόμενα αιθέρια έλαια έναντι των στελεχών *A. baumannii*



Μελετήθηκε επίσης η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου του μπλε χαμομηλιού για τρία από τα έξι στελέχη (αρ. 1, αρ. 2 και αρ. 3), με αρνητικά αποτελέσματα (MIC >4%v/v και MBC >4%v/v).

Στους πίνακες 4, 5, 6 και 7, εμφανίζεται η κινητική θανάτωσης των στελεχών *A. baumannii* (αριθμοί στελεχών 1, 2, 3 και 4). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στην κατώτερη συγκέντρωση ελαίου στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στους πίνακες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης > 10^6 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης (NR=χωρίς αποτέλεσμα).



Πίνακας 4: Κινητική θανάτωσης *A. baumannii* (αρ. 1), MBL(+)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	4x10 ⁴	10 ⁴	7,5x10 ³	0	0	0	0	4x10 ³	98,51%
0,125%	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<90%
BASIL OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	5x10 ³	8x10 ³	0	0	0	0	0	0	98,83%
0,25%	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<90%
TEA TREE OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	10 ⁴	10 ⁴	4x10 ³	3,3x10 ³	1,5x10 ³	10 ³	0	0	98,56%
0,125%	3x10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<90%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	2x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,125%	4x10 ⁴	4x10 ⁴	1,5x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<90%



Πίνακας 5: Κινητική θανάτωσης *A. baumannii* (αρ. 2), MBL(-)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2×10^4	2×10^3	0	0	0	0	0	0	92,32%
0,25%	10^6	3×10^4	10^4	8×10^3	0	0	$1,2 \times 10^3$	10^4	85,20%
0,125%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
BASIL OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	3×10^3	3×10^3	0	0	0	0	0	5×10^4	97,28%
0,5%	5×10^3	7×10^3	10^4	2×10^3	0	0	10^4	10^6	95,13%
0,25%	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
TEA TREE OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	4×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	7×10^3	10^4	3×10^3	0	0	0	0	10^2	98,69%
0,125%	$1,5 \times 10^4$	2×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	34,10%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	$5,5 \times 10^3$	8×10^3	2×10^4	2×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	100%
0,125%	$1,5 \times 10^4$	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	61,46%



Πίνακας 6: Κινητική θανάτωσης *A. baumannii* (αρ. 3), MBL(-)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	$2,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	NR
0,25%	4×10^4	$1,5 \times 10^4$	8×10^3	5×10^2	0	2×10^4	10^6	10^6	71,23%
0,125%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
BASIL OIL									
4%	2×10^4	4×10^2	0	0	0	0	0	0	
2%	2×10^4	$1,4 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	NR
1%	$1,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$	0	0	0	0	10^6	10^6	<90%
0,5%	2×10^4	10^4	3×10^2	4×10^2	$4,8 \times 10^3$	4×10^4	10^6	10^6	
0,25%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	4×10^3	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	10^4	10^4	8×10^2	0	0	0	0	0	100%
0,125%	10^4	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	10^4	10^4	$1,2 \times 10^4$	10^4	8×10^3	10^4	10^6	10^6	100%
0,125%	10^4	10^4	3×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	41,06%



Πίνακας 7: Κινητική θανάτωσης *A. baumannii* (αρ. 4), MBL(+)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	4×10^4	4×10^4	$1,2 \times 10^4$	0	0	0	0	0	76,29%
0,125%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
BASIL OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	$6,2 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	NR
0,5%	10^4	10^4	$6,2 \times 10^3$	0	0	0	$2,5 \times 10^4$	10^6	66,25%
0,25%	4×10^4	3×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	$1,7 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	
0,25%	2×10^4	2×10^4	10^4	5×10^3	$8,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	0	0	94,46%
0,125%	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	10^4	10^4	5×10^2	0	0	0	0	0	
0,25%	2×10^4	2×10^4	10^4	2×10^4	2×10^4	10^6	10^6	10^6	NR
0,125%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%



B.3.2.2. *Klebsiella pneumoniae*

Εξετάσθηκαν πέντε στελέχη *K. pneumoniae* (όλα παρήγαγαν ESBLs), που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα αγγειακού καθετήρα (αρ. 1), τραύματος (αρ. 2) και ούρων (αρ. 3, αρ. 4 και αρ. 5). Επίσης μελετήθηκε το πρότυπο στέλεχος *K. pneumoniae* ATCC 700603 καθώς και το *K. oxytoca* ATCC 700324.

Η αντιμικροβιακή δράση των ελαίων δοκιμάστηκε σε όλα τα στελέχη συμπεριλαμβανομένου του αιθέριου ελαίου του χαμομηλιού που δεν έδειξε καμία αντιμικροβιακή δράση στα τρία στελέχη που εξετάστηκε (αρ. 1, αρ. 2 και *K. oxytoca* ATCC 700324).

Στον πίνακα 8 παρουσιάζεται ο έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών *K. pneumoniae* στα αντιβιοτικά, ενώ στον πίνακα 9 παρουσιάζονται οι τιμές MIC και MBC των αιθέριων ελαίων. Στο γράφημα 2 παρουσιάζεται η σύγκριση των τιμών αυτών, ενώ στους πίνακες 10, 11 και 12 η κινητική θανάτωσης των στελεχών *K. pneumoniae* (αριθμοί στελεχών 1, 2 και 3). Τέλος στο γράφημα 3 παρουσιάζεται η σύγκριση των τιμών MIC μεταξύ των πρότυπων και κλινικών στελεχών.

Πίνακας 8: Έλεγχος ευαισθησίας στελεχών *K. pneumoniae* σε αντιβιοτικά
(R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο, I= ενδιάμεσης ευαισθησίας)

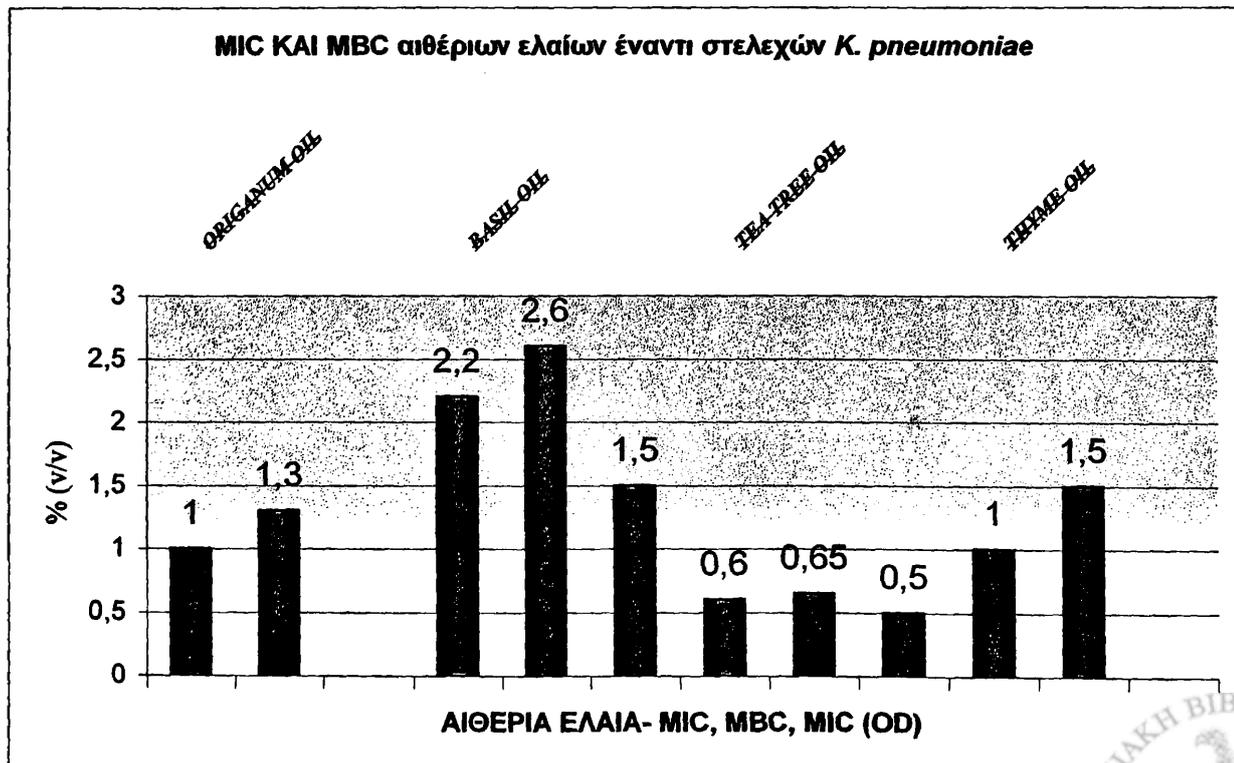
ANTIBIOTIKA/ΣΤΕΛΕΧΗ	1 (ESBL+)	2 (ESBL+)	3 (ESBL+)	4 (ESBL+)	5 (ESBL+)
amikacin	I	R	S	R	R
cefoxitin	S	S	S	S	R
cefepime					R
cefotaxime		R		R	
ceftazidime		R		R	
cephalothin		R		R	
ciprofloxacin	R	R	R	R	R
gentamicin	R	R	R	R	I
imipenem	S	S	S	S	S
meropenem					I
netilmicin	R	R	R	R	R
nalidixic acid	R	R	R	R	
ofloxacin		R	R	R	
piperacillin/tazobac					R
ticarcillin/ca		R		R	R
tobramycin	R	R	R	R	I
trimethoprim/sulfa	R	R	S	R	R
nitrofurantoin			R	R	
norfloxacin			I	R	R



Πίνακας 9: Προσδιορισμός μέσων τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων για τα στελέχη *K. pneumoniae* (NR= χωρίς αποτέλεσμα, S.D= τυπική απόκλιση).

ΣΤΕΛΕΧΗ <i>K.pneumoniae</i> ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)
1	1	1	NR	2	2	1	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5	NR
2	1	1	NR	2	2	2	0,5	0,5	0,5	1	1,5	NR
3	1	1,5	NR	3	3	NR	0,5	0,75	0,5	1	1,5	NR
4	1	2	NR	2	2	NR	0,5	0,5	NR	0,5	1	NR
5	1	1	NR	2	4	NR	1	1	NR	1	2	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	1	1,3	NR	2,2	2,6	1,5	0,6	0,65	0,5	1	1,5	NR
S.D	0	0,4	NR	0,4	0,8	0,5	0,2	0,2	0	0,32	0,32	NR
ATCC 700603	1	1	NR	1	1	1	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5	NR
<i>K.oxytoca</i> 700324	0,75	0,75	NR	2	2	2	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	NR
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	1	1-2	NR	2-4	2-4	1-2	0,5-1	0,5-1	0,5	0,5-2	1-2	NR

Γράφημα 2: Σύγκριση μέσων τιμών MIC, MBC, MIC (OD) για τα εξεταζόμενα αιθέρια έλαια έναντι των στελεχών *K. pneumoniae*

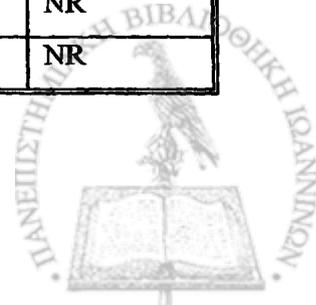


Πίνακας 11: Κινητική θανάτωσης *K. pneumoniae* (αρ. 2)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
0,5%	$1,8 \times 10^3$	0	0	0	0	7×10^3	4×10^4	10^6	NR
BASIL OIL									
2%	3×10^3	0	0	0	0	0	0	0	94,7%
1%	2×10^4	10^4	4×10^3	0	0	0	2×10^4	10^6	78,91%
TEA TREE OIL									
0,5%	$4,7 \times 10^3$	2×10^3	0	0	0	0	0	0	95,93%
0,25%	4×10^4	2×10^4	10^4	7×10^3	4×10^2	4×10^3	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
1%	0	0	0	7×10^3	10^6	10^6	0	0	NR
0,5%	8×10^2	$3,8 \times 10^3$	10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	NR

Πίνακας 12: Κινητική θανάτωσης *K. pneumoniae* (αρ. 3)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
1%	$1,2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	10^3	NR
0,5%	5×10^3	7×10^2	0	0	0	8×10^3	4×10^4	10^6	NR
BASIL OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
2%	7×10^3	0	0	0	0	0	7×10^3	10^6	NR
1%	4×10^4	2×10^4	10^4	10^4	10^4	2×10^4	10^6	10^6	<90%
TEA TREE OIL									
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2×10^3	5×10^2	0	0	0	0	0	4×10^3	100%
0,25%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
1%	5×10^2	$1,2 \times 10^3$	0	$1,3 \times 10^3$	0	0	0	0	NR
0,5%	7×10^3	$9,1 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	2×10^4	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	NR



B.3.2.3. *Enterobacter* spp.

Εξετάσθηκαν δύο στελέχη *E. aerogenes* τα οποία παρήγαγαν κεφαλοσπορινάσες (high level cephalosporinase) προερχόμενα από ούρα και ένα στέλεχος *E. cloacae* που απομονώθηκε από τραύμα. Τα στελέχη *E. aerogenes* μελετήθηκαν και ως προς την ευαισθησία τους στο αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού, στο οποίο επέδειξαν απόλυτη ανθεκτικότητα με MIC >4% (v/v) και MBC >4% (v/v).

Ο έλεγχος ευαισθησίας των βακτηριακών στελεχών στα αντιβιοτικά καταγράφεται στον πίνακα 13, οι τιμές MIC και MBC στον πίνακα 14 και η κινητική θανάτωσης και των τριών στελεχών στους πίνακες 15,16 και 17. Οι αραιώσεις των ελαίων ήταν από 0,008% έως 4%, ο χρόνος επώασης 0-48 h, οι συγκεντρώσεις ανάπτυξης εκφράστηκαν σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Οι αραιώσεις 2%-4% που δεν περιλαμβάνονται στους πίνακες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,5% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στην κατώτερη συγκέντρωση στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα.

Πίνακας 13: Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών *E. aerogenes* (αρ. 1, αρ. 2) και *E. cloacae* (R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο, I=ενδιάμεσης ευαισθησίας)

ANTIBIOTIKA/ ΣΤΕΛΕΧΗ	1 (HLC+)	2 (HLC+)	<i>E. cloacae</i>
amikacin	S	R	S
amoxicillin/Ca		R	R
cefoxitin	R	R	R
cefotaxime		R	S
ceftazidime		R	S
cephalothin			R
ciprofloxacin	R	R	S
gentamicin	I	S	S
imipenem	S	S	S
netilmicin	R	R	S
nalidixic acid	R	R	S
ofloxacin	R	R	S
piperacillin/tazobac		I	S
ticarcillin/ca		R	S
tobramycin	R	I	R
trimethoprim/sulfa	R	R	S
nitrofurantoin	R		
norfloxacin	R	R	



Πίνακας 16: Κινητική θανάτωσης *E. aerogenes* (αρ. 2)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	3x10 ³	NR
1%	0	0	0	0	0	2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	<90%
0,5%	2,7x10 ³	0	1,1x10 ³	10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
0,25%	1,5x10 ⁴	3x10 ³	9,5x10 ³	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
BASIL OIL									
4%	2,2x10 ⁴	2x10 ⁴	2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	NR
2%	2,4x10 ⁴	2x10 ⁴	3x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	NR
1%	3x10 ⁴	2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<90%
TEA TREE OIL									
1%	2,5x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2x10 ⁴	8x10 ³	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	4x10 ⁴	2x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<90%
THYME OIL									
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
1%	5x10 ²	0	0	3x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	NR
0,5%	5x10 ³	10 ⁴	2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	NR

Πίνακας 17: Κινητική θανάτωσης *E. cloacae*

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	3x10 ²	0	0	0	4,8x10 ³	2,5x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	
0,25%	10 ⁴	10 ⁴	5x10 ²	1,5x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	100%
BASIL OIL									
4%	10 ⁴	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	
2%	2x10 ⁴	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	
1%	2x10 ⁴	2x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2x10 ⁴	2x10 ⁴	3x10 ²	0	0	0	0	0	100%
0,25%	4x10 ⁴	2x10 ⁴	7x10 ³	4,4x10 ³	4x10 ³	2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	<90%
TEA TREE OIL									
4%	1,1x10 ³	4x10 ²	0	0	0	0	0	0	
2%	4,2x10 ³	7x10 ²	0	0	0	0	0	0	
1%	10 ⁴	2x10 ³	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2x10 ⁴	10 ⁴	0	0	0	0	10 ⁶	10 ⁶	100%
0,25%	2x10 ⁴	2x10 ⁴	2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<90%
THYME OIL									
2%	2x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	NR
1%	8x10 ²	0	0	10 ²	8x10 ²	3,2x10 ³	10 ⁶	10 ⁶	NR
0,5%	3,8x10 ³	10 ³	3x10 ²	5,5x10 ³	4x10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	NR



B.3.2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Εξετάσθηκαν πέντε στελέχη από κλινικά δείγματα πλευριτικού υγρού (αρ. 1), αγγειακού καθετήρα (αρ. 2), αίματος (αρ. 3) και τραύματος (αρ. 4 και αρ. 5) καθώς και το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853. Δύο από τα πέντε στελέχη (αρ. 1 και αρ. 2), καθώς και το πρότυπο μελετήθηκαν και στην επίδραση του chamomile blue oil χωρίς να παρουσιάσουν ευαισθησία (MIC >4%v/v, MBC >4%v/v).

Στον πίνακα 18 παρουσιάζεται ο έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών στα αντιβιοτικά, στον πίνακα 19 οι τιμές MIC και MBC των εξεταζόμενων ελαίων και στο γράφημα 4 η σύγκριση των μέσων τιμών τους, ενώ στο γράφημα 5 η σύγκριση των μέσων τιμών της MIC των αιθέριων ελαίων για τα στελέχη *P. aeruginosa* και το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853.

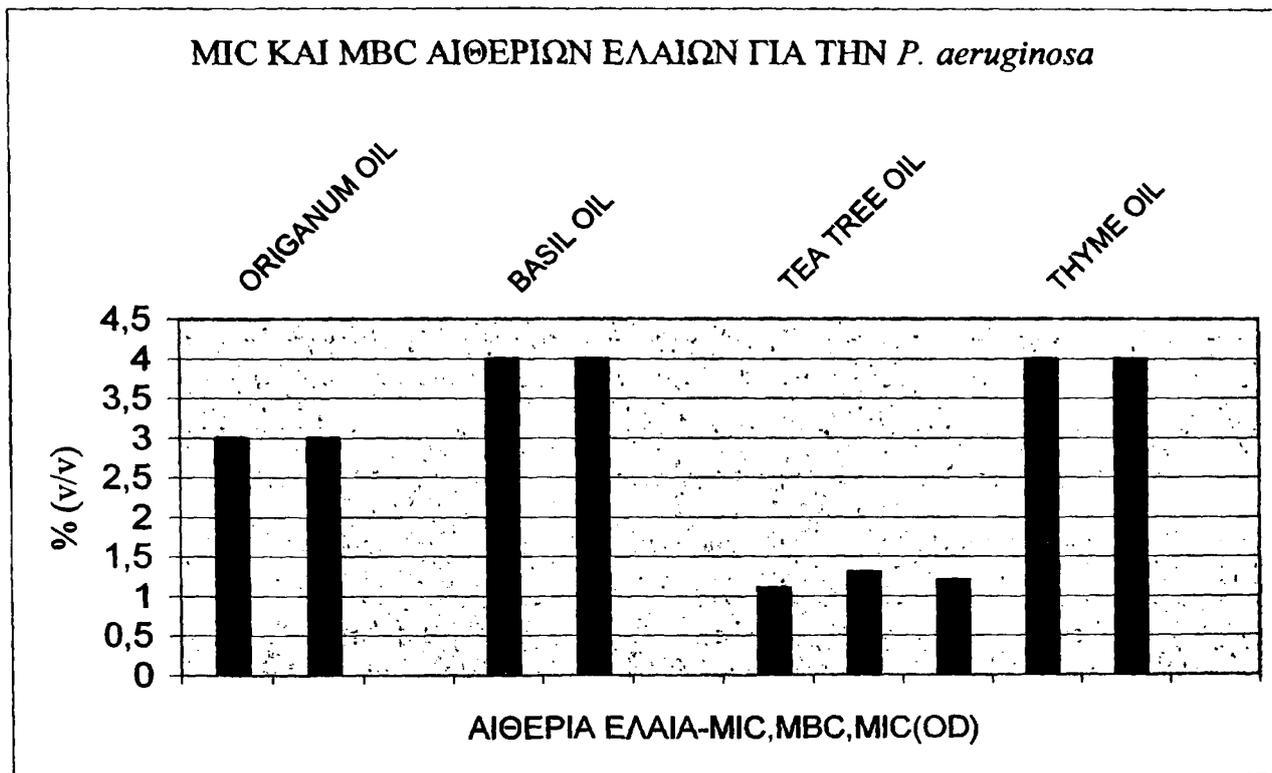
Πίνακας 18: Έλεγχος ευαισθησίας *P. aeruginosa* σε αντιβιοτικά

(R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο, I=ενδιάμεσης ευαισθησίας)

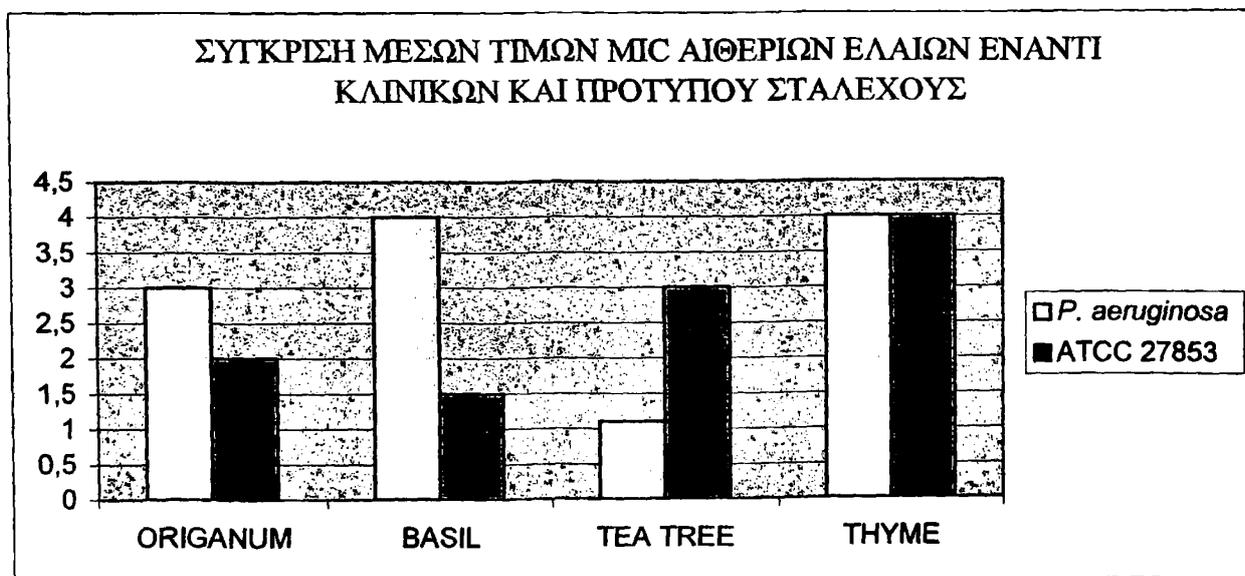
ANTIBIÓTIKA/ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>P.aeruginosa</i>	1	2	3	4	5
amikacin	R	R	R	R	R
aztreonam	R	R	I	R	R
cefepime	R	R	I	R	
cefotaxime					R
ceftazidime	R	R	R	R	R
ciprofloxacin	R	R	R	R	R
gentamicin	R	R	I	S	I
imipenem	R	R	R	R	R
meropenem	R	I	R	I	
netilmicin	R	R	I	R	R
pefloxacin	R	R	R	R	
piperacillin	R	R	S	R	R
ticarcillin	R	R	R	R	R
tobramycin	R	R	R	I	I
cefpriome	R	R	R	R	
isepamicin	R	R	R	R	
colistin	S	S	S	S	S



Γράφημα 4: Σύγκριση μέσων τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων για την *P. aeruginosa*



Γράφημα 5: Σύγκριση μέσων τιμών MIC των αιθέριων ελαίων για τα κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* και το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853



Πίνακας 19: Προσδιορισμός μέσων τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων για την

P. aeruginosa (NR= χωρίς αποτέλεσμα, SD= τοπική απόκλιση)

ΣΤΕΛΕΧΗ <i>P.aeruginosa</i> ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)
1	2	2	NR	>4	>4	NR	1	1	1	4	4	NR
2	3	3	NR	>4	>4	NR	1	1	2	4	4	NR
3	4	4	NR	4	4	NR	1,5	1,5	1	4	4	NR
4	2	2	NR	4	4	NR	1	2	1	4	4	NR
5	4	4	NR	4	4	NR	1	1	1	4	4	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	3	3	NR	4	4	NR	1,1	1,3	1,2	4	4	NR
S.D	0,9	0,9	NR	0	0	NR	0,2	0,4	0,4	0	0	NR
ATCC 27853	2	2	NR	1,5	1,5	1	3	3	2	4	4	NR
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	2->4	2->4	NR	4->4	4->4	NR	1-2	1-2	1-2	4->4	4->4	NR

Στους πίνακες 20, 21 και 22, παρουσιάζεται η κινητική θανάτωσης τριών στελεχών *P. aeruginosa* (αρ. 1, αρ. 2 και αρ. 3). Οι αραιώσεις των ελαίων ήταν από 0,008% έως 4%, ο χρόνος επώασης 0-48 h, οι συγκεντρώσεις ανάπτυξης εκφράζονται σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Οι αραιώσεις 2%-4% που δεν περιλαμβάνονται στους πίνακες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,5% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα (NR= χωρίς αποτέλεσμα).

Πίνακας 20: Κινητική θανάτωσης *P. aeruginosa* (αρ. 1)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
1%	0	0	0	0	10^4	$1,6 \times 10^3$	4×10^4	10^6	
0,5%	0	0	0	10^3	$2,1 \times 10^3$	10^6	10^6	10^6	
0,25%	4×10^3	$1,6 \times 10^3$	8×10^2	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
BASIL OIL									
4%	10^4	8×10^3	2×10^3	2×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	NR
2%	10^4	2×10^4	10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	
1%	10^6	10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
1%	3×10^3	2×10^3	10^2	0	0	0	0	0	100%
0,5%	10^4	5×10^3	3×10^3	0	0	0	10^6	10^6	67,98%
0,25%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
2%	0	0	0	0	8×10^3	10^6	10^6	10^6	
1%	6×10^2	$1,5 \times 10^3$	4×10^3	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	

Πίνακας 21: Κινητική θανάτωσης *P. aeruginosa* (αρ. 2)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
1%	0	0	0	0	0	0	10 ⁶	10 ⁶	
0,5%	0	0	0	0	0	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
0,25%	0	2,2x10 ³	5,5x10 ³	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
0,125%	7x10 ²	9x10 ³	2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
BASIL OIL									
4%	6x10 ³	10 ³	1,4x10 ³	2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	NR
2%	7,1x10 ³	3,2x10 ³	6x10 ³	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
1%	4,4x10 ³	4x10 ³	7x10 ³	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
TEA TREE OIL									
4%	5,5x10 ³	8x10 ²	0	0	0	0	0	0	
2%	1,2x10 ⁴	7x10 ³	0	0	0	0	0	0	100%
1%	2,5x10 ⁴	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	70,73%
0,5%	4x10 ⁴	2x10 ⁴	3x10 ³	0	0	0	10 ⁶	10 ⁶	
0,25%	10 ⁶	4x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
THYME OIL									
4%	6x10 ³	5x10 ³	2x10 ³	2x10 ³	7x10 ²	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	NR
2%	2x10 ⁴	2x10 ⁴	2x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
1%	4x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	

Πίνακας 22: Κινητική θανάτωσης *P. aeruginosa* (αρ. 3)

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	10 ⁶	10 ⁶	NR
2%	0	0	6x10 ³	10 ⁴	10 ⁴	2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	
1%	10 ⁴	2x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
BASIL OIL									
4%	10 ⁴	2x10 ³	0	0	0	0	0	0	NR
2%	10 ⁴	5x10 ³	0	1,2x10 ³	8x10 ²	1,2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	
1%	2x10 ⁴	2x10 ⁴	2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	3x10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	
TEA TREE OIL									
1%	6x10 ³	8x10 ²	0	0	0	0	0	0	100%
0,5%	2x10 ⁴	10 ⁴	2x10 ⁴	0	0	1,2x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	<90%
0,25%	4x10 ⁴	4x10 ⁴	2x10 ⁴	4x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	10 ⁶	10 ⁶	NR
2%	9x10 ²	0	0	0	0	2x10 ³	10 ⁶	10 ⁶	
1%	7x10 ³	1,9x10 ³	0	3x10 ³	2,1x10 ³	1,5x10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	



B.3.2.5. *Salmonella enteritidis*

Εξετάσθηκαν τέσσερα στελέχη, τρία εκ των οποίων από δείγματα κοπράνων (αρ. 1, αρ. 3 και αρ. 4) και ένα από καλλιέργεια αίματος (αρ. 2). Το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση στο ένα στέλεχος που δοκιμάστηκε (αρ. 1). Στον πίνακα 23 φαίνεται η ευαισθησία των βακτηριακών στελεχών στα αντιβιοτικά, στον πίνακα 24 ο προσδιορισμός των MIC και MBC των αιθέριων ελαίων και στο γράφημα 6 η σύγκριση των μέσων τιμών τους. Ακολουθεί στους πίνακες 25, 26, 27 και 28 η κινητική θανάτωσης όλων των στελεχών.

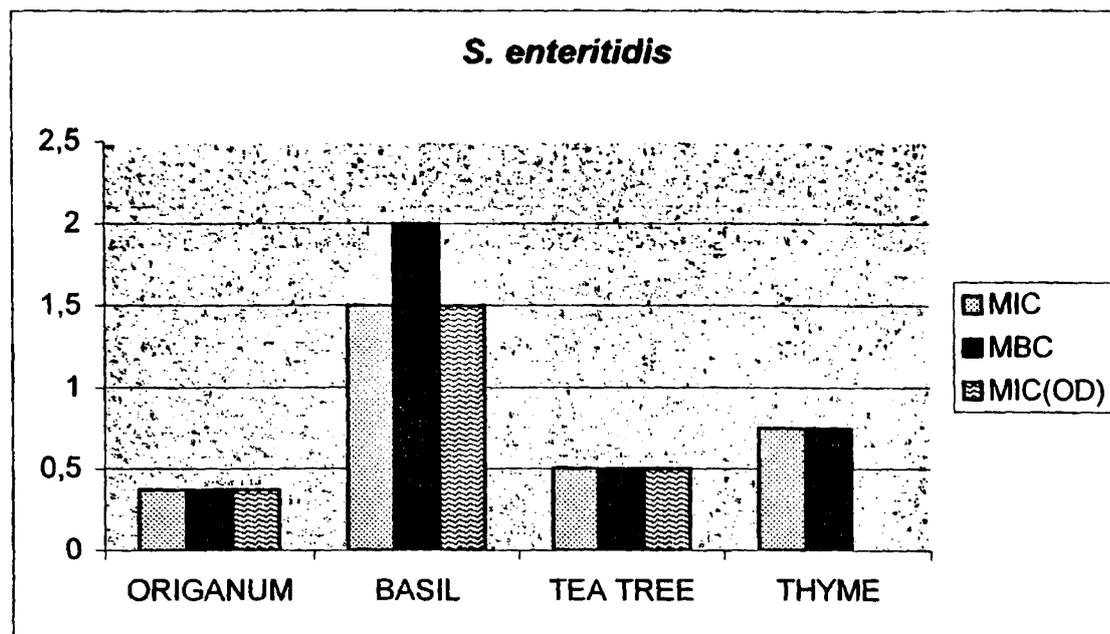
Πίνακας 23: Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά
(R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο)

ANTIBIOTIKA/ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>S. enteritidis</i>	1	2	3	4
amoxicillin/Ca	S	S	S	S
ampicillin	S	S	S	S
ciprofloxacin	S	S	S	S
nalidixic acid		S	R	S
ofloxacin	S	S	S	S
trimethoprim/sulfa	S	S	S	S

Πίνακας 24: Προσδιορισμός μέσων τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων για τη *S. enteritidis*
(NR= χωρίς αποτέλεσμα, NT= δεν εξετάστηκε, SD= τυπική απόκλιση)

ΣΤΕΛΕΧΗ <i>S. enteritidis</i> / ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)
1	0,37	0,37	0,5	2,5	2,5	NR	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	NR
2	0,5	0,5	NR	1	1,5	2	0,5	0,5	0,5	1	1	NR
3	0,37	0,37	NR	NT	NT	NT	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	NR
4	0,25	0,25	0,25	1	2	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,37	0,37	0,37	1,5	2	1,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	NR
S.D	0,10	0,10	0,12	0,7	0,41	0,5	0	0	0	0,18	0,18	NR
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	0,25- 0,5	0,25- 0,5	0,25- 0,5	1->4	1->4	1-2	0,5	0,5	0,5	0,5-1	0,5-1	NR



Γράφημα 6: Σύγκριση μέσων τιμών MIC, MBC, MIC(OD) στελεχών *S. enteritidis*

Πίνακας 25: Κινητική θανάτωσης *S. enteritidis* (αρ. 2). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Οι αραιώσεις 1%-4% που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,25% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
0,5%	5×10^3	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	64,25%
BASIL OIL									
4%	2×10^3	0	0	0	0	0	0	0	
2%	2×10^3	0	0	0	0	0	0	0	100%
1%	4×10^3	7×10^2	0	0	0	0	0	0	81,40%
0,5%	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
0,5%	6×10^3	2×10^3	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	2×10^4	2×10^4	2×10^4	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
0,5%	2×10^4	2×10^4	2×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	



Πίνακας 28

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	2×10^4	8×10^3	0	0	0	0	0	0	94,80%
BASIL OIL									
4%	4×10^3	0	0	0	0	0	0	0	
2%	4×10^3	7×10^2	0	0	0	0	0	0	
1%	10^4	$1,2 \times 10^3$	0	4×10^2	0	0	0	6×10^2	100%
0,5%	2×10^4	2×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
TEA TREE OIL									
1%	4×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2×10^3	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	2×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	54,07%
THYME OIL									
0,5%	2×10^3	0	0	0	0	0	0	0	NR
0,25%	2×10^4	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%

B.3.2.6. *Escherichia coli*

Εξετάσθηκαν δύο στελέχη *E. coli* που παρήγαγαν ESBLs και απομονώθηκαν από δείγματα αίματος (αρ. 1) και τραύματος (αρ. 2), ένα στέλεχος από δείγμα παστεριωμένου γάλακτος (αρ. 3), ένα στέλεχος *E. coli* 0157:H7 από δείγμα χωριάτικου λουκάνικου (αρ. 4) και το πρότυπο στέλεχος *E. coli* ATCC 25922. Το αιθέριο έλαιο του μπλε χαμομηλιού δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι του στελέχους (αρ. 1) και του πρότυπου *E. coli* ATCC 25922 στα οποία δοκιμάστηκε. Τα δύο στελέχη που απομονώθηκαν από τρόφιμα επώασθηκαν περαιτέρω και ανακαλλιεργήθηκαν την 4^η και 7^η ημέρα της επώασης, χωρίς να μεταβληθεί η βιωσιμότητά τους στις αντίστοιχες αραιώσεις των αιθέριων ελαίων.

Στον πίνακα 29 παρουσιάζεται ο έλεγχος ευαισθησίας των παραπάνω βακτηριακών στελεχών στα αντιβιοτικά, στον πίνακα 30 οι τιμές MIC και MBC των εξεταζόμενων ελαίων, ενώ η σύγκριση των τιμών MIC φαίνεται στο γράφημα 7. Τέλος στους πίνακες 31, 32, 33 και 34 παρουσιάζεται η κινητική θανάτωσης τεσσάρων βακτηριακών στελεχών.



Πίνακας 29: Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

(R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο, I=ενδιάμεση ευαισθησίας)

ANTIBIOTIKA/ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>E. coli</i>	1 ESBL(+)	2 ESBL(+)	3 ΓΑΛΑ	4 0157:H7
amikacin	S	S	R	S
cefoxitin	S	S	S	
cefotaxime			S	
ceftazidime			S	
ciprofloxacin	R	S	S	S
gentamicin	R	S	S	S
imipenem	S	S		
netilmicin	R	S		
ofloxacin	R	R		S
nalidixic acid	R	R	S	S
tobramycin	I	S	S	
trimethoprim/sulfa	S	S	S	S
ampicillin			S	S
amoxicillin/Ca			S	S

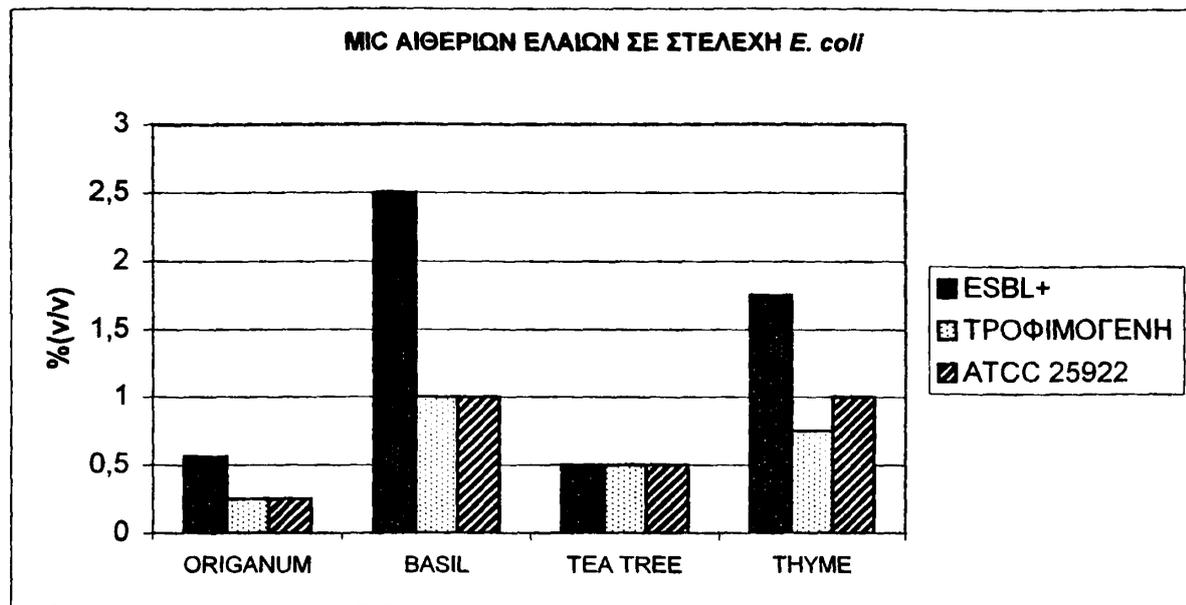
Πίνακας 30: Προσδιορισμός μέσω των τιμών MIC και MBC αθέριων ελαίων για τα στελέχη

E. coli (NR= χωρίς αποτέλεσμα, SD= τυπική απόκλιση)

ΣΤΕΛΕΧΗ <i>E. coli</i> ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)
1. ESBL+	0,37	0,37	0,5	>4	3	NR	0,5	0,5	0,5	1	1	NR
2. ESBL+	0,75	0,75	NR	1	1	1	0,5	0,5	0,5	2,5	2,5	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ <i>E. coli</i> ESBL+	0,56	0,56	0,5	2,5	2	1	0,5	0,5	0,5	1,75	1,75	NR
3. ΓΑΛΑ	0,25	0,25	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	NR
4 .0157H7	0,25	0,25	0,5	1	1	1	0,5	0,5	1	1	1	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ <i>E. coli</i> (ΤΡΟΦΙΜΑ)	0,25	0,25	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,40	0,40	0,50	1,75	1,50	1	0,5	0,5	0,62	1,25	1,25	NR
S.D	0,21	0,21	0	1,29	0,86	0	0	0	0,22	0,75	0,75	NR
ATCC 25922	0,25	0,25	0,25	1	1	1	0,5	0,5	1	1	1	NR
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	0,25-1	0,25-1	0,25 -0,5	1->4	1->4	1	0,5	0,5	0,5	0,5-4	0,5-4	NR



Γράφημα 7: Σύγκριση των τιμών MIC έναντι των στελεχών *E. coli* και του *E. coli* ATCC 25922



Πίνακες 31,32: Κινητική θανάτωσης *E. coli* (αρ. 1,αρ. 2). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Οι αραιώσεις 1%-4% που δεν περιλαμβάνονται στους πίνακες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,5% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα.

Πίνακας 31

OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
ORIGANUM OIL									
0,5%	2×10^3	0	0	0	0	0	0	0	95,78%
0,25%	10^4	7×10^3	9×10^3	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
BASIL OIL									
4%	2×10^4	7×10^3	$1,3 \times 10^4$	2×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	NR
2%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
1%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
0,5%	10^6	3×10^4	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	10^6	10^6	10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
0,5%	0	0	0	3×10^2	$6,3 \times 10^3$	10^6	10^6	10^6	NR

Πίνακας 32

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
1%	3×10^3	0	0	0	0	0	0	0	NR
0,5%	2×10^4	2×10^4	7×10^3	0	7×10^2	$2,3 \times 10^3$	10^6	10^6	
0,25%	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
BASIL OIL									
4%	5×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
2%	2×10^3	7×10^2	0	0	0	0	0	0	
1%	10^4	3×10^3	0	0	0	0	0	0	100%
0,5%	2×10^4	2×10^4	$1,3 \times 10^4$	2×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	<90%
TEA TREE OIL									
0,5%	5×10^3	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	2×10^4	$1,2 \times 10^4$	2×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	7×10^2	0	0	0	0	0	10^6	10^6	
1%	4×10^3	$1,3 \times 10^3$	0	0	$1,2 \times 10^3$	2×10^4	10^6	10^6	NR
0,5%	10^4	$1,2 \times 10^4$	10^4	8×10^3	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	

Πίνακες 33,34: Κινητική θανάτωσης *E. coli* (αρ. 3), *E. coli* 0157:H7 (αρ. 4) αντίστοιχα. Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Οι αραιώσεις 1%-4% που δεν περιλαμβάνονται στους πίνακες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,25% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48h. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίδεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Η επώαση διήρκησε 7 ημέρες, χωρίς καμία μεταβολή στις συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών.

Πίνακας 33

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
0,5%	2×10^3	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	84,11%
BASIL OIL									
4%	5×10^3	0	0	0	0	0	0	0	
2%	10^4	3×10^3	0	0	0	0	0	0	
1%	10^4	5×10^3	10^2	0	0	0	0	0	100%
0,5%	2×10^4	10^4	$2,4 \times 10^3$	4×10^2	0	2×10^2	10^6	10^6	48,63%
0,25%	4×10^4	2×10^4	7×10^3	7×10^3	10^4	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
1%	$2,4 \times 10^3$	0	2×10^3	0	0	0	0	0	
0,5%	10^4	5×10^3	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	2×10^4	2×10^4	4×10^3	10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	73,96%
THYME OIL									
0,5%	2×10^2	0	0	6×10^2	0	0	0	0	NR
0,25%	5×10^3	$2,8 \times 10^3$	0	4×10^2	3×10^3	10^6	10^6	10^6	



Πίνακας 34

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
0,5%	7×10^3	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	10^4	6×10^3	0	0	0	0	0	0	87,09%
BASIL OIL									
4%	8×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
2%	$1,3 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	
1%	10^4	0	0	0	0	0	0	0	92,62%
0,5%	10^4	6×10^3	0	0	0	5×10^3	10^6	10^6	<90%
TEA TREE OIL									
1%	6×10^3	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,5%	7×10^3	0	0	0	0	0	0	0	76,24%
0,25%	2×10^4	2×10^4	3×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
THYME OIL									
1%	5×10^2	0	0	0	0	0	0	0	NR
0,5%	7×10^3	4×10^2	0	0	0	0	8×10^3	10^4	
0,25%	10^4	6×10^3	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	

B.3.2.7. *Morganella morganii*

Εξετάσθηκε ένα στέλεχος που απομονώθηκε από σύρα. Στον πίνακα 35 παρουσιάζεται ο έλεγχος ευαισθησίας του στελέχους στα αντιβιοτικά και στον πίνακα 36 οι τιμές MIC και MBC των εξεταζόμενων ελαίων.

Πίνακας 35: Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά (R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο)

ANTIBIOTIKA	<i>M.morganii</i>
amikacin	S
amoxicillin/ca	R
ampicillin	R
cefoxitin	R
cefotaxime	R
ceftazidime	R
cephalothin	R
ciprofloxacin	S
gentamicin	S
imipenem	S
netilmicin	S
nalidixic acid	S
ofloxacin	S
piperacillin/tazobac	R
tobramycin	S
trimethoprim/sulfa	S
nitrofurantoin	R
norfloxacin	S



B.3.2.8. *Pantoea agglomerans*

Εξετάσθηκε ένα στέλεχος ESB�(+)¹ που απομονώθηκε από ούρα. Στον πίνακα 38 παρουσιάζεται ο έλεγχος ευαισθησίας του στελέχους στα αντιβιοτικά και στον πίνακα 39 οι τιμές MIC και MBC των εξεταζόμενων ελαίων.

Πίνακας 38: Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά (R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο)

ANTIBIOTIKA	<i>P.agglomerans</i>
amikacin	R
amoxicillin/ca	R
cefoxitin	R
cefotaxime	R
ceftazidime	R
ciprofloxacin	R
gentamicin	R
imipenem	S
netilmicin	R
nalidixic acid	R
ofloxacin	R
piperacillin/tazobac	R
tobramycin	R
trimethoprim/sulfa	R
nitrofurantoin	R
norfloxacin	R

Πίνακας 39: Προσδιορισμός μέσω των τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων (NR= χωρίς αποτέλεσμα)

ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>P.agglomerans</i> / ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	<i>P. agglomerans</i>			
	MIC%	MBC%	MIC(OD)	ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ
Origanum oil	0,25	0,37	0,25	0,25-0,5 (MBC)
Basil oil	0,5	0,5	NR	0,5
Tea tree oil	0,5	0,5	0,5	0,5
Thyme oil	0,75	0,5	0,25	0,5-1 (MIC)



Πίνακας 40: Κινητική θανάτωσης *P. agglomerans*. Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	$1,2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	5×10^3	4×10^3	5×10^3	0	0	0	0	0	
0,25%	10^4	8×10^3	10^4	3×10^3	0	0	0	2×10^4	90,54%
0,125%	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
BASIL OIL									
4%	4×10^4	0	0	0	0	0	0	0	
2%	4×10^4	0	0	0	0	0	0	0	
1%	4×10^4	2×10^2	0	0	0	0	0	0	
0,5%	4×10^4	10^3	0	0	0	0	0	0	NR
0,25%	10^6	6×10^3	$1,3 \times 10^3$	4×10^2	0	0	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	2×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
1%	10^3	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	7×10^3	3×10^3	2×10^2	0	0	0	0	0	100%
0,25%	10^4	10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	3×10^3	5×10^3	$1,2 \times 10^3$	0	0	0	4×10^4	0	
0,25%	10^4	10^4	0	0	0	0	2×10^4	10^4	NR
0,125%	10^4	5×10^3	2×10^2	4×10^3	5×10^3	10^4	10^6	10^6	



B.3.2.9. *Yersinia enterocolitica*

Εξετάσθηκαν δύο στελέχη προερχόμενα από τρόφιμα και συγκεκριμένα από μοσχαρίσιο κρέας (αρ. 1) και από παστεριωμένο γάλα (αρ. 2). Στον πίνακα 41 παρουσιάζεται ο έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών στα αντιβιοτικά και στον πίνακα 42 οι τιμές MIC και MBC των εξεταζόμενων ελαίων. Στο γράφημα 8 αναπαριστούνται οι τιμές MIC, MBC, MIC(OD) των αιθέριων ελαίων για την *Y. enterocolitica*

Πίνακας 41: Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

(R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο, I= ενδιάμεσης ευαισθησίας)

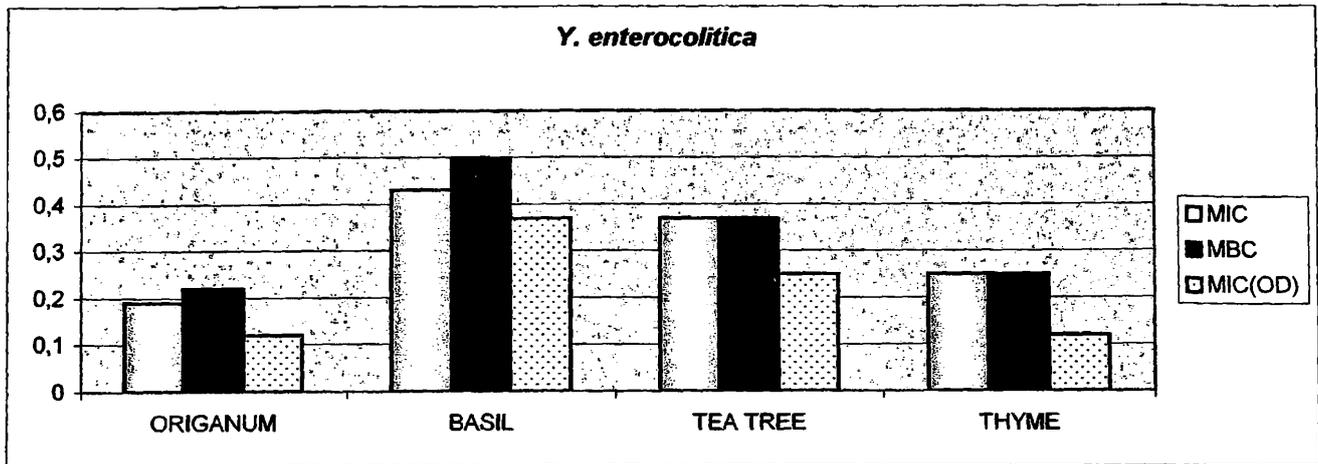
ANTIBIOTIKA/ΣΤΕΛΕΧΗ	<i>Y. enterocolitica</i> (κρέας)	<i>Y. enterocolitica</i> (γάλα)
amoxicillin/ca	R	R
ampicillin	R	R
cefoxitin	R	R
cefotaxime	R	R
ceftazidime	R	R
cephalothin	R	R
ciprofloxacin	S	S
gentamicin	S	I
imipenem	S	S
netilmicin	S	S
nalidixic acid	S	S
ofloxacin	S	S
tobramycin	S	I

**Πίνακας 42: Προσδιορισμός μέσω των τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων
(NR= χωρίς αποτέλεσμα)**

ΣΤΕΛΕΧΗ <i>Y. enterocolitica</i> /ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)
1.	0,25	0,25	NR	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,12
2.	0,12	0,19	0,12	0,37	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,19	0,22	0,12	0,43	0,5	0,37	0,37	0,37	0,25	0,25	0,25	0,12
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	0,12 -0,25	0,12 -0,25	0,12	0,25 -0,5	0,5	0,25 -0,5	0,25 -0,5	0,25 -0,5	0,25	0,25	0,25	0,12



Γράφημα 8: Τιμές MIC, MBC, MIC(OD) αιθέριων ελαίων για την *Y. enterocolitica*



ΠΙΝΑΚΕΣ 43,44: Κινητική θανάτωσης *Y. enterocolitica* (αρ. 1, αρ. 2). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Οι αραιώσεις 0,5%-4% που δεν περιλαμβάνονται στους πίνακες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,125% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Η επώαση έγινε στους 30°C και διήρκησε 7 ημέρες, χωρίς καμία μεταβολή στις συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών μετά τις 48 ώρες.

Πίνακας 43

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
0,5%	6×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	$1,2 \times 10^4$	10^4	0	0	0	0	0	0	NR
0,125%	2×10^4	2×10^4	$1,5 \times 10^4$	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	78,65%
BASIL OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	7×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
1%	6×10^3	7×10^2	0	0	0	0	0	0	
0,5%	4×10^4	2×10^3	2×10^2	0	0	0	0	0	100%
0,25%	10^6	2×10^4	5×10^3	$1,8 \times 10^3$	2×10^3	3×10^4	10^6	10^6	47,65%
TEA TREE OIL									
0,5%	$4,2 \times 10^3$	10^3	0	0	0	0	0	2×10^2	
0,25%	2×10^4	2×10^4	4×10^3	$1,7 \times 10^3$	2×10^3	10^4	10^6	10^6	96,14%
THYME OIL									
0,5%	0	0	0	0	0	10^2	0	0	
0,25%	5×10^3	5×10^3	0	0	0	0	0	0	NR
0,125%	4×10^4	4×10^4	$1,8 \times 10^4$	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	100%

Πίνακας 44

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
0,25%	5×10^3	10^4	0	0	0	0	0	0	
0,125%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	0	0	0	0	8×10^3	100%
0,063%	4×10^4	10^6	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	<90%
BASIL OIL									
0,5%	$1,3 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	2×10^4	$2,8 \times 10^3$	10^2	0	0	0	2×10^4	10^6	91,18%
0,125%	2×10^4	10^4	8×10^3	2×10^4	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	<90%
TEA TREE OIL									
0,25%	10^4	5×10^3	3×10^2	0	0	0	0	0	92,91%
0,125%	4×10^4	4×10^4	$1,6 \times 10^4$	2×10^4	10^4	4×10^4	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
0,25%	8×10^3	10^4	3×10^2	0	0	0	0	0	
0,125%	2×10^4	2×10^4	8×10^3	10^4	3×10^3	$1,8 \times 10^3$	10^6	10^6	100%

B.3.2.10. *Staphylococcus* spp.

Μελετήθηκαν έξι στελέχη methicillin-resistant *S. aureus* προερχόμενα από κλινικά δείγματα τραύματος (αρ. 1, αρ. 2, αρ. 3 και αρ. 4), πύου (αρ. 5) και αίματος (αρ. 6), ένα στέλεχος methicillin-resistant *S. epidermidis* από κλινικό δείγμα τραύματος (αρ. 7) και ένα στέλεχος methicillin-resistant *S. aureus* από μοσχαρίσιο κιμά (αρ. 8). Παράλληλα μελετήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 και *S. epidermidis* ATCC 12228. Τρία στελέχη ελέγχθηκαν και ως προς την ευαισθησία τους στο chamomile blue oil (αρ. 1, αρ. 7 και *S. aureus* ATCC 29213) χωρίς αποτέλεσμα (MIC > 4% v/v, MBC > 4% v/v). Στον πίνακα 45 παρουσιάζεται ο έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών στα αντιβιοτικά και στον πίνακα 46 ο προσδιορισμός των μέσων τιμών MIC και MBC των αιθέριων ελαίων για τους methicillin-resistant Staphylococci.



Πίνακας 45: Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά
(R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο, I= ενδιάμεσης ευαισθησίας)

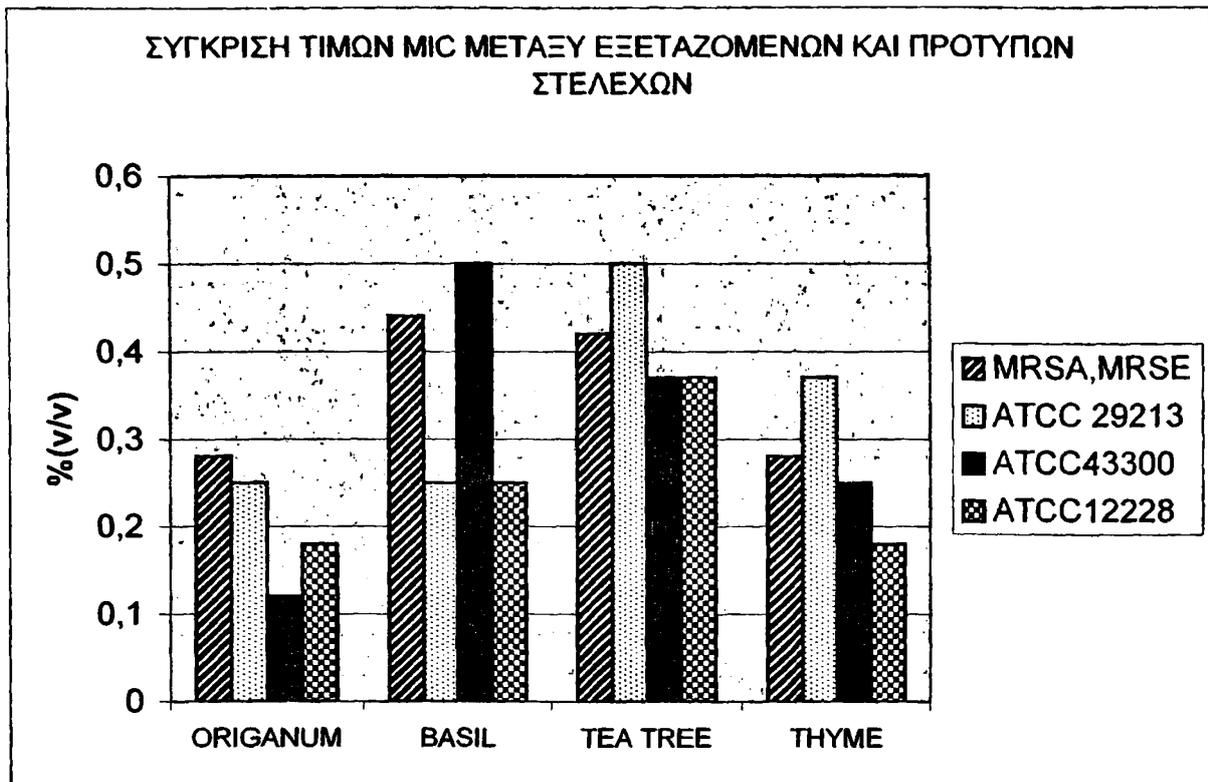
ANTIBIOTIKA/ AP.ΣΤΕΛΕΧΩΝ	1	2	3	4	5	6	7	8
							MRSE	(κιμάς)
ciprofloxacin	R	S	R	S	S	S	S	
clindamycin	R	S	R	S	S	S	S	S
erythromycin	R	S	R	S	S	I	S	S
fusidic acid	R	I	R	I	I	S	I	S
gentamicin	S	S	R	S	S	S	S	
oxacillin MIC	R	R	R	R	R	R	R	R
penicillin-G	R	R	R	R	R	R	R	R
rifampin		S	R	S	S		S	
teicoplanin	S	S	S	S	S	S	S	S
tetracycline	R	R	R	R	R	R	S	
tobramycin	S	S	R	S	S	S	S	
trimethoprim/sulfa	R	S	S	S	S	S	S	S
vancomycin	S	S	S	S	S	S	S	S
levofloxacin	I	S	R	S	S	S		
oxacillin	R	R	R	R	R	R	R	
quinupristin/dalfopr	S	S	S	S	S	S	S	
linezolid	S	S	S	S	S	S	S	
moxifloxacin	S	S	I	S	S	S		

Πίνακας 46: Προσδιορισμός μέσω των τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων για τους methicillin-resistant Staphylococci (NR= χωρίς αποτέλεσμα)

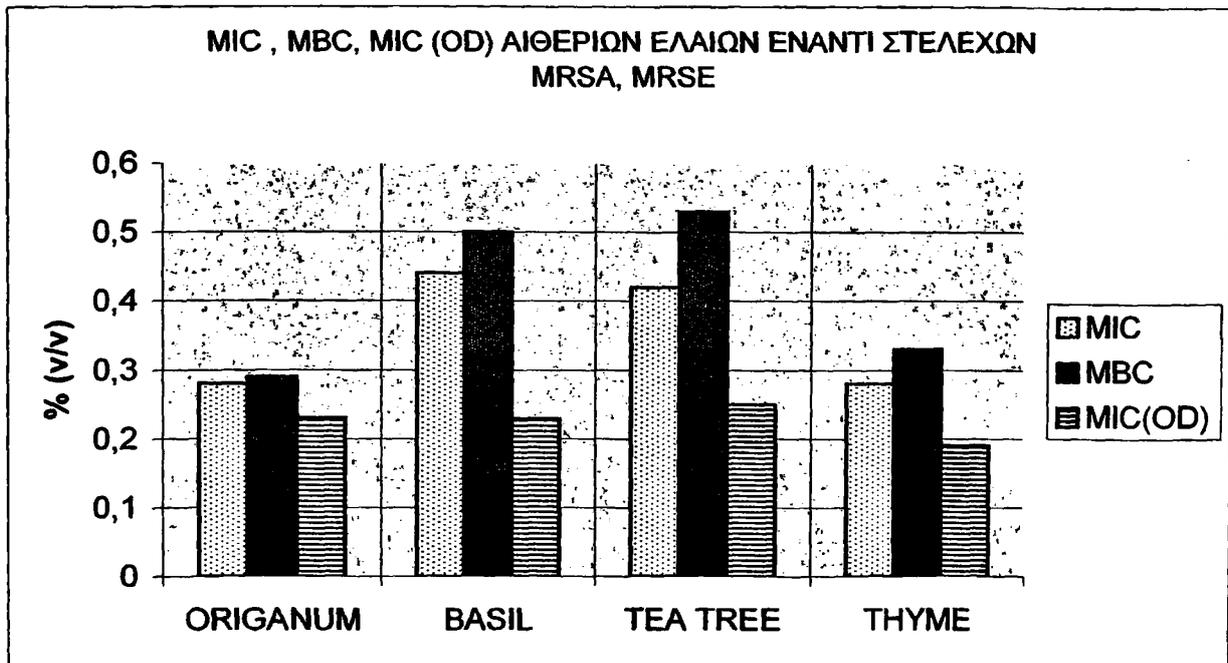
ΣΤΕΛΕΧΗ MRSA,MRSE ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)
1 MRSA	0,32	0,32	0,25	0,75	0,75	0,5	0,5	0,75	0,25	0,37	0,25	0,25
2 MRSA	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,37	0,5	0,25	0,25	0,25	NR
3 MRSA	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,37	0,75	0,25	0,12	0,25	0,25
4 MRSA	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,37	0,5	0,25	0,25	0,25	NR
5 MRSA	0,18	0,25	0,12	0,5	0,5	0,25	0,37	0,37	0,25	0,25	0,37	0,12
6 MRSA	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,12	0,12
7 MRSE	0,37	0,37	NR	0,5	1	NR	0,37	0,37	0,25	0,5	0,75	NR
8 MRSA κιμάς	0,37	0,37	NR	0,75	0,75	0,25	0,75	0,75	0,25	0,37	0,37	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,28	0,29	0,23	0,44	0,50	0,23	0,42	0,53	0,25	0,28	0,33	0,19
S.D	0,06	0,05	0,04	0,20	0,26	0,12	0,13	0,18	0	0,11	0,17	0,06
ATCC29213	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	1	0,37	0,25	0,5
ATCC43300	0,12	0,12	0,12	0,5	0,5	0,25	0,37	0,25	0,12	0,25	0,25	0,12
ATCC12228	0,18	0,12	0,12	0,25	0,25	0,12	0,37	0,37	0,12	0,18	0,18	0,12
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	0,12- 0,5	0,25- 0,5	0,12- 0,25	0,25- 1	0,25- 1	0,12- -0,5	0,25- 1	0,25- 1	0,25	0,12- -0,5	0,12- 1	0,12- 0,25



Γράφημα 9: Σύγκριση μέσων τιμών MIC μεταξύ των methicillin-resistant Staphylococci και των πρότυπων στελεχών



Γράφημα 10: Τιμές MIC, MBC, MIC (OD) αιθέριων ελαίων για τα MRSA και MRSE στελέχη



Πίνακας 47: Κινητική θανάτωσης MRSA (αρ. 1) Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης $>10^6$ cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	5×10^3	0	0	0	0	0	0	0	
1%	10^6	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	10^6	10^4	5×10^3	0	10^3	0	0	0	
0,25%	10^6	10^6	10^6	10^4	10^4	4×10^4	8×10^4	10^6	95,61%
BASIL OIL									
4%	3×10^4	0	0	0	0	0	0	0	
2%	4×10^4	0	0	0	0	0	0	0	
1%	10^6	3×10^4	0	0	0	0	0	0	
0,5%	10^6	10^6	2×10^4	3×10^3	10^3	0	0	0	100%
0,25%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	4×10^4	2×10^4	2×10^4	71,02%
TEA TREE OIL									
4%	10^4	3×10^3	0	0	0	0	0	0	
2%	10^4	$7,5 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	
1%	2×10^4	2×10^4	0	0	0	0	0	0	
0,5%	4×10^4	2×10^4	$1,6 \times 10^3$	7×10^2	0	0	0	$1,3 \times 10^3$	
0,25%	4×10^4	3×10^4	7×10^3	8×10^3	4×10^3	2×10^3	8×10^2	2×10^4	100%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	$1,2 \times 10^4$	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
0,25%	2×10^4	2×10^4	$1,5 \times 10^4$	10^4	6×10^3	5×10^3	0	0	100%
0,125%	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	4×10^4	10^6	10^6	10^6	86,08%



Πίνακας 48: Κινητική θανάτωσης MRSA (αρ. 2). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης $>10^6$ cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	10^4	8×10^2	0	0	0	0	0	0	
0,25%	4×10^4	2×10^4	0	0	0	0	0	0	100%
0,125%	4×10^4	4×10^4	10^4	2×10^4	2×10^4	10^4	10^6	10^6	81,65%
BASIL OIL									
4%	4×10^4	2×10^4	0	0	0	0	0	0	
2%	4×10^4	2×10^4	0	0	0	0	0	0	
1%	4×10^4	2×10^4	3×10^2	0	0	0	0	0	
0,5%	4×10^4	2×10^4	9×10^2	7×10^2	2×10^2	0	0	0	
0,25%	2×10^4	4×10^4	$8,6 \times 10^3$	6×10^3	$5,7 \times 10^3$	8×10^2	0	0	
0,125%	4×10^4	2×10^4	$1,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	10^4	10^6	10^6	99,76%
TEA TREE OIL									
4%	10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
2%	10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
1%	$1,5 \times 10^4$	10^4	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2×10^4	2×10^4	0	7×10^2	0	0	0	0	
0,25%	4×10^4	2×10^4	$4,6 \times 10^3$	6×10^3	$4,1 \times 10^3$	2×10^3	4×10^4	10^6	100%
0,125%	4×10^4	4×10^4	$8,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	2×10^4	10^6	10^6	<90%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	$1,2 \times 10^4$	7×10^3	0	0	0	0	0	0	
0,25%	2×10^4	10^4	3×10^2	0	0	0	0	0	NR
0,125%	2×10^4	2×10^4	10^4	$1,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	2×10^4	10^6	10^6	78,81%



Πίνακας 49: Κινητική θανάτωσης MRSA (αρ. 3). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης $>10^6$ cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	$7,2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	100%
0,125%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	10^4	10^4	10^4	3×10^3	10^6	82,43%
BASIL OIL									
4%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
2%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
1%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2×10^4	10^4	$1,2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	
0,25%	2×10^4	2×10^4	7×10^3	3×10^3	0	0	0	0	
0,125%	4×10^4	4×10^4	10^6	10^4	$1,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	10^6	100%
TEA TREE OIL									
4%	10^4	8×10^3	0	0	0	0	0	0	
2%	10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
1%	2×10^4	$1,5 \times 10^4$	0	0	6×10^2	0	0	0	
0,5%	2×10^4	2×10^4	0	0	0	0	0	8×10^2	
0,25%	4×10^4	2×10^4	10^4	4×10^3	2×10^3	2×10^3	$2,4 \times 10^3$	10^6	100%
0,125%	4×10^4	4×10^4	$1,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	7×10^3	5×10^3	10^6	10^6	56,67%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	3×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	$6,2 \times 10^3$	5×10^2	0	0	0	0	0	0	
0,25%	2×10^4	10^4	3×10^2	0	0	0	0	0	100%
0,125%	3×10^4	2×10^4	8×10^3	10^4	5×10^3	5×10^3	0	10^6	69,48%

Πίνακας 50: Κινητική θανάτωσης MRSA (αρ. 4). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης $>10^6$ cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	3×10^3	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	10^4	8×10^2	0	0	0	0	0	0	
0,25%	4×10^4	2×10^4	6×10^2	0	0	0	0	0	100%
0,125%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	10^4	10^4	$1,5 \times 10^4$	10^6	10^6	63,61%
BASIL OIL									
4%	4×10^4	4×10^4	0	0	0	0	0	0	
2%	4×10^4	4×10^4	0	0	0	0	0	0	
1%	4×10^4	4×10^4	0	0	0	0	0	0	
0,5%	4×10^4	4×10^4	$1,2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	
0,25%	4×10^4	4×10^4	10^4	5×10^3	3×10^3	$1,3 \times 10^3$	0	0	
0,125%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	10^4	10^4	2×10^4	10^6	10^6	100%
TEA TREE OIL									
4%	6×10^3	4×10^2	0	0	0	0	0	0	
2%	8×10^3	$1,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	0	0	0	0	0	
1%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
0,25%	10^6	4×10^4	$4,5 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	2×10^3	8×10^2	10^6	100%
0,125%	10^6	4×10^4	$1,5 \times 10^4$	8×10^3	10^4	2×10^3	10^6	10^6	59,97%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	4×10^2	0	0	0	0	0	
1%	2×10^3	0	6×10^2	0	0	0	0	0	
0,5%	7×10^3	3×10^2	0	0	0	0	0	0	
0,25%	4×10^4	2×10^4	0	5×10^2	0	0	0	0	NR
0,125%	4×10^4	2×10^4	10^4	2×10^4	10^4	2×10^4	10^6	10^6	70,53%



Πίνακας 51: Κινητική θανάτωσης MRSE (αρ. 7). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης $>10^6$ cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	2×10^3	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	5×10^3	2×10^3	4×10^3	0	0	0	0	0	NR
0,25%	10^4	10^4	10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	52,45%
0,125%	10^4	10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
BASIL OIL									
4%	4×10^3	7×10^3	10^4	0	0	0	0	0	
2%	4×10^3	8×10^3	10^4	7×10^2	9×10^2	0	0	0	
1%	3×10^3	10^4	$1,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$	0	0	
0,5%	4×10^3	10^4	2×10^4	10^4	10^4	6×10^3	0	10^4	NR
0,25%	10^4	2×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	
0,125%	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
4%	$6,2 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	
2%	$1,2 \times 10^4$	7×10^3	7×10^2	0	0	0	0	0	
1%	$1,5 \times 10^4$	$8,8 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$	8×10^2	2×10^2	0	0	0	
0,5%	2×10^4	$9,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	0	0	
0,25%	2×10^4	2×10^4	$1,3 \times 10^4$	10^4	10^4	10^4	$2,7 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	98,91%
0,125%	10^6	4×10^4	2×10^4	2×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	70,98%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	5×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	$8,5 \times 10^3$	$9,2 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$	3×10^2	0	0	0	4×10^4	
0,25%	$1,2 \times 10^4$	$9,7 \times 10^3$	$8,3 \times 10^3$	$8,6 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	$6,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	10^6	NR
0,125%	2×10^4	2×10^4	10^4	$2,5 \times 10^4$	3×10^4	10^6	10^6	10^6	84,46%

Πίνακας 52: Κινητική θανάτωσης MRSA (αρ. 8). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης $>10^6$ cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης.

Στις 4 και 7 ημέρες επώασης είχαμε διαφοροποίηση στην αναστολή ανάπτυξης του μικροοργανισμού για τα αιθέρια έλαια της ρίγανης και του θυμαριού (MIC=0,25% v/v).

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2×10^4	2×10^4	0	0	0	0	0	0	NR
0,25%	2×10^4	10^4	10^4	$1,2 \times 10^4$	10^4	$2,5 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	57,80%
BASIL OIL									
4%	4×10^4	4×10^4	10^4	0	0	0	0	0	
2%	4×10^4	4×10^4	10^4	4×10^3	0	0	0	0	NR
1%	4×10^4	4×10^4	$1,5 \times 10^4$	10^4	10^4	0	0	0	NR
0,5%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	2×10^4	10^4	7×10^3	$3,5 \times 10^3$	10^6	
0,25%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	100%
TEA TREE OIL									
4%	10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
2%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
1%	4×10^4	2×10^4	$1,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	0	0	0	0	
0,5%	4×10^4	2×10^4	8×10^3	4×10^4	4×10^4	10^4	5×10^3	$4,6 \times 10^3$	
0,25%	4×10^4	2×10^4	2×10^4	4×10^4	2×10^4	2×10^4	2×10^4	2×10^4	100%
THYME OIL									
4%	10^4	0	0	0	0	0	0	0	
2%	10^4	3×10^3	0	0	0	0	0	0	
1%	10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
0,5%	4×10^4	10^4	3×10^2	0	0	0	0	0	NR
0,25%	4×10^4	2×10^4	10^4	10^4	10^4	$1,5 \times 10^4$	8×10^3	$8,3 \times 10^3$	



B.3.2.11. *Enterococcus faecium*

Εξετάσθηκαν δύο στελέχη vancomycin-resistant *E. faecium*, που απομονώθηκαν από δείγματα τραύματος (αρ. 1) και ούρων (αρ. 2), το δε πρώτο μελετήθηκε και ως προς την ευαισθησία του στο έλαιο του μπλε χαμομηλιού (MIC >4% v/v, MBC>4% v/v).

Πίνακας 53: Έλεγχος ευαισθησίας *E. faecium* (αρ.στελεχών 1 και 2) σε αντιβιοτικά

(R= ανθεκτικό, S=ευαίσθητο, I= ενδιάμεσης ευαισθησίας)

*= E-Test, **=Φαινότυπος VanA (vancomycin=R, teicoplanin=R)

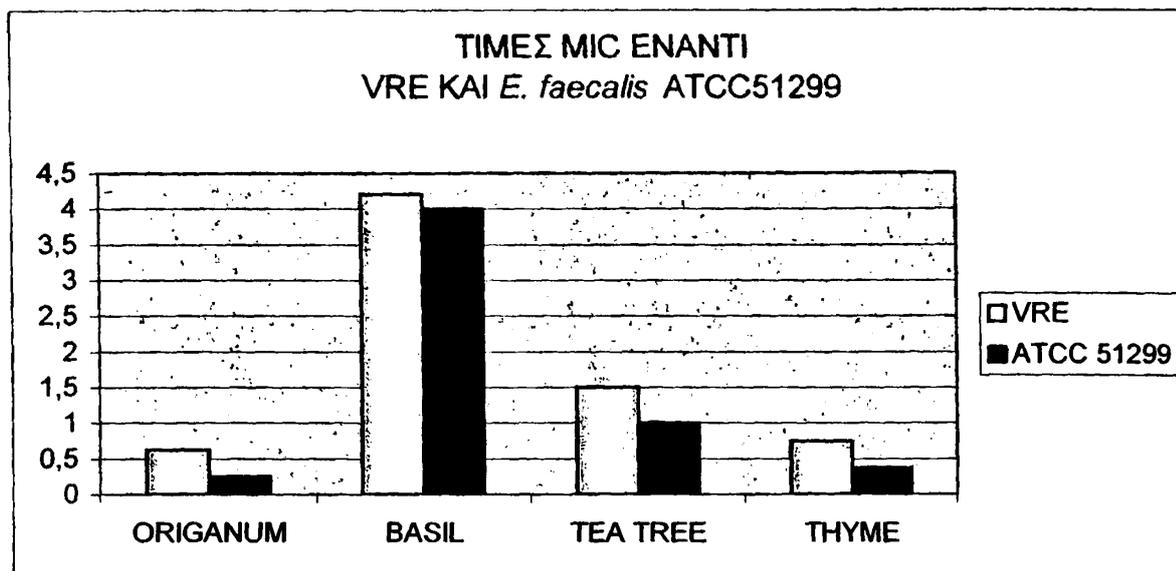
ANTIBIOTIKA	1**	2**
ampicillin	R	R
ampicillin/sulbactam	R	I
ciprofloxacin	R	R
imipenem	R	R
ofloxacin	R	R
kanamycin high level	R	R
gentamicin high level	S	R
streptomycin high level	R	R
penicillin-G	R	R
teicoplanin	R*	R*
tetracycline	S	S
vancomycin	R*	R*
levofloxacin	R	R
quinupristin/dalfopr	S	S
linezolid	S*	S*
moxifloxacin	R	S
nitrofurantoin		S

Πίνακας 54: Προσδιορισμός μέσων τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων για τους vancomycin-resistant *E. faecium*

(NR= χωρίς αποτέλεσμα)

ΣΤΕΛΕΧΗ <i>E. faecium</i> ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)	MIC %	MBC %	MIC (OD)
1 VRE	0,75	0,75	NR	>4	>4	NR	2	1,5	0,5	0,75	0,32	NR
2 VRE	0,5	0,75	NR	>4	>4	NR	1	0,75	1	0,75	0,5	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,62	0,75	NR	>4	>4	NR	1,5	1,12	0,75	0,75	0,41	NR
<i>E. faecalis</i> ATCC51299	0,25	0,25	0,12	4	4	1	1	1	0,5	0,37	0,37	NR
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	0,5-1	0,5-1	NR	>4	>4	NR	1-2	0,5-2	0,5-1	0,5-1	0,25-0,5	NR

Γράφημα 11: Τιμές MIC αιθέριων ελαίων έναντι στελεχών VRE και του *E. faecalis* ATCC51299



Πίνακας 55: Κινητική θανάτωσης VRE (αρ. 1). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης $>10^6$ cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	4×10^3	$4,5 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	NR
0,5%	6×10^3	10^4	4×10^3	5×10^3	10^4	10^4	4×10^3	2×10^4	NR
0,25%	10^4	2×10^4	8×10^3	10^4	2×10^4	2×10^4	2×10^4	10^6	63,05%
0,125%	10^4	4×10^4	$1,5 \times 10^4$	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	
BASIL OIL									
4%	4×10^3	6×10^3	10^4	2×10^4	4×10^4	7×10^3	10^6	10^6	
2%	4×10^3	8×10^3	10^4	$1,5 \times 10^4$	4×10^4	10^4	10^6	10^6	
1%	5×10^3	10^4	2×10^4	10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	NR
0,5%	10^4	$1,5 \times 10^4$	2×10^4	$1,5 \times 10^4$	4×10^4	10^6	10^6	10^6	25,26%
TEA TREE OIL									
4%	4×10^4	4×10^4	$2,5 \times 10^4$	4×10^3	10^3	0	0	0	
2%	4×10^4	4×10^4	$2,5 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3$	6×10^3	10^3	0	0	
1%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	4×10^3	7×10^2	0	
0,5%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	2×10^4	10^4	$3,5 \times 10^3$	2×10^4	100%
THYME OIL									
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	0	0	0	0	0	0	0	0	
1%	2×10^4	8×10^3	2×10^3	0	0	0	0	0	
0,5%	3×10^4	4×10^4	4×10^4	4×10^4	2×10^4	10^4	0	0	NR
0,25%	10^6	10^6	10^6	4×10^4	2×10^4	2×10^4	$5,2 \times 10^3$	10^4	

Πίνακας 56: Κινητική θανάτωσης VRE (αρ. 2). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα. Οι αραιώσεις που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης $>10^6$ cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
4%	0	0	0	0	0	0	0	0	
2%	6×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
1%	3×10^3	$4,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	0	0	0	0	0	
0,5%	10^4	$1,2 \times 10^4$	10^4	5×10^3	$3,8 \times 10^3$	$6,2 \times 10^3$	0	8×10^2	NR
0,25%	2×10^4	2×10^4	2×10^4	4×10^4	4×10^4	$1,8 \times 10^4$	2×10^4	2×10^4	86,32%
0,125%	10^4	4×10^4	$1,5 \times 10^4$	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	
BASIL OIL									
4%	$5,2 \times 10^3$	10^4	10^4	2×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	NR
2%	4×10^4	2×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
4%	10^4	8×10^3	10^4	8×10^2	0	0	0	0	
2%	2×10^4	2×10^4	10^4	3×10^3	6×10^2	0	0	0	
1%	2×10^4	2×10^4	2×10^4	10^4	5×10^3	2×10^3	0	0	100%
0,5%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	10^4	10^4	2×10^4	2×10^4	9×10^3	81,30%
THYME OIL									
4%	3×10^3	0	0	0	0	0	0	0	
2%	10^4	3×10^3	9×10^2	$1,2 \times 10^3$	8×10^2	0	0	0	
1%	2×10^4	10^4	3×10^3	8×10^2	0	0	0	0	
0,5%	2×10^4	2×10^4	2×10^4	10^4	10^4	7×10^3	7×10^2	0	NR

B.3.2.12. *Listeria* spp.

Εξετάσθηκαν πέντε στελέχη *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από σολομό (αρ. 1), ορότυπος 1, καπνιστή πέστροφα (αρ. 2), ορότυπος 1, νερά ποταμού (αρ. 3), ορότυπος 1, κέφαλο (αρ. 4) ορότυπος 4, νερά ποταμού (αρ. 5), ορότυπος 4, ένα στέλεχος *L. innocua* από νερά ποταμού (αρ. 6). Τρία από τα στελέχη εξετάσθηκαν και εμφάνισαν αντοχή στο αιθέριο έλαιο του μπλε χαμομηλιού (αρ. 1, αρ. 2 και αρ. 4). Χαρακτηριστικό στοιχείο των πειραματισμών ήταν η χαμηλή τιμή απορρόφησης του διαλύματος ελαίων και μικροβιακού ενοφθαλμίσματος, με συνέπεια να μη μπορεί να χρησιμοποιηθεί η αντίστοιχη μέθοδος (OD) στον προσδιορισμό της MIC.

Στον πίνακα 57 εμφανίζεται ο έλεγχος ευαισθησίας των παραπάνω στελεχών στα αντιβιοτικά, ενώ στον πίνακα 58 ο προσδιορισμός των μέσων τιμών MIC και MBC των αιθέριων ελαίων για τα στελέχη *L. monocytogenes* και *L. innocua*.



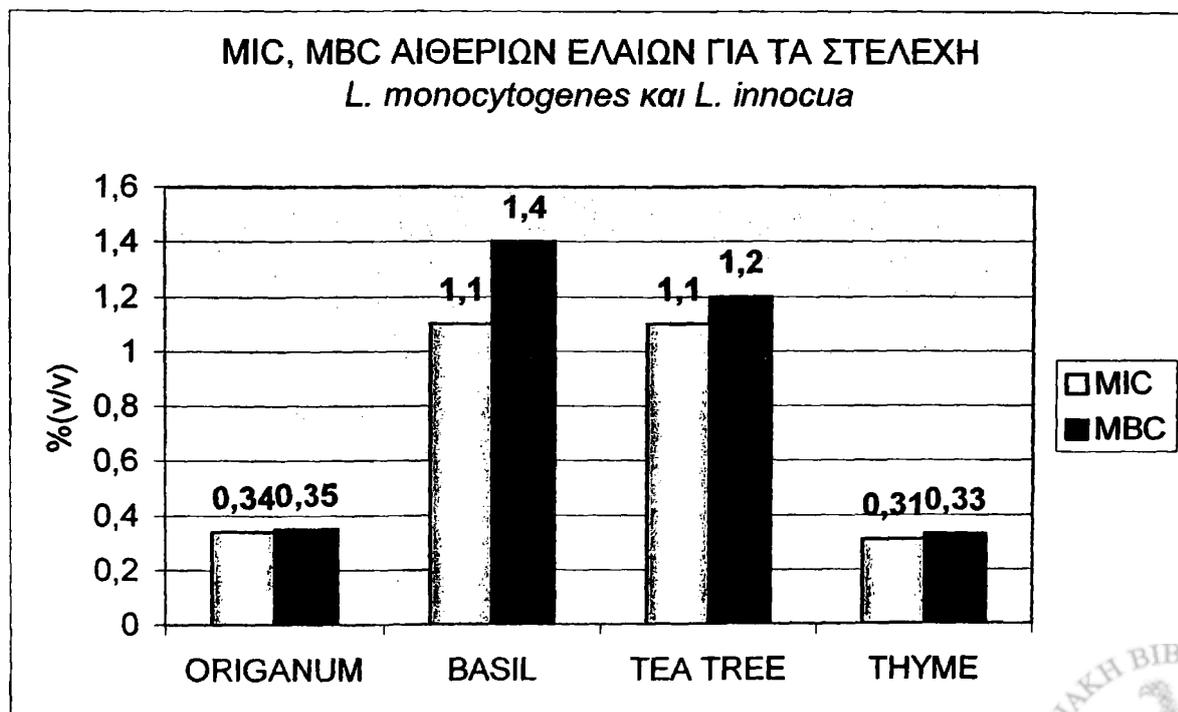
Πίνακας 57: Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά
(S=ευαίσθητο)

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ/ΣΤΕΛΕΧΗ	1	2	3	4	5	6
ampicillin	S	S	S	S	S	S
penicillin-G	S	S	S	S	S	S

Πίνακας 58: Προσδιορισμός μέσω των τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων για τα στελέχη *L. monocytogenes* και *L. innocua*
(NR= χωρίς αποτέλεσμα, NT= δεν εξετάστηκε, SD= τυπική απόκλιση)

ΣΤΕΛΕΧΗ <i>L. monocytogenes</i> ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)
1	0,18	0,25	0,12	1	1	0,5	1	1	NR	0,25	0,25	NR
2	0,25	0,25	NR	1	1,5	NR	1	1	NR	0,25	0,37	NR
3	0,25	0,25	NR	1	1	NR	1,5	1,5	NR	0,37	0,37	NR
4	0,5	0,5	NR	1	1,5	NR	1	1,5	NR	0,37	0,37	NR
5	0,5	0,5	NR	NT	NT	NR	NT	NT	NR	0,37	0,37	NR
6 <i>L. innocua</i>	0,37	0,37	NR	1,5	2	NR	1	1	NR	0,25	0,25	NR
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,34	0,35	NR	1,1	1,4	NR	1,1	1,2	NR	0,31	0,33	NR
S.D	0,12	0,10	NR	0,18	0,34	NR	0,18	0,22	NR	0,06	0,05	NR
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	0,12-0,5	0,25-0,5	0,12	1-2	1-2	0,5	1-2	1-2	NR	0,25-0,5	0,25-0,5	NR

Γράφημα 12: Τιμές MIC, MBC, αιθέριων ελαίων για τα στελέχη *L. monocytogenes* και *L. innocua*



Πίνακας 59: Κινητική θανάτωσης *L. monocytogenes* (αρ. 1). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Οι αραιώσεις 1%-4% που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,125% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
0,5%	2×10^4	8×10^3	0	0	0	0	0	0	
0,25%	10^6	10^6	4×10^4	3×10^3	0	0	0	0	
0,125%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	100%
BASIL OIL									
4%	4×10^4	4×10^4	0	0	0	0	0	0	
2%	4×10^4	4×10^4	0	0	0	0	0	0	
1%	4×10^4	4×10^4	10^4	5×10^3	9×10^2	0	0	0	NR
0,5%	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	3×10^4	4×10^4	10^4	10^6	
0,25%	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
4%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	0	0	0	0	0	
2%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	3×10^3	7×10^2	0	0	0	
1%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	8×10^3	$1,5 \times 10^2$	3×10^2	0	0	NR
0,5%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	2×10^4	6×10^3	8×10^3	2×10^4	10^6	
0,25%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
THYME OIL									
1%	$1,5 \times 10^5$	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
0,25%	10^6	10^6	10^6	$1,3 \times 10^4$	4×10^3	6×10^3	0	0	NR
0,125%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^4	10^6	10^6	



Πίνακας 60: Κινητική θανάτωσης *L. monocytogenes* (αρ. 4). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Οι αραιώσεις 1%-4% που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,125% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίδεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
1%	8×10^3	0	0	0	0	0	0	0	
0,5%	4×10^4	$2,5 \times 10^4$	0	0	0	0	0	0	NR
0,25%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	4×10^4	$1,5 \times 10^4$	4×10^4	
BASIL OIL									
4%	4×10^4	2×10^4	0	0	0	0	0	0	
2%	4×10^4	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	
1%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	$4,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	0	0	2×10^4	NR
0,5%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	10^6	$1,5 \times 10^4$	2×10^4	2×10^4	10^6	
0,25%	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
4%	4×10^4	2×10^4	0	0	0	0	0	0	
2%	4×10^4	2×10^4	10^4	0	0	0	0	0	
1%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	3×10^3	7×10^2	0	0	8×10^2	NR
0,5%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	3×10^4	$6,2 \times 10^3$	2×10^4	10^6	10^6	
0,25%	4×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
THYME OIL									
0,5%	10^4	0	0	0	0	0	0	0	NR
0,25%	10^6	10^6	10^6	2×10^4	10^4	10^4	$1,7 \times 10^3$	10^4	
0,125%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	



B.3.2.13. *Streptococcus* spp.

Εξετάσθηκαν τέσσερα στελέχη *S. pyogenes* που απομονώθηκαν από δείγματα τραύματος και ένα στέλεχος *S. agalactiae* που απομονώθηκε από αιμοκαλλιέργεια.

Στον πίνακα 61 εμφανίζεται ο έλεγχος ευαισθησίας των παραπάνω στελεχών στα αντιβιοτικά, ενώ στον πίνακα 62 ο προσδιορισμός των μέσων τιμών MIC και MBC των αιθέριων ελαίων για τα στελέχη *S. pyogenes* και *S. agalactiae*.

Πίνακας 61: Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά (R=ανθεκτικό, S=ευαίσθητο)

ANTIBIOTIKA/ <i>S. pyogenes</i> (1,2,3,4)	1	2	3	4	<i>S. agalactiae</i>
penicillin	S	S	S	S	S
erythromycin	S	R	S	S	S
clindamycin	S	R	S	S	S
ampicillin					S
ciprofloxacin					S
imipenem					S
teicoplanin					S
tetracycline					R
trimethoprim/sulfa					S
vancomycin					S
linezolid					S
moxifloxacin					S
quinupristin/dalfopr					S

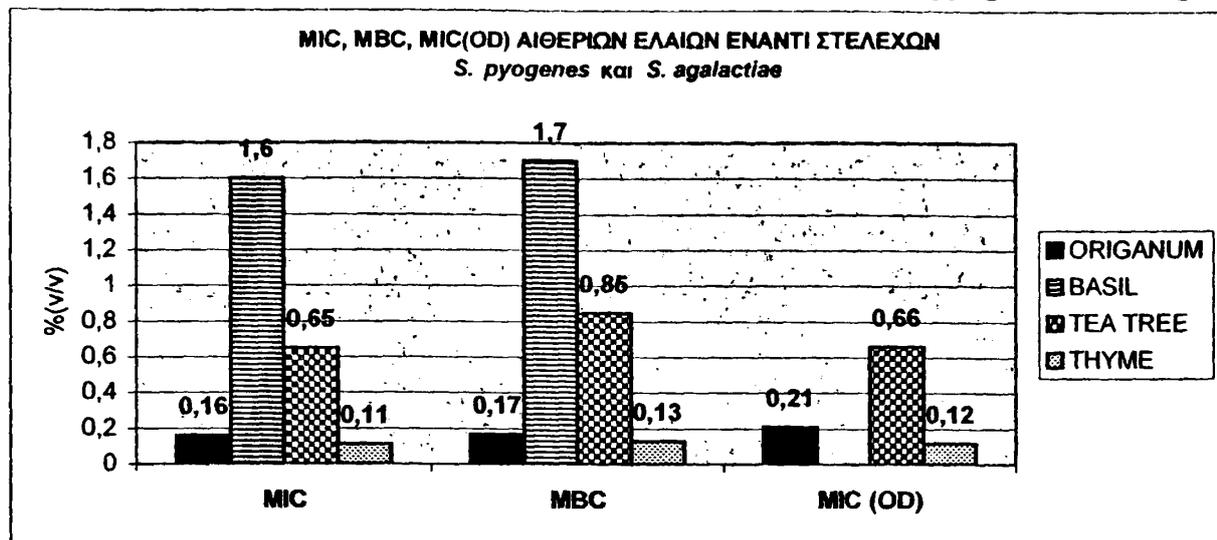
Πίνακας 62: Προσδιορισμός μέσων τιμών MIC και MBC αιθέριων ελαίων για τα στελέχη *S. pyogenes* και *S. agalactiae*

(NR= χωρίς αποτέλεσμα, NT=δεν εξετάστηκε, SD= τυπική απόκλιση)

ΣΤΕΛΕΧΗ <i>S. pyogenes</i> ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)
1	0,18	0,25	NT	1,5	2	NT	0,75	0,75	NT	0,09	0,12	NT
2	0,18	0,12	0,12	2	2	NR	0,75	1,25	1	0,09	0,16	0,12
3	0,12	0,12	0,12	1	1	NR	0,5	0,5	0,5	0,12	0,12	0,12
4	0,06	0,12	0,12	1	1	NR	0,5	0,5	NR	0,12	0,12	NT
5 <i>S. agalactiae</i>	0,25	0,25	0,5	2,5	2,5	NR	0,75	1,25	0,5	0,12	0,12	0,12
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,16	0,17	0,21	1,6	1,7	NR	0,65	0,85	0,66	0,11	0,13	0,12
S.D	0,06	0,06	0,15	0,53	0,55	NR	0,11	0,31	0,20	0,01	0,01	0
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	0,06- 0,25	0,12- 0,25	0,12- 0,5	1-4	1-4	NR	0,5-1	0,5-2	0,5-1	0,06- 0,12	0,06- 0,25	0,12



Γράφημα 13: Τιμές MIC και MBC αιθέριων ελαίων έναντι των *S. pyogenes* και *S. agalactiae*



Πίνακας 63: Κινητική θανάτωσης *S. pyogenes* (αρ. 2). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Οι αραιώσεις 1%-4% που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,5% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
0,5%	3×10^3	2×10^3	0	0	0	0	0	0	
0,25%	10^4	5×10^3	$1,5 \times 10^3$	0	0	0	0	0	
0,125%	4×10^4	4×10^4	8×10^3	$1,2 \times 10^4$	10^4	10^4	0	0	92,53%
0,063%	10^6	10^6	$2,5 \times 10^4$	4×10^4	4×10^4	4×10^4	10^6	10^6	<90%
BASIL OIL									
4%	5×10^3	$4,5 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	
2%	4×10^3	5×10^3	0	0	0	0	0	0	NR
1%	10^4	7×10^3	0	0	0	0	10^6	10^6	
0,5%	10^4	$6,5 \times 10^3$	0	0	0	0	10^6	10^6	
0,25%	4×10^4	4×10^4	2×10^4	10^4	2×10^4	2×10^4	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
4%	$3,4 \times 10^3$	10^4	0	0	0	0	0	0	
2%	7×10^3	$1,2 \times 10^4$	0	0	0	0	0	0	
1%	10^4	10^4	10^3	0	0	0	0	4×10^4	100%
THYME OIL									
0,5%	9×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	10^4	10^4	0	0	0	0	0	0	
0,125%	10^4	10^4	$1,1 \times 10^3$	0	7×10^2	0	0	4×10^4	91,57%



Πίνακας 64: Κινητική θανάτωσης *S. agalactiae* (αρ. 5). Αραιώσεις ελαίου από 0,008% έως 4%, χρόνος επώασης 0-48 h, συγκεντρώσεις ανάπτυξης σε cfu/ml. Οι αραιώσεις 1%-4% που δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις ανάπτυξης 0 cfu/ml για όλες τις χρονικές στιγμές επώασης, ενώ οι αραιώσεις 0,008%-0,125% που επίσης δεν περιλαμβάνονται, αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις $>10^6$ cfu/ml για τις χρονικές στιγμές επώασης 0-48 h. Μέγιστη τιμή ανάπτυξης δίνεται η 10^6 cfu/ml. Μηδενικές τιμές ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες εκφράζουν τις MIC και MBC των ελαίων αντίστοιχα.

ORIGANUM OIL	0h	1h	3h	6h	8h	12h	24h	48h	INHIBITION% (ABSORBANCE)
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
0,25%	4×10^3	0	0	0	0	0	0	0	84,98%
0,125%	4×10^4	10^4	7×10^3	$1,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	10^6	10^6	10^6	
BASIL OIL									
4%	$1,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	NR
2%	$1,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	0	0	0	0	10^6	10^6	<90%
1%	2×10^4	6×10^2	$1,2 \times 10^3$	0	0	8×10^3	10^6	10^6	
0,5%	2×10^4	$1,7 \times 10^3$	7×10^3	10^3	$2,4 \times 10^3$	10^6	10^6	10^6	
0,25%	10^6	2×10^4	2×10^4	10^4	2×10^4	10^6	10^6	10^6	
TEA TREE OIL									
4%	7×10^2	0	0	0	0	0	0	0	
2%	$3,8 \times 10^3$	9×10^2	0	0	0	0	0	0	
1%	$8,7 \times 10^3$	7×10^3	$5,5 \times 10^3$	3×10^2	0	0	0	10^6	NR
0,5%	4×10^3	10^4	2×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	46,24%
0,25%	$2,8 \times 10^3$	10^4	4×10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	
THYME OIL									
0,5%	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,25%	$6,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	
0,125%	4×10^4	$2,5 \times 10^4$	7×10^2	0	0	0	0	0	
0,063%	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	94,36%



B.3.2.14. Συγκεντρωτικοί πίνακες

Πίνακας 65: MIC, MBC ΚΑΙ MIC (OD) αιθέριων ελαίων έναντι των Gram (-) βακτηρίων
(MIC, MBC, MIC(OD) Chamomile blue oil: >4% v/v)

ΣΤΕΛΕΧΗ GRAM (-) ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)
<i>A. baumannii</i>	0,28	0,31	0,37	0,75	0,95	0,5	0,23	0,25	0,25	0,33	0,37	0,25
<i>K. pneumoniae</i>	1	1,3	NR	2,2	2,6	1,5	0,6	0,65	0,5	1	1,5	NR
<i>E. aerogenes</i>	2,5	3	4	3,5	3,5	2	0,62	0,62	0,75	3,5	3,5	NR
<i>E. cloacae</i>	1	1	0,25	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,5	3	3	NR
<i>P. aeruginosa</i>	3	3	NR	4	4	NR	1,1	1,3	1,2	4	4	NR
<i>S. enteritidis</i>	0,37	0,37	0,37	1,5	2	1,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	NR
<i>E. coli</i>	0,56	0,56	0,5	2,5	2	1	0,5	0,5	0,5	1,75	1,75	NR
<i>E. coli</i> (τροφιμα)	0,25	0,25	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	NR
<i>M. morgani</i>	0,25	0,25	0,25	1,5	1,5	2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	NR
<i>P. agglomerans</i>	0,25	0,37	0,25	0,5	0,5	NR	0,5	0,5	0,5	0,75	0,5	0,25
<i>Y. enterocolitica</i>	0,19	0,22	0,12	0,43	0,5	0,37	0,37	0,37	0,25	0,25	0,25	0,12

Πίνακας 66: MIC±SD αιθέριων ελαίων έναντι των Gram (-) βακτηρίων

(NR=χωρίς αποτέλεσμα).

ΣΤΕΛΕΧΗ GRAM (-) / ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL	BASIL OIL	TEA TREE OIL	THYME OIL	CHAMOMILE OIL
	MIC ± SD	MIC ± SD	MIC ± SD	MIC ± SD	MIC
<i>A. baumannii</i>	0,28 ±0,06	0,75±0,29	0,23±0,05	0,33±0,09	>4
<i>K. pneumoniae</i>	1±0,00	2,2±0,4	0,6±0,2	1±0,32	>4
<i>E. aerogenes</i>	2,5±NR	3,5±NR	0,62±NR	3,5±NR	>4
<i>E. cloacae</i>	1±NR	0,75±NR	0,75±NR	3±NR	>4
<i>P. aeruginosa</i>	3±0,9	4±0,00	1,1±0,2	4±0,00	>4
<i>S. enteritidis</i>	0,37±0,1	1,5±0,7	0,5±0,00	0,75±0,18	>4
<i>E. coli</i>	0,40±0,21	1,75±1,29	0,5±0,00	1,25±0,75	>4
<i>M. morgani</i>	0,25±NR	1,5±NR	0,25±NR	0,25±NR	>4
<i>P. agglomerans</i>	0,25±NR	0,5±NR	0,5±NR	0,75±NR	>4
<i>Y. enterocolitica</i>	0,19±NR	0,43±NR	0,37±NR	0,25±NR	>4

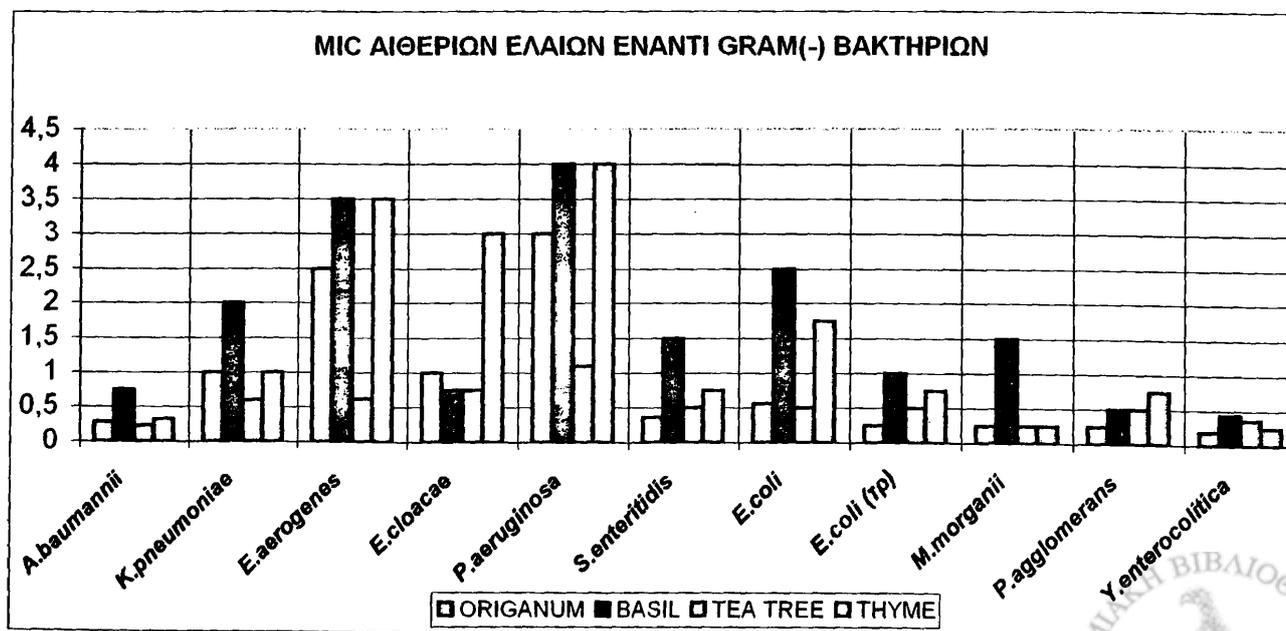
Πίνακας 67: MIC, MBC ΚΑΙ MIC (OD) αιθέριων ελαίων έναντι των Gram (+) βακτηρίων
(NR=χωρίς αποτέλεσμα)

ΣΤΕΛΕΧΗ GRAM (+) ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL			BASIL OIL			TEA TREE OIL			THYME OIL		
	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)	MIC%	MBC%	MIC (OD)
MRSA,MRSE	0,28	0,29	0,23	0,44	0,50	0,20	0,42	0,53	0,25	0,28	0,33	0,19
<i>S.pyogenes</i> , <i>S.agalactiae</i>	0,16	0,17	0,21	1,6	1,7	NR	0,65	0,85	0,66	0,11	0,13	0,12
<i>Listeria spp</i>	0,34	0,35	0,12	1,1	1,4	0,5	1,1	1,2	NR	0,31	0,33	NR
VRE	0,62	0,75	NR	>4	>4	NR	1,5	1,12	0,75	0,75	0,41	NR

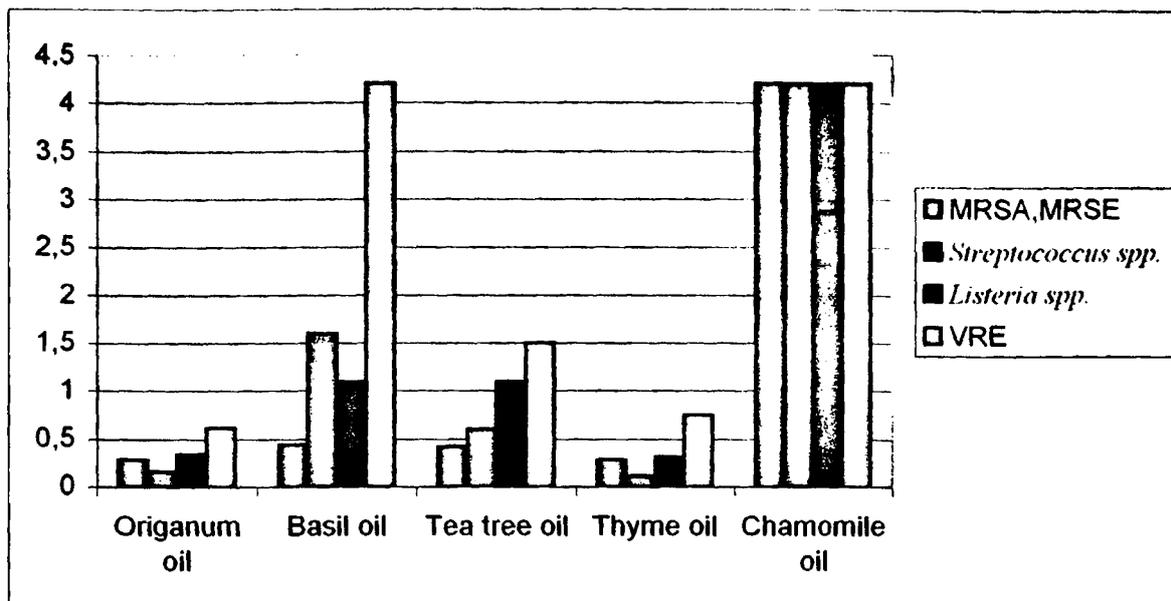
Πίνακας 68: MIC± SD αιθέριων ελαίων έναντι των Gram (+) βακτηρίων

ΣΤΕΛΕΧΗ GRAM (+) ΑΙΘ.ΕΛΑΙΑ	ORIGANUM OIL	BASIL OIL	TEA TREE OIL	THYME OIL	CHAMOMILE OIL
	MIC ± SD	MIC ± SD	MIC ± SD	MIC ± SD	MIC
MRSA,MRSE	0,28 ±0,06	0,44±0,20	0,42±0,13	0,28±0,11	>4
<i>S.pyogenes</i> , <i>S.agalactiae</i>	0,16±0,06	1,6±0,53	0,65±0,2	0,11±0,01	>4
<i>Listeria spp</i>	0,34±0,12	1,1±0,18	1,1±0,18	0,31±0,06	>4
VRE	0,62±0,10	>4	1,5±0,40	0,75±0,00	>4

Γράφημα 14: MIC αιθέριων ελαίων έναντι των Gram(-) βακτηρίων



Γράφημα 15: MIC αιθέριων ελαίων έναντι των Gram (+) βακτηρίων



Β.3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ MIC ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Candida* spp

Εξετάσθηκαν 12 στελέχη του γένους *Candida* spp:

- Τέσσερα κλινικά στελέχη *Candida albicans*, που απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες (αρ.1 και 2), τραύμα (αρ.3) και φαρυγγικό επίχρισμα (αρ.4)
- Πέντε κλινικά στελέχη *Candida parapsilosis*, που απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες
- Δύο κλινικά στελέχη *Candida tropicalis*, που απομονώθηκαν από καλλιέργειες ούρων και
- Ένα κλινικό στέλεχος *Candida glabrata*, που απομονώθηκε από αιμοκαλλιέργεια.
- Επίσης μελετήθηκε η δράση των αιθέριων ελαίων έναντι του πρότυπου στελέχους *Candida albicans* ATCC 10231.

Στον πίνακα 69 παρουσιάζεται ο έλεγχος ευαισθησίας των παραπάνω στελεχών στα αντιμυκητιασικά, στους πίνακες 70, 71, 72, 73 και 74 η δράση των αιθέριων ελαίων της ρίγανης, βασιλικού, τειόδενδρου, θυμαριού και χαμομηλιού αντίστοιχα και συγκεκριμένα οι: MIC(24h), MIC(48h), η MIC με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας (OD) και η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα μετά από επώαση επτά ημερών.



Πίνακας 69: Έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών του γένους *Candida* spp στα αντιμυκητιασικά (FL=fluconazole, KE=ketoconazole, VO=voriconazole, IT= itraconazole, FC= 5-flucytosine, AP= amphotericin B)

(R= ανθεκτικό, S= ευαίσθητο, I= ενδιάμεση ευαισθησία, NT= δεν εξετάστηκε)

	FL	KE	VO	IT	FC	AP
<i>C. albicans 1</i>	R	R	R	R	S	S
<i>C. albicans 2</i>	R	R	R	R	S	S
<i>C. albicans 3</i>	R	S	S	S	S	S
<i>C. albicans 4</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis 1</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis 2</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis 3</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis 4</i>	S	S	S	I	S	S
<i>C. parapsilosis 5</i>	S	S	S	R	S	S
<i>C. tropicalis 1</i>	S	NT	NT	NT	NT	S
<i>C. tropicalis 2</i>	S	S	NT	NT	NT	S
<i>C. glabrata</i>	S	S	S	S	NT	S

Πίνακας 70: Μελέτη δράσης αιθέριου ελαίου ρίγανης έναντι των στελεχών του γένους *Candida* spp

	MIC 24	MIC48	MIC(OD)	MIC(7 DAYS)
<i>C. albicans 1</i>	0,25	0,25	0,12	0,25
<i>C. albicans 2</i>	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>C. albicans 3</i>	0,18	0,25	0,12	0,25
<i>C. albicans 4</i>	0,18	0,25	0,18	0,25
<i>C. parapsilosis 1</i>	0,25	0,5	0,12	0,5
<i>C. parapsilosis 2</i>	0,06	0,12	0,06	0,18
<i>C. parapsilosis 3</i>	0,12	0,12	0,12	0,18
<i>C. parapsilosis 4</i>	0,09	0,12	0,09	0,12
<i>C. parapsilosis 5</i>	0,18	0,18	0,12	0,18
<i>C. tropicalis 1</i>	0,12	0,12	0,06	0,12
<i>C. tropicalis 2</i>	0,12	0,12	0,12	0,18
<i>C. glabrata</i>	0,12	0,12	0,12	0,18
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,16	0,20	0,12	0,22
S.D	0,06	0,11	0,05	0,10
<i>C albicans 10231</i>	0,06	0,09	0,06	0,09



Πίνακας 71: Μελέτη δράσης αιθέριου ελαίου βασιλικού έναντι των στελεχών του γένους *Candida* spp

	MIC 24	MIC 48	MIC(OD)	MIC(7 DAYS)
<i>C. albicans 1</i>	0,09	0,09	0,06	0,25
<i>C. albicans 2</i>	0,37	0,37	0,25	0,5
<i>C. albicans 3</i>	0,06	0,06	0,06	0,12
<i>C. albicans 4</i>	0,25	0,37	0,18	0,37
<i>C. parapsilosis 1</i>	0,09	0,12	0,06	0,25
<i>C. parapsilosis 2</i>	0,12	0,12	0,12	0,12
<i>C. parapsilosis 3</i>	0,18	0,18	0,12	0,18
<i>C. parapsilosis 4</i>	0,12	0,12	0,12	0,18
<i>C. parapsilosis 5</i>	0,25	0,25	0,18	0,25
<i>C. tropicalis 1</i>	0,25	0,37	0,12	0,37
<i>C. tropicalis 2</i>	0,25	0,37	0,12	0,37
<i>C. glabrata</i>	0,18	0,18	0,12	0,18
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,18	0,22	0,13	0,25
<i>S.D</i>	0,09	0,12	0,05	0,11
<i>C albicans 10231</i>	0,18	0,25	0,12	0,25

Πίνακας 72: Μελέτη δράσης αιθέριου ελαίου τεϊόδενδρου έναντι των στελεχών του γένους *Candida* spp

	MIC 24	MIC 48	MIC(OD)	MIC(7 DAYS)
<i>C. albicans 1</i>	0,25	0,25	0,12	0,37
<i>C. albicans 2</i>	0,25	0,37	0,25	0,37
<i>C. albicans 3</i>	0,25	0,25	0,18	0,25
<i>C. albicans 4</i>	0,25	0,25	0,18	0,25
<i>C. parapsilosis 1</i>	0,25	0,5	0,12	0,5
<i>C. parapsilosis 2</i>	0,09	0,12	0,12	0,12
<i>C. parapsilosis 3</i>	0,12	0,12	0,12	0,12
<i>C. parapsilosis 4</i>	0,09	0,12	0,09	0,12
<i>C. parapsilosis 5</i>	0,25	0,25	0,18	0,25
<i>C. tropicalis 1</i>	0,12	0,18	0,12	0,18
<i>C. tropicalis 2</i>	0,18	0,18	0,12	0,18
<i>C. glabrata</i>	0,12	0,18	0,12	0,18
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,18	0,23	0,14	0,24
<i>S.D</i>	0,07	0,11	0,04	0,11
<i>C albicans 10231</i>	0,18	0,18	0,12	0,18



Πίνακας 73: Μελέτη δράσης αιθέριου ελαίου θυμαριού έναντι των στελεχών του γένους *Candida* spp

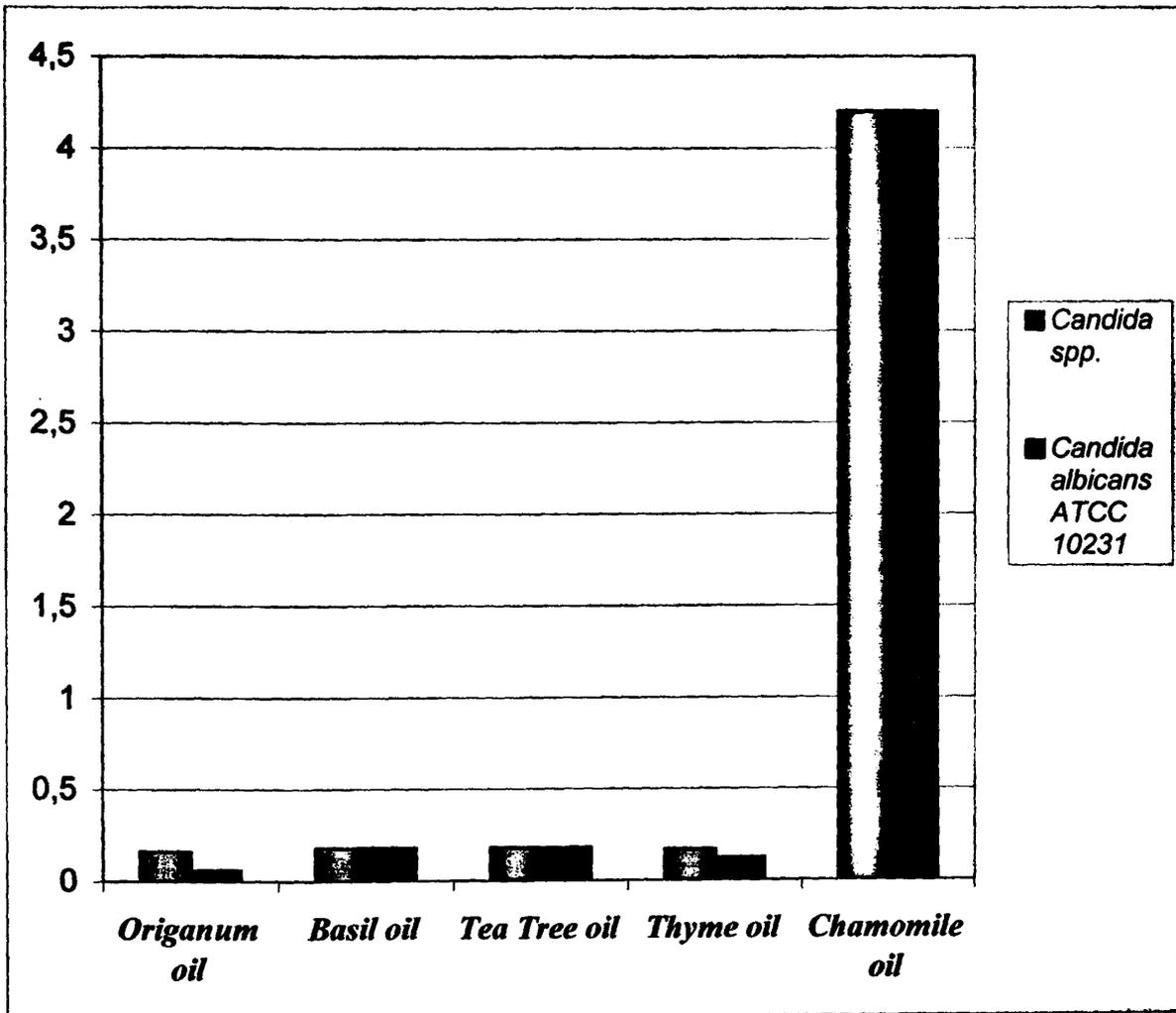
	MIC 24	MIC 48	MIC(OD)	MIC(7 DAYS)
<i>C. albicans 1</i>	0,25	0,25	0,12	0,25
<i>C. albicans 2</i>	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>C. albicans 3</i>	0,18	0,18	0,12	0,18
<i>C. albicans 4</i>	0,18	0,18	0,18	0,18
<i>C. parapsilosis 1</i>	0,25	0,5	0,12	0,5
<i>C. parapsilosis 2</i>	0,12	0,12	0,12	0,12
<i>C. parapsilosis 3</i>	0,12	0,18	0,12	0,18
<i>C. parapsilosis 4</i>	0,12	0,12	0,12	0,12
<i>C. parapsilosis 5</i>	0,18	0,18	0,12	0,18
<i>C. tropicalis 1</i>	0,12	0,12	0,06	0,18
<i>C. tropicalis 2</i>	0,12	0,12	0,12	0,18
<i>C. glabrata</i>	0,12	0,12	0,12	0,12
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,17	0,19	0,13	0,20
S.D	0,05	0,10	0,05	0,10
<i>C albicans 10231</i>	0,12	0,12	0,09	0,12

Πίνακας 74: Μελέτη δράσης αιθέριου ελαίου χαμομηλιού έναντι των στελεχών του γένους *Candida* spp

	MIC 24	MIC 48	MIC(OD)	MIC(7 DAYS)
<i>C. albicans 1</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. albicans 2</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. albicans 3</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. albicans 4</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. parapsilosis 1</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. parapsilosis 2</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. parapsilosis 3</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. parapsilosis 4</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. parapsilosis 5</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. tropicalis 1</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. tropicalis 2</i>	>4	>4	>4	>4
<i>C. glabrata</i>	>4	>4	>4	>4
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	>4	>4	>4	>4
<i>C albicans 10231</i>	>4	>4	>4	>4



Γράφημα 16: Μέση τιμή MIC (24h) των εξεταζόμενων αιθέριων ελαίων έναντι των στελεχών *Candida* και του *Candida albicans* ATCC 10231



B.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια η αντοχή των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά αποτελεί ένα τεράστιο πρόβλημα, με κοινωνικές και οικονομικές προεκτάσεις, απασχολώντας έντονα τους παγκόσμιους φορείς υγείας και τη διεθνή επιστημονική κοινότητα. Η εμφάνιση ολοένα και περισσότερων βακτηρίων που εμφανίζουν αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά ταυτόχρονα είναι άμεση συνέπεια της υπερκατανάλωσής τους στην ιατρική, στη ζωική παραγωγή και στη γεωργία. Τα πρόσθετα τροφίμων επίσης, που συνήθως είναι συνθετικές ουσίες και εξασφαλίζουν συντήρηση εμποδίζοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών, θεωρούνται επιβλαβή για την υγεία και καθημερινά αποφασίζεται αναστολή της χρήσης για πολλά από αυτά. Έτσι καθίσταται επιτακτική η ανακάλυψη νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων με πολυπαραγοντικό ρόλο και προς αυτή την κατεύθυνση στρέφεται το ερευνητικό ενδιαφέρον στη μελέτη νέων ουσιών, όπως είναι τα αιθέρια έλαια.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που αφορούν την αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων, με αποτελέσματα που ποικίλουν και σε αρκετές περιπτώσεις είναι παρόμοια με τα δικά μας. Ωστόσο οι μικροοργανισμοί που εξετάζονται είναι στην πλειοψηφία τους ευαίσθητοι στα αντιβιοτικά, ενώ πολλές φορές δεν ελέγχονται καν ως προς την ευαισθησία τους σε αυτά, ενώ είναι κυρίως παθογόνα που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα, σε αντίθεση με τη δική μας μελέτη που εξετάσαμε και πολυανθεκτικά στελέχη κλινικών κυρίως δειγμάτων, ανοσοκατασταλμένων ασθενών κατά βάση, σε πρότυπα αιθέρια έλαια. Επιπρόσθετα διαφορές προκύπτουν από την ποικιλία στη χημική συγγένεια των ελαίων, στην ποσοστιαία περιεκτικότητα των δομικών συστατικών τους και στο είδος της μεθόδου που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, σε πολλές μελέτες χρησιμοποιούνται εγχώρια φυτικά εκχυλίσματα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαφορές ως προς τη χημική τους σύσταση και στην αναλογία των δραστικών συστατικών, ενώ στη μεθολογία πολύ συχνή είναι η χρησιμοποίηση της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ και η μέτρηση ζωνών αναστολής.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν σε αρκετά από τα εξεταζόμενα παθογόνα στελέχη σημαντική αντιμικροβιακή δράση.

Έτσι τα αιθέρια έλαια ρίγανης και θυμαριού αποδείχθηκαν τα ισχυρότερα έναντι των Gram (+) βακτηρίων με μικρότερη τιμή 0,063% v/v για την MIC (*S. pyogenes*), ενώ στα Gram (-) βακτήρια αντίστοιχη δράση είχαν τα έλαια του τειόδενδρου, της ρίγανης και του θυμαριού.



Το αιθέριο έλαιο με την ασθενέστερη αντιμικροβιακή δράση ήταν το έλαιο του μπλε χαμομηλιού, ενώ το ανθεκτικότερο βακτηριακό στέλεχος ήταν η *P. aeruginosa*.

Ισχυρή ήταν επίσης και η ανασταλτική δράση των ελαίων έναντι των στελεχών *Candida spp*, με ισοδύναμη δράση από όλα τα έλαια εκτός του χαμομηλιού και τιμές MIC που κυμάνθηκαν από 0,063% v/v έως 0,37% v/v. Το αιθέριο έλαιο του μπλε χαμομηλιού δεν εμφάνισε καμία αντιμυκητιασική δράση.

Αρκετές απ' τις αντίστοιχες ή παρόμοιες δημοσιευμένες εργασίες που έχουν γίνει παγκοσμίως παρουσιάζουν παρεμφερή αποτελέσματα με τα δικά μας.

B.4.1 Πρότυπα στελέχη

Στην Αυστραλία σε μελέτη που αφορούσε τέσσερα αιθέρια έλαια (tea tree oil, basil oil, origanum oil, thyme oil), βρέθηκαν αντίστοιχα οι παρακάτω τιμές MIC για τα στελέχη που εξετάστηκαν προερχόμενα από το National Collection of Type Culture (NCTC) και το American Type Culture Collection (ATCC): *A. baumannii* NCTC 7844 0,25% v/v, 0,5% v/v, 0,12% v/v και 0,12% v/v, *E. faecalis* NCTC 8213 2% v/v, >2% v/v, 0,25% v/v και 0,5% v/v, *E. coli* NCTC 10418 0,25% v/v, 0,5% v/v, 0,12% v/v και 0,12% v/v, *K. pneumoniae* NCTC 11228 0,5% v/v, 2% v/v, 0,12% v/v και 0,25% v/v, *P. aeruginosa* NCTC 10662 >2% v/v, >2% v/v, 2% v/v και >2% v/v, *S. aureus* NCTC 6571 0,5% v/v, 2% v/v, 0,12% v/v και 0,25% v/v, *C. albicans* ATCC 10231 0,5% v/v, 0,5% v/v, 0,12% v/v και 0,12% v/v. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μικρομέθοδος αραιώσεων σε ζωμό (Hammer και συν., 1999).

Στην Αργεντινή οι Moreira και συν. (2005) βρήκαν MIC για το αιθέριο έλαιο του βασιλικού 1,9% v/v και για το έλαιο του τειϊόδενδρου 0,5% v/v έναντι του στελέχους *E. coli* 0157:H7 ATCC 25158. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ.

Οι Carson και συν. (2002), όταν εξέτασαν το αιθέριο έλαιο του τειϊόδενδρου με τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό έναντι του *S. aureus* ATCC 9144 στην Αυστραλία βρήκαν MIC ίση με 0,25% v/v και MBC ίση με 0,5% v/v.

Οι Nostro και συν. (2004) στην Ιταλία βρήκαν την MIC του ελαίου της ρίγανης 0,125% v/v έναντι των πρότυπων *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 και *S. epidermidis* ATCC 12228, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ.

Στην Αυστραλία, σε μελέτη που αφορούσε το αιθέριο έλαιο του τειϊόδενδρου, βρέθηκαν τιμές MIC με τη μικρομέθοδο αραιώσεων και τη χρήση άγαρ για τα: *E. coli* NCTC 8196 0,31% v/v, *S. aureus* NCTC 4163 0,08% v/v, ενώ οι αντίστοιχες τιμές με τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας ήταν 0,08% v/v και 0,04% v/v αντίστοιχα (Mann και Markham, 1997).



Οι Preuss και συν. (2005) στις Η.Π.Α μελετώντας τη δράση του ριγανέλαιου έναντι του πρότυπου στελέχους *S. aureus* ATCC 33591 με τη μακρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό προσδιόρισαν την MIC σε 0,5% v/v, ενώ οι Manohar και συν. (2001) στις Η.Π.Α χρησιμοποιώντας μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό ανέφεραν ότι το ριγανέλαιο είχε μυκητοκτόνο δράση έναντι της *C. albicans* ATCC 48274 σε συγκέντρωση 0,25 mg/ml.

Στη Σκωτία προσδιορίστηκαν οι MIC του αιθέριου ελαίου του τειόδενδρου για τα πρότυπα στελέχη *S. aureus* ATCC 25923 και *S. aureus* NCTC 6571 με τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό και βρέθηκαν 0,25% v/v (Nelson, 2000).

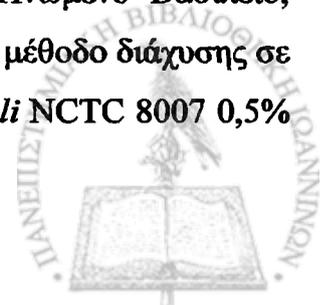
Για το ίδιο έλαιο στην Αυστραλία οι Longbottom και συν. (2004) προσδιόρισαν την MIC στο 4% v/v έναντι των στελεχών *P. aeruginosa* NCTC 6749 και *P. aeruginosa* NCTC 10662 χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ και οι αντίστοιχες τιμές για τα αιθέρια έλαια ρίγανης και βασιλικού έναντι του στελέχους *C. albicans* ATCC 10231 ήταν 0,12% v/v και 0,5% v/v αντίστοιχα (Hammer και συν., 1998), ενώ οι Carson και συν. (2002) σε αντίστοιχη μελέτη προσδιόρισαν τις MIC και MBC για το πρότυπο στέλεχος *S. aureus* ATCC 9144 στο 0,25% v/v χρησιμοποιώντας τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό.

Η αντιμυκητιασική δράση του αιθέριου ελαίου του τειόδενδρου σε μελέτη που έγινε στην Ιταλία έναντι πρότυπων στελεχών του γένους *Candida* spp με τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό διαπιστώθηκε με τις παρακάτω τιμές MIC ως εξής: *C. albicans* ATCC 24433 0,25% v/v, *C. albicans* ATCC 76615 0,25% v/v, *C. albicans* ATCC 90029 0,25% v/v, *C. albicans* ATCC 10231 0,25% v/v, *C. tropicalis* ATCC 750 0,06% v/v, *C. parapsilosis* ATCC 22019 0,125% v/v, *C. krusei* ATCC 6258 0,25% v/v και *C. glabrata* ATCC 90030 0,06% v/v (Mondello και συν., 2006).

Στην Αυστραλία οι Hammer και συν. (2003a) για το ίδιο έλαιο χρησιμοποιώντας τη μικρομέθοδο και τη μακρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό, προσδιόρισαν την MIC σε 0,5% v/v και 0,25% v/v αντίστοιχα έναντι του στελέχους *C. albicans* ATCC 10231.

Οι Pina-Vaz και συν. (2004) στην Πορτογαλία, μελετώντας το αιθέριο έλαιο του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) με τη μακρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό βρήκαν τις παρακάτω τιμές MIC για τα εξεταζόμενα πρότυπα στελέχη *Candida* spp: *C. albicans* ATCC 10231 0,16-0,32 μL/mL, *C. tropicalis* ATCC 13803 0,16-0,32 μL/mL, *C. parapsilosis* ATCC 90018 0,16-0,32 μL/mL.

Οι Smith-Palmer και συν. (1998), σε μελέτη που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο, χρησιμοποιώντας τα αιθέρια έλαια του βασιλικού και του θυμαριού και τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με τη μορφή διαλυμάτων σε εμβυθίσματα, βρήκαν MIC για το *E. coli* NCTC 8007 0,5%



v/v και 0,1% v/v, *S. aureus* NCTC 10657 0,5% v/v και 0,03% v/v, *L. monocytogenes* NCTC 11994 0,25% v/v και 0,03% v/v, *S. enteritidis* NCTC 4444 0,5% v/v και 0,04% v/v αντίστοιχα.

Πίνακας 74: Αντιμικροβιακή δράση αιθέριων ελαίων σε πρότυπα στελέχη που εξετάστηκαν και στην παρούσα εργασία, (-): Δεν υπάρχει σχετική αναφορά

Μελέτη	Προέλευση ελαίων	Έλαιο-Υπερισχύον συστατικό	Στελέχη	Μέθοδος	MIC (v/v)
Hammer και συν. (1999)	Sunspirit Oils, Pty, Ltd, NSW, Australia	<i>M.alternifolia</i> (-) <i>O. vulgare</i> (-) <i>O. basilicum</i> (-) <i>T. vulgaris</i> (-)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Μικρομέθοδος	0,5% 0,12% 0,5% 0,12%
Nostro και συν. (2004)	Εγγώριο (Italy)	<i>O.vulgare</i> (thymol)	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	Διάχυση σε άγαρ	0,125% 0,125%
Hammer και συν. (1998)	Sunspirit Oils, Pty, Ltd, NSW, Australia	<i>O. vulgare</i> (-) <i>O. basilicum</i> (-)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Διάχυση σε άγαρ	0,12% 0,5%
Mondello και συν. (2006)	Variati, Italy	<i>M.alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Μικρομέθοδος	0,25%
Hammer και συν. (2003a)	Australian Plantations Pty, Australia	<i>M.alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Μικρομέθοδος Μακρομέθοδος	0,5% 0,25%
Pina-Vaz και συν. (2004)	Segredo Planta Produtos Naturas Biologicas, Lda, Portugal	<i>T. vulgaris</i> (carvacrol)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Μακρομέθοδος	0,024%
Παρούσα εργασία	Sigma Co-Kosher, Germany	<i>O. vulgare</i> (carvacrol) <i>T. vulgaris</i> (thymol) <i>O. basilicum</i> (methyl chavicol) <i>M.alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>S. aureus</i> ATCC 43300 <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228 <i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>C. albicans</i> ATCC 10231	Μακρομέθοδος	0,06% 0,12% 0,18% 0,12% 0,18% 0,18%



B.4.2 Μικροοργανισμοί φυσιολογικής χλωρίδας

Το εύρος τιμών για την MIC και MBC έναντι των στελεχών *Streptococcus* spp, που απομονώθηκαν από τη στοματική κοιλότητα υγιών εθελοντών σε μελέτη που έγινε στην Αυστραλία και αφορούσε το αιθέριο έλαιο του τεϊόδενδρου ήταν 0,25% v/v -1% v/v και 0,25% v/v -2% v/v αντίστοιχα, με τη χρήση της μικρομέθόδου αραιώσεων σε ζωμό (Hammer και συν., 2003b).

B.4.3 Στελέχη που ενοχοποιούνται για τροφιμογενή νοσήματα

Στην Ισπανία σε έρευνα που αφορούσε το αιθέριο έλαιο της ρίγανης, βρέθηκε ότι η MIC για τα στελέχη *S. enteritidis* και *E. coli* ήταν 0,25% v/v και 4% v/v αντίστοιχα, ενώ για το αιθέριο έλαιο της ισπανικής ποικιλίας θυμαριού (*T. zygis*) ήταν 2% v/v και 4% v/v αντίστοιχα. Τα στελέχη απομονώθηκαν από πουλερικά με προβλήματα ανάπτυξης και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μικρομέθοδος αραιώσεων σε ζωμό (Penalver και συν., 2005).

Για το στέλεχος *E. coli* 0157:H7 που απομονώθηκε από κόπρανα βοοειδών οι Burt και Reinders (2002) στην Ολλανδία, χρησιμοποιώντας τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό, βρήκαν τιμές MIC και MBC για το ριγανέλαιο 0,078% v/v και 0,156% v/v και το θυμαρέλαιο 0,078% v/v και 0,156% v/v αντίστοιχα.

Στην Αργεντινή οι Moreira και συν. (2005) βρήκαν MIC για το αιθέριο έλαιο του βασιλικού 1,9% v/v και για το έλαιο του τεϊόδενδρου 0,5% v/v έναντι δύο στελεχών *E. coli* 0157:H7 που απομονώθηκαν από προϊόντα κρέατος με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ.



Πίνακας 75: Αντιμικροβιακή δράση αιθέριων ελαίων σε στελέχη που εξετάστηκαν και στην παρούσα εργασία

Μελέτη	Προέλευση ελαίων	Έλαιο-Υπερισχύον συστατικό	Στελέχη/Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά	Μέθοδος	MIC (v/v)
Penalver και συν. (2005)	Εγγώριο (Spain)	<i>O. vulgare</i> (carvacrol)	<i>E. coli</i> / όχι <i>S. enteritidis</i> /όχι	Μικρομέθοδος	4% 0,25%
Burt και Reinders (2002)	C. Melchers E.O, Handels GmbH, Bremen, Germany	<i>O. vulgare</i> (-) <i>T. vulgaris</i> (-)	<i>E. coli</i> 0157:H7 /όχι	Μικρομέθοδος	0,078% 0,078%
Moreira και συν. (2005)	Nelson Russell, London, England	<i>O. basilicum</i> (-) <i>M. alternifolia</i> (-)	<i>E. coli</i> 0157:H7 /όχι	Διάχυση σε άγαρ	1,9% 0,5%
Παρούσα εργασία	Sigma Co-Kosher, Germany	<i>O. vulgare</i> (carvacrol) <i>T. vulgaris</i> (thymol) <i>O. basilicum</i> (methyl chavicol) <i>M. alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>E. coli</i> / ναι <i>S. enteritidis</i> /ναι <i>E. coli</i> 0157:H7 /ναι <i>E. coli</i> 0157:H7 /ναι <i>E. coli</i> 0157:H7 /ναι <i>E. coli</i> 0157:H7 /ναι	Μακρομέθοδος	0,25% 0,37% 0,25% 1% 1% 0,5%

(-): Δεν υπάρχει σχετική αναφορά

B.4.4 Κλινικά παθογόνα στελέχη

Οι Nostro και συν. (2004) στην Ιταλία μελετώντας MRSA και MRSE κλινικά στελέχη με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ προσδιόρισαν εύρος τιμών MIC για το αιθέριο έλαιο της ρίγανης 0,063% v/v -0,125% v/v.

Οι Mann και Markham (1997), σε μελέτη που έγινε στην Αυστραλία, χρησιμοποιώντας τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό προσδιόρισαν την MIC του αιθέριου ελαίου του τειόδενδρου χρησιμοποιώντας την καταμέτρηση αποικιών σε άγαρ και τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας και κατέληξαν στις παρακάτω τιμές για τα κλινικά παθογόνα στελέχη που μελέτησαν: Group A *Streptococcus* 0,08% v/v και 0,08% v/v, Group B *Streptococcus* 0,31% v/v και 0,31% v/v, MRSA 0,08% v/v και 0,04% v/v αντίστοιχα.



Αναφορά στη δράση του αιθέριου έλαιου του τειόδενδρου, από διάφορες μελέτες, κάνουν και οι Halkon και Milkus (2004), σύμφωνα με τους οποίους οι τιμές MIC για τον *S. aureus* ήταν 0,32% v/v -0,5% v/v, για τον *S. pyogenes* 0,12% v/v, για τον *S. epidermidis* 1% v/v και για την *P. aeruginosa* 1% v/v -5% v/v.

Σε άλλη μελέτη στις Η.Π.Α η MIC και η MBC του αιθέριου ελαίου της ρίγανης βρέθηκε 0,5% v/v για τα στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli*, με τη χρήση της μικρομεθόδου αραιώσεων σε ζωμό (Preuss και συν., 2005).

Οι Hammer και συν. (1996) στην Αυστραλία χρησιμοποιώντας τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό βρήκαν MIC και MBC για το αιθέριο έλαιο του τειόδενδρου στο *A. baumannii* 1% v/v και 1% v/v, *K. pneumoniae* 0,25% v/v και 0,25% v/v, *P. aeruginosa* 3% v/v και 3% v/v, *S. aureus* 0,5% v/v και 2% v/v, *S. epidermidis* 1% v/v και 4% v/v αντίστοιχα.

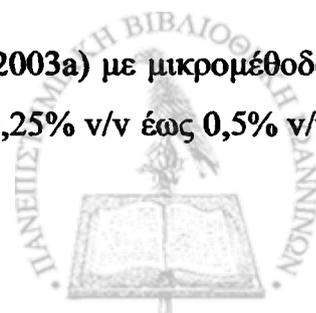
Σε άλλη μελέτη του ελαίου του τειόδενδρου που έγινε στην Αυστραλία, οι MIC και MBC για 30 στελέχη *P. aeruginosa* με τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό βρέθηκαν 4% v/v (Papadopoulos και συν., 2006).

Στη Σκωτία προσδιορίστηκε η MIC του ίδιου ελαίου για κλινικά στελέχη MRSA με την ίδια μέθοδο και βρέθηκε 0,25% v/v (Nelson, 2000).

Οι τιμές MIC για το αιθέριο έλαιο του τειόδενδρου έναντι 41 ανθεκτικών στις αζόλες στελεχών *Candida* spp ήταν για την *C. albicans* 0,25% v/v -1% v/v, για την *C. glabrata* 0,125% v/v -1% v/v, για την *C. tropicalis* 0,25% v/v και για την *C. parapsilosis* 0,25% v/v, σε μελέτη που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ (Bagg και συν., 2006), ενώ σε αντίστοιχη μελέτη στην Αυστραλία με τη χρήση μικρομεθόδου αραιώσεων σε ζωμό, οι τιμές MIC για το αιθέριο έλαιο του τειόδενδρου έναντι στελεχών *Candida* spp ήταν για την *C. albicans* 0,25% v/v -0,5% v/v, για την *C. glabrata* 0,12% v/v -0,5% v/v και για την *C. parapsilosis* 0,25% v/v (Hammer και συν., 1998).

Η αντιμυκητιασική δράση του αιθέριου ελαίου του τειόδενδρου έναντι κλινικών στελεχών του γένους *Candida* spp σε μελέτη που έγινε στην Ιταλία με τη χρήση μικρομεθόδου αραιώσεων σε ζωμό εκφράστηκε με τις παρακάτω τιμές MIC: *C. albicans* 0,06% v/v -0,5% v/v, *C. parapsilosis* 0,03% v/v -0,125% v/v και *C. glabrata* 0,03% v/v -0,125% v/v (Mondello και συν., 2003), ενώ σε αντίστοιχη μελέτη για 49 ευαίσθητα και ανθεκτικά στις αζόλες κλινικά στελέχη *C. albicans* το εύρος τιμών της MIC ήταν 0,25% v/v -0,5% v/v (Mondello και συν., 2006).

Μελετώντας τη δράση του ίδιου ελαίου οι Hammer και συν. (2003a) με μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό, προσδιόρισαν την MIC για την *C. albicans* από 0,25% v/v έως 0,5% v/v



και για την *C. parapsilosis* 0,25% v/v (Αυστραλία), ενώ οι Oliva και συν. (2003) βρήκαν τιμές MIC 0,125% v/v για το ΤΤΟ έναντι στελεχών *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* (Ιταλία).

Σε μελέτη των Giordani και συν. (2004) στην Ιταλία τα αιθέρια έλαια του θυμαριού (χημειότυπος θυμόλης) και της ρίγανης ανέστειλαν την ανάπτυξη της *C. albicans* κατά 80%, σε συγκεντρώσεις 0,016 $\mu\text{L}/\text{mL}$ και 0,421 $\mu\text{L}/\text{mL}$ αντίστοιχα με τη χρήση μακρομέθodu αραιώσεων σε ζωμό.

Οι Pina-Vaz και συν. (2004) στην Πορτογαλία μελετώντας το αιθέριο έλαιο του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) με τη μακρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό έναντι στελεχών *Candida* προσδιόρισαν εύρος τιμών MIC 0,16-0,32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για τα εξεταζόμενα στελέχη *C. albicans*, *C. glabrata*, και 0,32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για την *C. tropicalis*.

Πίνακας 76: Εργασίες που αφορούν τη δράση αιθέριων ελαίων σε κλινικά στελέχη συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας διατριβής

Μελέτη	Προέλευση ελαίων	Έλαιο-Υπερισχόν συστατικό	Στελέχη/Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά	Μέθοδος	MIC % (v/v)
Nostro και συν. (2004)	Εγγώριο (Italy)	<i>O.vulgare</i> (thymol)	MRSA MRSE	Διάχυση σε άγαρ	0,09 0,09
Mann και Markham (1997)	W. Institute, Wolongbar Australia	<i>M.alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	GroupA <i>Streptococcus</i> /όχι GroupB <i>Streptococcus</i> /όχι MRSA	Μικρομέθοδος	0,08 0,31 0,08
Halkon και Milkus (2004) *	Πουκίλη	<i>M. alternifolia</i>	<i>S. aureus</i> (-) <i>S. pyogenes</i> (-) <i>S. epidermidis</i> (-) <i>P. aeruginosa</i> (-)	Πουκίλες	0,32-0,5 0,12 1 1-5
Preuss και συν. (2005)	North American Herb Spices, Inc, Wakegan, IL, USA	<i>O.vulgare</i> (-)	<i>S. aureus</i> /vαι** <i>E. coli</i> /vαι** <i>K. pneumoniae</i> /όχι	Μακρομέθοδος	0,5 0,5 0,5



Hammer και συν. (1996)	Australian Plantations Pty,Ltd, Australia	<i>M. alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>A. baumannii</i> /όχι <i>K. pneumoniae</i> /όχι <i>P. aeruginosa</i> /όχι <i>S. aureus</i> /όχι <i>S. epidermidis</i> /όχι	Μικρομέθοδος	1 0,25 3 0,5 1
Papadopoulos και συν. (2006)	Εγχώρια (Australia)	<i>M. alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>P.aeruginosa</i> /ναι***	Μικρομέθοδος	4
Nelson (2000)	Health Imports, Bradford, UK	<i>M. alternifolia</i> (-)	MRSA	Μικρομέθοδος	0,25
Bagg και συν. (2006)	Weilbeing, Birmingham UK	<i>M. alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>C. albicans</i> /ναι <i>C. glabrata</i> /ναι <i>C. tropicalis</i> /ναι <i>C. parapsilosis</i> /ναι	Διάχυση σε άγαρ	0,25-1 0,12-1 0,25 0,25
Hammer και συν. (1998)	Sunspirit Oils,Pty, Ltd,NSW, Australia	<i>M. alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>C. albicans</i> /όχι <i>C. glabrata</i> /όχι <i>C. parapsilosis</i> /όχι	Μικρομέθοδος	0,25-0,5 0,12-0,5 0,25
Mondello και συν. (2003)	Ballina,Ltd NSW, Australia	<i>M. alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>C. albicans</i> /ναι <i>C. glabrata</i> /ναι <i>C. parapsilosis</i> /ναι	Μικρομέθοδος	0,06-0,5 0,03-0,12 0,03-0,12
Mondello και συν. (2006)	Variati, Milan, Italy	<i>M. alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>C. albicans</i> /ναι	Μικρομέθοδος	0,25-0,5
Hammer και συν. (2003a)	Australian Plantations Pty,Ltd, Australia	<i>M.alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>C. albicans</i> /όχι <i>C. parapsilosis</i> /όχι	Μικρομέθοδος	0,25-0,5 0,25
Oliva και συν. (2003)	Variati, Milan, Italy	<i>M.alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	<i>C. albicans</i> /ναι <i>C. glabrata</i> /ναι <i>C. parapsilosis</i> /ναι	Μέθοδος αραιώσεων ζυμό	0,125 0,125 0,125
Giordani και συν. (2004)	Cooper, Place Lucien Avert, France	<i>O.vulgare</i> (carvacrol) <i>T.vulgaris</i> (thymol)	<i>C. albicans</i> /ναι	Μακρομέθοδος	0,042 (MIC80) 0,001 (MIC80)
Pina-Vaz και συν. (2004)	Segredo Planta Produtos Naturas Biologicas, Lda, Lisbon, Portugal	<i>T.vulgaris</i> (carvacrol)	<i>C. albicans</i> /ναι <i>C. glabrata</i> /ναι <i>C. tropicalis</i> /ναι	Μακρομέθοδος	0,16-0,32 0,16-0,32 0,32



Παρούσα εργασία	Sigma Co-Kosher, Germany	<i>O. vulgare</i> (carvacrol)	MRSA MRSE <i>E. coli</i> /ναι <i>K. pneumoniae</i> /ναι <i>C. albicans</i> /ναι <i>C. albicans</i> /ναι <i>C. glabrata</i> /ναι <i>C. tropicalis</i> /ναι	Μακρομέθοδος	0,27 0,37 0,46 1 0,21 0,21 0,12 0,12
		<i>T. vulgaris</i> (thymol)			
		<i>M. alternifolia</i> (terpinen-4-ol)	MRSA MRSE GroupA <i>Streptococcus</i> /ναι GroupB <i>Streptococcus</i> /ναι <i>P. aeruginosa</i> /ναι <i>A. baumannii</i> /ναι <i>K. pneumoniae</i> /ναι <i>C. albicans</i> /ναι <i>C. glabrata</i> /ναι <i>C. tropicalis</i> /ναι <i>C. parapsilosis</i> /ναι		0,43 0,37 0,62 0,75 1,1 0,23 0,6 0,25 0,12 0,15 0,14

(-): Δεν υπάρχει σχετική αναφορά

* : Ανασκόπηση, ** : *S. aureus* : Ανθεκτικό στην πενικιλίνη και ευαίσθητο στην βανκομυκίνη, *E. coli*: Ευαίσθητο στην αμοξυκιλλίνη, *** : *P. aeruginosa* : Ευαίσθητο στα αντιβιοτικά



B.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Τα αιθέρια έλαια της ρίγανης, βασιλικού, τεϊόδενδρου και θυμαριού, παρουσιάζουν αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών που εξετάστηκαν.
- Τα Gram (+) βακτήρια και οι μύκητες εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση των αιθέριων ελαίων σε σχέση με τα Gram (-) βακτήρια.
- Τα Gram (+) βακτήρια επίσης, εμφανίζουν κατά πλειοψηφία χαμηλότερη MIC με τη μέτρηση της απορρόφησης (OD method), σε σχέση με τη μέθοδο καταμέτρησης αποικιών. Οι μύκητες εμφανίζουν παραπλήσια αποτελέσματα με τις δύο μεθόδους, ενώ τα Gram (-) βακτήρια δεν εμφανίζουν συγκρίσιμα αποτελέσματα, έως και απουσία αποτελεσμάτων με τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας.
- Τα αιθέρια έλαια της ρίγανης και του θυμαριού παρουσιάζουν την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των Gram (+) βακτηρίων, ακολουθούμενα από τα έλαια του τεϊόδενδρου και του βασιλικού, ενώ το έλαιο του μπλε χαμομηλιού δεν παρουσιάζει καμία αντιμικροβιακή δράση.
- Τα αιθέρια έλαια του τεϊόδενδρου, της ρίγανης και του θυμαριού παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι των Gram (-) βακτηρίων, με ορισμένες εξαιρέσεις στελεχών που είναι αρκετά ανθεκτικά, ακολουθούμενα από το έλαιο του βασιλικού, ενώ το έλαιο του μπλε χαμομηλιού δεν παρουσιάζει καμία αντιμικροβιακή δράση.
- Μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τα εξεταζόμενα Gram (-) στελέχη παρουσιάζει η *P. aeruginosa* και από τα Gram (+) ο vancomycin-resistant *E. faecium*, ενώ μεγαλύτερη ευαισθησία η *Y. enterocolitica* και ο methicillin-resistant *S. aureus* αντίστοιχα.
- Από τα πολυανθεκτικά νοσοκομειακά στελέχη *P. aeruginosa* και *A. baumannii*, το δεύτερο εμφανίζεται αρκετά ευαίσθητο στη δράση των αιθέριων ελαίων σε αντίθεση με το πρώτο που παραμένει ανθεκτικό.
- Τα βακτήρια που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση των ελαίων, με εξαίρεση τα στελέχη της *Listeria* spp στα έλαια του βασιλικού και του τεϊόδενδρου.
- Στο αιθέριο έλαιο της ρίγανης κατά σειρά ευαίσθητα με MIC <0,5% v/v εμφανίζονται από τα Gram (-) τα στελέχη *Y. enterocolitica*, *M. morgani*, *E. coli* (τρόφιμα), *P. agglomerans*, *A. baumannii*, *S. enteritidis* και από τα Gram (+) ο *Streptococcus* spp (group A και group B), οι methicillin-resistant staphylococci, η *Listeria* spp και όλα τα στελέχη *Candida* spp.



- Στο αιθέριο έλαιο του βασιλικού τα στελέχη *Y. enterocolitica* και *P. agglomerans* από τα Gram (-) βακτήρια, οι methicillin-resistant staphylococci από τα Gram (+) βακτήρια και οι μύκητες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία με MIC <0,5% v/v.
- Στο έλαιο του τειόδενδρου κατά σειρά ευαίσθητα με MIC <0,5% v/v εμφανίζονται από τα Gram (-) τα: *A. baumannii*, *M. morgani*, *Y. enterocolitica*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. agglomerans*, από τα Gram (+) οι methicillin-resistant staphylococci και τα στελέχη των μυκήτων.
- Στο αιθέριο έλαιο του θυμαριού τα στελέχη *Y. enterocolitica*, *M. morgani* και *A. baumannii* από τα Gram (-), ο *Streptococcus* spp (group A και group B), οι methicillin-resistant staphylococci και η *Listeria* spp από τα Gram (+), καθώς και οι μύκητες εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία με MIC <0,5% v/v.
- Στο αιθέριο έλαιο του μπλε χαμομηλιού κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη δεν εμφανίζει ευαισθησία (MIC >4% v/v).
- Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων αυξάνει με την πάροδο του χρόνου επώασης, αρχίζει να αναστέλλεται μετά τη 12^η ώρα για πολλά Gram (-) βακτήρια, ενώ συνεχίζει ως τη 48^η ώρα για την πλειοψηφία των Gram (+) βακτηρίων.
- Για τα περισσότερα Gram (-) βακτήρια η αναστολή της ανάπτυξής τους μετά την επαφή με το έλαιο, επιτυγχάνεται αμέσως από τη χρονική στιγμή t=0, ενώ αντίθετα για τα Gram (+) βακτήρια εγκαθίσταται βαθμιαία με την πάροδο του χρόνου και σε μικρότερες αραιώσεις.
- Μεγαλύτερη επαναληψιμότητα ως προς τις συγκεντρώσεις του ελαίου που επιτυγχάνουν αναστολή ανάπτυξης των μικροοργανισμών, παρουσιάζει το έλαιο του τειόδενδρου. Για το συγκεκριμένο έλαιο παίρνουμε και τις περισσότερες τιμές MIC που προκύπτουν από τη μέτρηση της απορρόφησης των αραιώσεων. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το συγκεκριμένο έλαιο με την πάροδο του χρόνου, χάνει το αρχικό γαλακτώδες χρώμα και δίνει μετρήσιμες απορροφήσεις σε μήκος κύματος (μ.κ) 600 nm. Ακολουθεί το έλαιο του βασιλικού, της ρίγανης και του θυμαριού, με το τελευταίο να εμφανίζει τις μεγαλύτερες δυσκολίες στη λήψη μετρήσιμων απορροφήσεων (<2), ακόμη και σε συγκεντρώσεις της τάξης του 0,25% v/v.
- Στους μύκητες οι τιμές της MIC που λαμβάνονται είτε με τη μέθοδο καταμέτρησης αποικιών (viable counts), είτε με τη μέθοδο μέτρησης της απορρόφησης, είναι παραπλήσιες, κάτι που οφείλεται στο γεγονός ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις των ελαίων (στις οποίες αντιστοιχούν οι MIC), δίνουν μετρήσιμες απορροφήσεις.



- Τέλος το έλαιο του μπλε χαμομηλιού εξαιτίας του χρώματός του δεν δίνει μετρήσιμες τιμές απορρόφησης σε $\mu\text{.κ}$ 600 nm, ενώ παρουσιάζει και τη μικρότερη διαλυτότητα από όλα τα χρησιμοποιούμενα έλαια, κάτι που πιθανώς να ευθύνεται και για την ανύπαρκτη αντιμικροβιακή του δράση.
- Με εξαίρεση τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας των αιθέριων ελαίων στους μύκητες, η μέθοδος της οπτικής πυκνότητας στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς υστερεί στην αναπαραγωγικότητα και επαναληψιμότητα αξιόπιστων αποτελεσμάτων.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιστημονική κοινότητα την τελευταία 10ετία έχει έρθει αντιμέτωπη με το οξύ πρόβλημα της αύξησης των ανθεκτικών μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά, το οποίο έχει πάρει μεγάλες διαστάσεις με κοινωνικές και οικονομικές προεκτάσεις. Ταυτόχρονα η αυξανόμενη χρήση των συντηρητικών στα τρόφιμα προκαλεί επίσης ανησυχία, αφού και αυτά συμβάλλουν στην ενίσχυση της αντιβιοαντοχής των μικροοργανισμών, ενώ παράλληλα πολλά από αυτά θεωρούνται επιβλαβή για την υγεία. Ως εκ τούτου τα τελευταία χρόνια έχει εντατικοποιηθεί η έρευνα στον τομέα της αναζήτησης νέων αντιμικροβιακών ουσιών. Η φύση παρέχει πληθώρα συστατικών και εκχυλισμάτων με μεγάλη δομική και βιολογική πολυμορφία, που παρέχουν απεριόριστες δυνατότητες για την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών ουσιών.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης πέντε αιθέριων ελαίων έναντι ευαίσθητων και πολυανθεκτικών κλινικών βακτηριακών στελεχών και μυκήτων, καθώς και πρότυπων στελεχών.

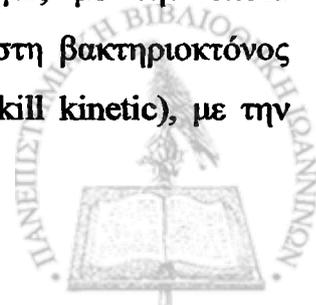
Συγκεκριμένα μελετήθηκε η δράση των πρότυπων αιθέριων ελαίων του βασιλικού, του θυμαριού, της ρίγανης, του τειόδενδρου και του χαμομηλιού έναντι:

- 41 πολυανθεκτικών κυρίως, βακτηριακών στελεχών και 12 κλινικών στελεχών του γένους *Candida* spp που απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων
- 11 στελεχών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τρόφιμα και νερά
- 9 πρότυπων ATCC στελεχών

Για τον έλεγχο ευαισθησίας των στελεχών στα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK II (Bio merieux, France), η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ Bauer-Kirby και το E-test.

Τα πρότυπα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από την εταιρεία Sigma Aldrich Chemie GmbH (Germany) και για την ταυτοποίηση των κύριων δομικών τους συστατικών χρησιμοποιήθηκε η αέριος χρωματογραφία με φασματογράφο μάζας (GC-MS).

Η αντιμικροβιακή δράση των ελαίων έναντι των μικροβιακών στελεχών που εξετάστηκαν, μελετήθηκε με τη μέθοδο των αραιώσεων σε ζωμό, με την οποία προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC), η ελάχιστη βακτηριοκτόνος πυκνότητα (MBC) και η κινητική θανάτωσης των βακτηρίων (time-kill kinetic), με την



καταμέτρηση των αποικιών σε άγαρ (viable counts) και τη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας (optical density method). Όλοι οι πειραματισμοί έγιναν εις διπλούν.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν με εξαίρεση το έλαιο του χαμομηλιού, παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση έναντι των εξεταζόμενων στελεχών.

Τα αιθέρια έλαια της ρίγανης και του θυμαριού εμφάνισαν την ισχυρότερη δράση έναντι των Gram (+) βακτηρίων με μικρότερη τιμή MIC 0,063% v/v. Τα αιθέρια έλαια του τειόδενδρου, της ρίγανης και του θυμαριού εμφάνισαν την ισχυρότερη δράση έναντι των Gram (-) βακτηρίων με μικρότερη τιμή MIC 0,125% v/v. Στους μύκητες η δράση των αιθέριων ελαίων ήταν ισοδύναμη με εξαίρεση την ανενεργή δράση του ελαίου του χαμομηλιού, ενώ η μικρότερη τιμή MIC ήταν 0,063% v/v. Συνολικά το εύρος των τιμών MIC κυμάνθηκε από 0,063 v/v έως >4% v/v.

Ο προσδιορισμός των τιμών MIC με τη μέθοδο της καταμέτρησης των αποικιών σε άγαρ εμφάνισε περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα σε σχέση με την αντίστοιχη μέθοδο της οπτικής πυκνότητας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα αιθέρια έλαια παρουσιάζουν αξιοσημείωτη δράση *in vitro* έναντι ευαίσθητων και πολυανθεκτικών μικροοργανισμών. Μελλοντικά, αφού ταυτοποιηθούν πλήρως οι χημικές ενώσεις των αιθέριων ελαίων, που εμφανίζουν τη συγκεκριμένη αντιμικροβιακή δράση, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη Φαρμακοβιομηχανία και στη Βιομηχανία Τροφίμων για την παρασκευή νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων και νέων πιο ασφαλών συντηρητικών.



IN VITRO INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT ESSENTIAL OILS

By

Hercules Sakkas, MD

SUMMARY

During the last decade the scientific community is trying to cope with the emergence of pathogens resistant to currently available antimicrobials. The impact of antibiotic resistant microorganisms on human health, society and economy is large. In addition, substances with antimicrobial effect are increasingly used as food preservatives thus reinforcing the emergence of resistant microorganisms, not to mention their direct impact on consumers' health. As a result, during the recent years research in the field of new antimicrobials has been intensified. Luckily, Mother Nature has a plethora of natural substances and extracts with a huge structural and biological diversity, which have infinite potentials for the development of new antimicrobial drugs.

The objective of the present doctoral thesis was the investigation of the antimicrobial effect of five different plant essential oils towards various ATCC and wild bacterial and fungal strains, both susceptible and resistant to currently used antimicrobials. More specifically, the antimicrobial activity of essential oils derived from basil, thyme, oregano, tea tree and chamomile, was studied towards the following bacterial and fungal strains:

- 41 multi-resistant bacterial strains and 12 strains of *Candida* spp isolated from equal number of hospitalized patients (University Hospital of Ioannina, Greece)
- 11 bacterial strains isolated from various food and water samples.
- 9 ATCC strains.

The automated VITEK II system (Bio-merieux, France), the agar disk-diffusion method (Bauer-Kirby) and the E-test were employed for the susceptibility testing.

The essential oils used in this study were commercially available by Sigma Aldrich Chemie GmbH (Germany), while their main compounds were identified by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GCMS).



The antimicrobial activity of the employed essential oils was tested using the broth serial dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC) and the time-kill kinetics. Also the viable plate counts and the optical density method were used in addition to the broth serial dilution method. All experiments were performed in duplicate.

The results demonstrated that with the exception of the chamomile oil, all the rest essential oils exhibited significant antimicrobial activity towards the tested microbial strains. The essential oils of oregano and thyme exhibited the strongest antimicrobial activity towards Gram (+) bacterial strains with minimum MIC 0,063% v/v. The essential oils of tea-tree, oregano and thyme had the strongest antimicrobial activity towards Gram (-) bacterial strains with minimum MIC 0,125% v/v. Concerning the *Candida* spp strains all essential oils- except the chamomile oil, displayed similar antimicrobial activity, with minimum MIC 0,063% v/v. The overall range of MIC was from 0,063 v/v to >4% v/v. The determination of MIC using the viable plate count method produced more reliable results compared to the optical density method.

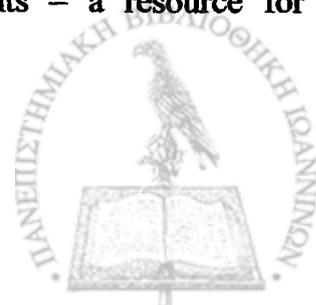
According to the results of the present experimental study, the employed essential oils reveal significant antimicrobial activity *in vitro* towards both susceptible and multi-resistant microorganisms. Conclusively, the plant essential oils have a very good potential to be used as antimicrobials; however there is an urgent need for identification of the hidden compounds encompassing the true antimicrobial effect, which actually should be extracted or synthesized in pure form for future use in the Pharmaceutical and Food Industry.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΛΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abe S., Sato Y., Inoue S., Ishibashi H., Maruyama N., Takizawa T., Oshima H., Yamaguchi H. (2003) Anti- *Candida albicans* activity of essential oils including lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Jpn. J. Med. Mycol.* 44:285-291.
2. Aburjai T., Natsheh F. (2003) Plants Used in Cosmetics. *Phytotherapy Research* 17:987-1000.
3. Alanis A. (2005) Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research.* 36:697-705.
4. Albertini MT., Benoit C., Berardi L., Berrouane Y., Boisivon A., Cahen P., Cattoen C., Costa Y., Darchis P., Deliere E., Demontrod D., Eb F., Golliot F., Grise G., Harel A., Koeck JL., Lepennec MP., Malbrunot C., Marcollin M., Maugat S., Nouvellon M., Pangon B., Ricouart S., Roussel-Delvallez M., Vachee A., Carbonne A., Marty L., Jarlier V. (2002) Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study. *J.Hosp.Infect.* 52(2):107-113.
5. Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S., Chinou B. (2001) Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. *J.Agric.Food Chem.* 49:4168-4170
6. Alma M., Mavi A., Yildirim A., Digrak M., Hirata T. (2003) Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biol. Pharm. Bull.* 26(12):1725-1729.
7. Ambler R.P. (1980) The structure of β -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 289:321-331.
8. Ankri S., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M., Mirelman D. (1997) Allicin from Garlic strongly inhibits Cysteine Proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(10):2286-2288.
9. Ankri S., Mirelman D. (1999) Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* 2:125-129.
10. Anthony J-P., Fyfe L., Smith H. (2005) Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology.* 21(10):462-468.



11. Appelbaum P.C. (2006) MRSA- the tip of the iceberg. *Clin Microbiol Infect* 12(2): 3-10.
12. Arias A.B., Laca L.R. (2005) Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology* 97:89-95.
13. Arfa B., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P. (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology* 43:149-154.
14. Asha M.K., Prashanth D., Murali B., Padmaja R., Amit A. (2001) Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitoterapia* 72:669-670.
15. Badi H.N., Yazdani D., Ali S.M., Nazari F. (2004) Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial crops and products* 19:231-236.
16. Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J. (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 21:33-42.
17. Bagg J., Jackson M., Sweenay P., Ramage G., Davies A. (2006) Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. *Oral Oncology* 42:487-492.
18. Banes-Marshall L., Cawley P., Phillips C.A. (2005) In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and *Candida* spp. isolates from clinical specimens. *British Journal of Biomedical Science* 58(3):139-145.
19. Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., Karadogan T. (2003) Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15:169-172.
20. Bell J.M., Turnidge J.D., Jones R.N. & the SENTRY Asia-Pacific Participants. (2003) Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* in the Asia-Pacific Region: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998 to 2001. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47(12):3989-3993.
21. Bernath J. (1996) Some scientific and practical aspects of production and utilization of oregano in central Europe. *In Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*; Padulosi S., ed; CIHEAM: Valenzano, Bari, Italy, IPGRI, 1996 pp.75-92.
22. Boreham P.F.L. (1995) Dreamtime, devastation and deviation: Australia's contribution to the chemotherapy of human parasitic infections. *International Journal for Parasitology* 25(9):1009-1022.



23. Boyom F.F., Ngouana V., Zollo P.H.A., Menut C., Bessiere J.M., Gut J., Rosenthal P. (2003) Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry* 64:1269-1275.
24. Bozin B., Dukic-Mimica N., Simin N., Anackov G. (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54:1822-1828.
25. Brakstad O., Maeland J. (1997) Mechanisms of methicillin resistance in Staphylococci. *APMIS* 105:264-276.
26. Burt S.A, Reinders R.D. (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157-H7. *Letters in Applied Microbiology* 36:162-167.
27. Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253.
28. Burt S., Vlieland R., Haagsman H., Veldhuizen E. (2005) Increase in Activity of Essential Oil Components Carvacrol and Thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by Addition of Food Stabilizers. *Journal of Food Protection* 68(5):919-926.
29. Butler M., Buss A. (2006) Natural products- The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology* 71:919-926.
30. Caierao J., Musskopf M., Superti S., Roesch E., Dias C., Azevedo P. (2004) Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS). *Journal of Medical Microbiology* 53:1195-1199.
31. Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., Akpulat A. (2003) Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae) *Journal of Ethnopharmacology* 87:215-220.
32. Carson C., Mee B., Riley T. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(6):1914-1920.
33. Carson C., Hammer K., Riley T. (2006) *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* 19(1):50-62.
34. Cattoir V. (2004) Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathologie Biologie* 52:607-616.



35. Cavaleiro C., Pinto E., Goncalves M.J., Salgueiro L. (2006) Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Applied Microbiology* 100:1333-1338.
36. Cernicka J., Subik J. (2006) Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27:403-408.
37. Chami N., Bennis S., Chami F., Aboussekhra A., Remmal A. (2005) Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. *Oral Microbiology Immunology* 20:106-111.
38. Chang S.T., Chen P.F., Chang S.C. (2001) Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology* 77:123-127.
39. Chaudhary U., Aggarwal R. (2004) Extended spectrum β -Lactamases (ESBL)- An emerging threat to clinical therapeutics. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 22(2):75-80.
40. Chen L., Walker D., Sun B., Hu Y., Walker S., Kahne D. (2003) Vancomycin analogues active against vanA-resistant strains inhibit bacterial transglycosylase without binding substrate. *PNAS* 100(10):5658-5663.
41. Chorianopoulos N., Kalpoutzakis E., Aligiannis N., Mitaku S., Nychas G-J., Haroutounian S. (2004) Essential Oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. *J.Agric.Food Chem.* 52:8261-8267.
42. Chorianopoulos N., Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Evergetis E.T., Haroutounian S.A., Nychas G-J.E. (2006) A newly developed assay to study the minimum inhibitory concentration of *Satureja spinosa* essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 100:778-786.
43. Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 2nd ed. Document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
44. CLSI (2006) M7-A7: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-7th Edition.
45. Cohen & Powderly (2000) *Infectious Diseases*. Mosby, 2nd edition.



46. Collier L., Balows A., Sussman M. (1998) Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, volume 4: Medical Mycology, 9th Edition.
47. Concha J.M., Moore L.S., Holloway W.J (1998) Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against various pathogenic organisms. J. Am. Podiatr. Med. Assoc. 88(10):489-492.
48. Cooke B., Ernst E. (2000) Aromatherapy: a systematic review. British Journal of General Practice 50:493-496.
49. Cosentino S., Tuberoso S.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. (1999) In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology 29:130-135.
50. Cowan M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12(4):564-582.
51. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology 88:170-175.
52. Cox P.A. (2007) Biodiversity and the Search for New Medicines. Planta Med, 73:798.
53. Craig W. (1999) Health promoting properties of common herbs. Am. J. Clin. Nutr. 70:491-499.
54. D'Auria FD, Laino L., Strippoli V., Tecca M., Salvatore G., Batinelli L., Mazzanti G. (2001) In vitro activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi. Journal of Chemotherapy 13(4):377-383.
55. D'Auria FD, Tecca M., Strippoli V., Salvatore G., Batinelli L., Mazzanti G. (2005) Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. Medical Mycology 43(5):391-396.
56. Daferera D., Ziogas B., Polissiou M. (2000) GC-MS Analysis of Essential Oils from some Greek Aromatic Plants and their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food. Chem. 48:2576-2581.
57. De La Maza L., Pezzlo M., Baron E. (2001) Έγχρωμη Διαγνωστική Μικροβιολογία. Εκδόσεις Πασχαλίδης.
58. De Lisle S. & Perl T. (2003) Vancomycin-Resistant Enterococci: A Road Map To Prevent the Emergence and Transmission of Antimicrobial Resistance. Chest. 123:504-518.



59. De Mastro G. (1996) Crop domestication and variability within accessions of *Origanum* genus. In *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*; Padulosi S., ed; CIHEAM: Valenzano, Bari, Italy, IPGRI, 1996 pp.34-48.
60. Delaquis P., Stanich K., Girard B., Mazza G. (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74:101-109.
61. Denton M. (2007) Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29(3):9-22.
62. Diekema D., Dodgson K., Sigurdardottir B., Pfaller M. (2004a) Rapid Detection of Antimicrobial-Resistant Organism Carriage: an Unmet Clinical Need. *J.Clin.Microbiol.* 42(7):2879-83.
63. Diekema D., BootsMiller B., Vaughn T., Woolson R., Yankey J., Ernst E., Flash S., Ward M., Franciscus C., Pfaller M., Doebbeling B. (2004b) Antimicrobial Resistance Trends and Outbreak Frequency in United State Hospitals. *CID*. 38:78-85.
64. Dorman H.J.D., Deans S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:308-316.
65. Duarte M.C.T., Figueira G.M., Sartoratto A., Rehder V.L.C., Delarmelina C. (2005) Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 97:305-311.
66. Dulger B. (2005) An investigation on antimicrobial activity of endemic *Origanum solymicum* and *Origanum bilgeri* from Turkey. *Afr. J. Trad. CAM* 2(3):259-263.
67. Dutta B.K., Karmakar S., Naglot A., Aich J.C., Begam M. (2007) Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India. *Mycoses* 50:121-124.
68. Edris A. (2007) Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research* 21:308-323.
69. Edward-Jones V., Buck R., Shawcross S.G., Dawson M.M., Dunn K. (2004) The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns* 30:772-777.
70. Falagas M., Bliziotis I. (2007) Pandrug resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post antibiotic era? *International Journal of Antimicrobial Agents* 29:630-636.
71. Farag R.S., Shalaby A.S., El-Baroty G.A., Ibrahim N.A., Ali M.A., Hassan E.M. (2004) Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytotherapy Research* 18:30-35.



72. Ficca G., Chauvel M., de Mouy D. (2006) Prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Med. Mal. Infect.* 36(4):207-12.
73. Florou-Paneri P., Palatos G., Govaris A., Botsoglou D., Giannenas I., Ambrosiadis I. (2005) Oregano Herb Versus Essential Oil as Feed Supplements to Increase the Oxidative Stability of Turkey Meat. *International Journal of Poultry Science* 4(11):866-871.
74. Fontenelle R.O.S., Morais S.M., Brito E.H.S., Kerntopf M.R., Brilhante R.S.N., Cordeiro R.A., Tome A.R., Queiroz M.G.R., Nascimento N.R.F., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G. (2007) Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59:934-940.
75. Forbes B., Sahm D., Weissfeld A. (1998) *Diagnostic Microbiology*. Bailey & Scott's, 10th edition.
76. Force M., Sparks W., Ronzio R. (2000) Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano *in vivo*. *Phytotherapy Research* 14:213-214.
77. Friedman M., Henika P., Levin C., Mandrell R. (2004) Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 52:6042-6048.
78. Fyfe L., Armstrong F., Stewart J. (1998) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plant oils and derivatives of benzoic acid: the development of synergistic antimicrobial combinations. *International Journal of Antimicrobial Agents* 9:195-199.
79. Ganzera M., Schneider P., Stuppner H. (2006) Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sciences* 78:856-861.
80. Gensini GF., Conti AA., Lippi D. (2007) The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease. *Journal of Infection*. 54(3):221-224.
81. Gibbons S. (2007) Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* 73:798.
82. Gill A.O., Delaquis P., Russo P., Holley A. (2002) Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73(1):83-92.
83. Gill A.O., Holley A. (2004) Mechanisms of bactericidal action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10):5750-5755.



84. Giordani R., Regli P., Kaloustian J., Mikail C., Abou L., Portugal H. (2004) Antifungal Effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research* 18:990-995.
85. Gold H.S. (2001) Vancomycin-resistant Enterococci: mechanisms and clinical observations. *Clinical Infectious Diseases* 33:210-219.
86. Goldsworthy P., McFarlane A. (2002) Howard Florey, Alexander Fleming and the Fairy Tale of Penicillin. *MJA*. 176:178-180.
87. Goosens H. & Sprenger M. (1998) Community acquired infections and bacterial resistance. *BMJ*. 317:654-7.
88. Gould G. (2001) New processing technologies: an overview. *Proceedings of the Nutrition Society* 60:463-474.
89. Gounaris Y., Skoula M., Fournaraki C., Drakakaki G., Makris A. (2002) Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum x intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. *Biochemical Systematics and Ecology* 30(3):249-258.
90. Grayer R., Kite G., Goldstone F., Bryan S., Paton A., Putievsky E. (1996) Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 43(5):1033-1039.
91. Grundmann H., de Sousa M.A., Boyce J., Tiemersma E. (2006) Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*. 368:874-885.
92. Guillen M.D., Manzanos M.J. (1998) Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. *Food Chemistry* 63(3):373-383.
93. Gurib-Fakim A. (2006) Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 27:1-93.
94. Guynot M.E., Ramos A.G., Seto L., Purroy P., Sanchis V., Marin S. (2003) Antifungal activities of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology* 94:893-899.
95. Halcon L., Milkus K. (2004) *Staphylococcus aureus* and wounds: A review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *Am. J. Infect. Control* 32:402-408.
96. Hammer K., Carson C., Riley T. (1996) Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Am.J.Infect Control* 24:186-189.



97. Hammer K., Carson C., Riley T. (1998) In vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42:591-595.
98. Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86:985-990.
99. Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (2002) In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50:195-199.
100. Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (2003a) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology* 95:853-860.
101. Hammer K., Dry L., Johnson M., Michalak E., Carson C., Riley T. (2003b) Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 18: 389-392.
102. Hammer K., Carson C., Riley T. (2004) Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:1081-1085.
103. Hammer K., Carson C., Riley T., Nielsen J. (2006) A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Food and Chemical Toxicology* 44:616-625.
104. Hanberger H., Garcia-Rodriguez JA., Gobernado M., Goossens H., Nilsson LE., Struelens MJ. (1999) Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA* 281(1):67-71.
105. Harris J., Plummer S., Turner M., Lloyd D. (2000) The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti-giardial. *Microbiology* 146:3119-3127.
106. Hayes A.J., Markovic B. (2002) Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 40:535-543.
107. Helander I., Alakomi H., Kala K., Sandholm T., Pol I., Smid E., Gorris L., von Wright A. (1998) Characterization of the Action of Selected Essential Oils Components on Gram-negative Bacteria. *J. Agric. Food. Chem.* 46:3590-3595.



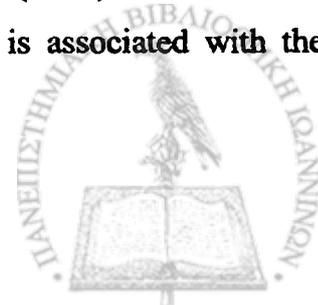
108. Hernandez T., Canales M., Avila J.G., Garcia A.M., Martinez A., Caballero J., Romo de Vivar A., Lira R. (2005) Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 96:551-554.
109. Holley R., Patel D. (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22:273-292.
110. Hsueh PR., Chen WH., Teng LJ., Luh KT. (2005) Nosocomial infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci at a university hospital in Taiwan from 1991 to 2003: resistance trends, antibiotic usage and in vitro activities of newer antimicrobial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 26(1):43-9.
111. Janssen A.M., Scheffer J.J.C., Ntezurubanza L., Svendsen B. (1989) Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda. *Journal of Ethnopharmacology* 26:57-63.
112. Jayasinghe C., Gotoh N., Aoki T., Wada S. (2003) Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum*). *J. Agric. Food Chem.* 51:4442-4449.
113. Johnston A.M. (1998) Use of antimicrobial drugs in veterinary practice. *BMJ*. 317:665-667.
114. Jones R., Pfaller M. (1998) Bacterial Resistance: A Worldwide Problem. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 31:379-388.
115. Inouye S., Tsuruoka T., Uchida K., Yamaguchi H. (2001) Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol. Immunol.* 45(3):201-208.
116. Isenberg H. (2004) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd Edition.
117. Karioti A., Vrahimi-Hadjilouka T., Droushiotis D., Rancic A., Hadjipavlou-Litina D., Skaltsa H. (2006) Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Medica* 72:1330-1336.
118. Kim H-J., Chen F., Changqing W., Wang X., Chung H-Y., Jin Z. (2004) Evaluation of antioxidant activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J.Agric. Food. Chem* 52:2849-2854.
119. Kisko & Roller (2005) Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *BMC Microbiology* 5:36



120. Kizil G., Toker Z., Ozen H., Aytakin C. (2004) The Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Hypericum scabrum*, *Hypericum scabroides* and *Hypericum triquetrifolium*. *Phytotherapy Research* 18:339-341.
121. Kokkini S. (1996) Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*; Padulosi S., ed; CIHEAM: Valenzano, Bari, Italy, IPGRI, 1996 pp.2-12
122. Kokkini S., Karousou R., Dardioti A., Krigas N., Lanaras T. (1997) Autumn essential oils of Greek Oregano. *Phytochemistry* 44(5):883-886.
123. Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W.Jr. (2006) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins.
124. Koutsoumanis K., Lambropoulou K., Nychas G-J.E. (1999) A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *International Journal of Food Microbiology* 49:63-74.
125. Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M. (2004) Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry* 85:633-640.
126. Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcock A., Coventry M.J. (1998) The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Letters in Applied Microbiology* 26:209-214.
127. Lambert R.J.V., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G-J.E. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91:453-462.
128. Lamiri A., Lhaloui S., Benjilali B., Berrada M. (2001) Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Research*. 71:9-15.
129. LaPlante K. (2007) In vitro activity of lysostaphin, mupirocin and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57:413-418.
130. Lardos A. (2006) The botanical *material medica* of the *Iatrosophikon* - A collection of prescriptions from a monastery in Cyprus. *Journal of Ethnopharmacology* 104:387-406.
131. Lee L.S., Brooks L.O., Homer L.E., Rossetto M., Henry R.J., Baverstock P.R. (2002) Geographic variation in the essential oils and morphology of natural populations of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 30:343-360.



132. Leto C., Salamone A. (1996) Bio-agronomical behaviour in Sicilian *Origanum* ecotypes. In *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*; Padulosi S., ed; CIHEAM: Valenzano, Bari, Italy, IPGRI, 1996 pp.68-74.
133. Levy B. S. (1998) Antimicrobial resistance: bacteria on the defence. *BMJ*. 317:612-613
134. Levy B.S. & Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10(12):122-129
135. Levy B. S. (2005) Antibiotic resistance – the problem intensifies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57:1446-1450.
136. Lewinsohn E., Ziv Raz I., Dudai N., Tadmor Y., Lastochkin E., Larkov O., Chaimovitsh D., Ravid U., Putievsky E., Pichersky E., Shoham Y. (2000) Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. *Plant Science* 160(1):27-35.
137. Lin Y.T., Labbe R.G., Shetty K. (2004) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of Oregano and Cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology* 70(9): 5672-5678.
138. Lindback E., Unemo M., Akhras M., Gharizadeh B., Fredlund H., Pourmand N., Wretling B. (2006) Pyrosequencing of the DNA gyrase gene in *Neisseria* species: effective indicator of ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *APMIS* 114:837-841.
139. Liu C.H., Mishra A.K., Tan R.X., Tang C., Yang H., Shen Y.F. (2006) Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresource Technology* 97:1969-1973.
140. Livermore D. (1995) β - Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 8(4):557-584.
141. Livermore D., Macgowan A., Wale M. (1998) Surveillance of antimicrobial resistance. *BMJ*. 317:614-615.
142. Livermore D. (2000) Antibiotic resistance in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16:3-10.
143. Livermore D.M. (2006) Can β -lactams be re-engineered to beat MRSA? *Clin. Microbiol. Infect.* 12(2): 11-16.
144. Longbottom C., Carson C., Hammer K., Mee B., Riley T. (2004) Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the



- outer membrane and energy-dependent cellular processes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54:386-392.
145. Lopez P., Sanchez C., Battle R., Nerin C. (2005) Solid- and Vapor- phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food. Chem.* 53:6939-6946.
 146. Lorian V. (2005) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins.
 147. Luzzaro F., Mezzatesta M., Mugnaioli C., Perilli M., Stefani S., Amicosante G., Rossolini G.M., Toniolo A. (2006) Trends in production of extended-spectrum β -Lactamases among Enterobacteria of medical interest: Report of the second Italian nationwide survey. *Journal of Clinical Microbiology* 44(5):1659-1664.
 148. Ma X.X., Ito T., Tiensasitorn C., Jamklang M., Chongtrakool P., Boyle-Vavra S., Daum R., Hiramatsu K. (2002) Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(4):1147-1152.
 149. Mandell, Douglas & Bennett's (2000) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill-Livingstone, 5th edition.
 150. Mann C.M., Markham J.L. (1997) A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84:538-544.
 151. Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N., Echard W., Bagchi D., Preuss H. (2001) Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 228:111-117.
 152. Marino M., Bersani C., Comi G. (2001) Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*. 67(3):187-195.
 153. Marotti M., Piccaglia R., Giovanelli E., Deans S.G., Eaglesham E. (1994) Effects of planting time and mineral fertilization on Peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. *Flavour and Fragrance Journal* 9:125-129.
 154. Maruyama N., Sekimoto Y., Ishibashi H., Inouye S., Oshima H., Yamaguchi H., Abe S. (2005) Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation* 2:1-11.
 155. Matan N., Rimkeeree H., Mawson A.J., Chompreeda P., Haruthaithanasan V., Parker M. (2006) Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology* 107:180-185.



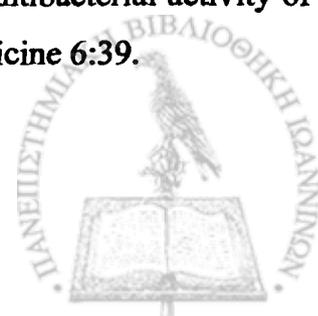
156. McKay D., Blumberg J. (2006) A review of the bioactivity and potential health benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research* 20:519-530.
157. McKellar A.Q. (1998) Antimicrobial resistance: a veterinary perspective. *BMJ*. 317:610-611
158. McKinney T., Sharma V., Craig W., Archer G. (2001) Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and β -lactamase regulators. *Journal of Bacteriology* 183(23): 6862-6868.
159. Mejlholm O., Dalgaard P. (2002) Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology* 34:27-31.
160. Menon Vrinda K., Garg S.R. (2001) Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiology* 18:647-650.
161. Mims C., Dockrell M.H., Goering R.V., Roitt I., Wakelin D., Zuckerman M. (2004) *Medical Microbiology*, 3rd edition.
162. Moellering R. (1998) Vancomycin-resistant Enterococci. *Clinical Infectious Diseases*. 26:1196-1199.
163. Mondello F., De Bernardis F., Girolamo A., Salvatore G., Cassone A. (2003) In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole - susceptible and - resistant human pathogenic yeasts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:1223-1229.
164. Mondello F., De Bernardis F., Girolamo A., Cassone A., Salvatore G. (2006) In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole - susceptible and - resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infectious Diseases* 6:158.
165. Moon T., Wilkinson J., Cavanagh M.A. (2006) Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitology Res.* 99:722-728.
166. Moreira M.R., Ponce A.G., del Valle C.E., Roura S.I (2005) Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT* 38:565-570.
167. Nakamura C.V., Ishida K., Faccin L.C., Filho B.P.D., Cortez D.A.G., Rozental S., De Souza W., Nakamura-Ueda T. (2004) In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. *Research in Microbiology* 155:579-586.



168. Nazer A.I., Kobilinsky A., Tholozan J.L., Dubois-Brissonnet F. (2005) Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella sv. typhimurium*: a synergistic effect? *Food Microbiology* 22:391-398.
169. Nelson R. (2000) Selection of resistance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45:547-551.
170. Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A, Cannatelli M.A. (2000) Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology* 30:379-384.
171. Nostro A., Blanco A., Cannatelli M., Enea V., Flamini G., Morelli I., Roccaro-Sudano A., Alonzo V. (2004) Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters* 230:191-195.
172. Ohno T., Kita M., Yamaoka Y., Imamura S., Yamamoto T., Mitsufuji S., Kodama T., Kashima K., Imanishi J. (2003) Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 8(3):207-215.
173. Oliva B., Piccirilli E., Ceddia T., Pontieri E., Aureli P., Ferrini A.M. (2003) Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* and its major components. *Letters in Applied Microbiology* 37:185-187.
174. Opalchenova G., Obreshkova D. (2003) Comparative studies on the activity of basil – an essential oil from *Ocimum basilicum* L. – against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological Methods* 54:105-110.
175. Papachristos D., Karamanoli K., Stamopoulos D., Spiroudi-Menkissoglu U. (2004) The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest Management Science* 60:514-520.
176. Papadopoulos C., Carson C., Hammer K., Riley T. (2006) Susceptibility of pseudomonads to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and components. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58:449-451.
177. Papandreou V., Magiatis P., Chinou I., Kalpoutzakis E., Skaltsounis A., Tsaibopoulos A (2002) Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek *Paeonia taxa*. *Journal of Ethnopharmacology* 81:101-104.
178. Paranagama P.A., Abeysekera K.H.T., Abeywickmara K., Nugaliyadde L. (2003) Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.)



- Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. Letters in Applied Microbiology 37:86-90.
179. Paterson D. & Bonomo R. (2005) Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. Clin. Microbiol. Rev. 18:657-686.
180. Payne D. & Tomasz A. (2004) Antimicrobials - The challenge of antibiotic resistant bacterial pathogens: the medical need, the market and prospects for new antimicrobial agents. Current Opinion in Microbiology 7:435-438.
181. Penalver P., Huerta B., Borge C., Astorga R., Romero R., Perea A. (2005) Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. APMIS 113:1-6.
182. Pereyre S., Renaudin H., Charron A., Bebear C., Bebear C.M. (2006) Emergence of a 23S rRNA mutation in *Mycoplasma hominis* associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57:753-756.
183. Pessoa L.M., Morais S.M., Bevilaqua C.M.L., Luciano J.H.S. (2002) Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology 109:59-63.
184. Piccaglia R., Marotti M. (1993) Characterization of several aromatic plants grown in northern Italy. Flavour and Fragrance Journal 8:115-122.
185. Pina-Vaz C., Goncalves Rodrigues A., Pinto E., Costa-de Oliveira S., Tavares C., Salgueiro L., Cavaleiro C., Goncalves MJ., Martinez-de Oliveira J. (2004) Antifungal activity of Thymus oils and their major components. JEADV 18:73-78.
186. Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Goncalves MJ., Costa-de Oliveira S., Cavaleiro C., Palmeira A., Rodrigues A., Martinez-de Oliveira J. (2006) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. J. Med. Microbiol. 55(10):1367-1373.
187. Ponce A.G., Fritz R., del Valle C., Roura S.I. (2003) Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. LWT 36:679-684.
188. Pothier J., Galand N., El Ouali M., Viel C. (2001) Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. Il Farmaco. 5-7:505-511
189. Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S. (2006) In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine 6:39.



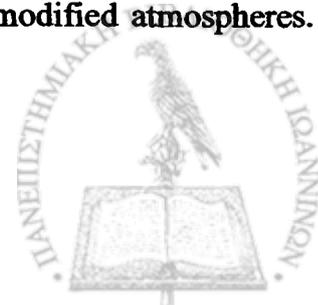
190. Prajapati V., Tripathi A.K., Aggarwal K.K., Khanuja S.P.S. (2005) Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology* 96:1749-1757.
191. Preuss H., Echard B., Enig M., Brook I., Elliot T. (2005) Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry* 272:29-34.
192. Putievsky E., Dudai N., Ravid U. (1996) Cultivation, selection and conservation of oregano species in Israel. In *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*; Padulosi S., ed; CIHEAM: Valenzano, Bari, Italy, IPGRI, 1996 pp.102-109.
193. Rabanal R.M., Arias A., Prado B., Hernandez-Perez M., Sanchez-Mateo C.C. (2002) Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology* 81:287-292.
194. Rao J., Yan L., Lahiri J., Whitesides G., Weis R., Warren S. (1999) Binding of a dimeric derivative of vancomycin to L-Lys-D-Ala-D-lactate in solution and at a surface. *Chemistry & Biology* 6:353-359.
195. Rasooli I., Rezaei M.B., Allameh A. (2006) Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases* 10:236-241.
196. Rios J.L., Recio M.C., Villar A. (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23:127-149.
197. Riska P., Kutlin A., Ajiboye P., Cua A., Roblin P., Hammerschlag M. (2004) Genetic and culture-based approaches for detecting macrolide resistance in *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(9):3586-3590.
198. Rosa M., Mendonca-Filho R., Bizzo H., Rodrigues I., Soares R., Souto-Padron T., Alviano C., Lopes A. (2003) Antileishmanial activity of a linalool rich essential oil of *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(6):1895-1901.
199. Rota C., Carraminana J.J., Burillo J., Herrera A. (2004) In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 67(6):1252-1256.
200. Saccheti G., Medici A., Maietti S., Radice M., Muzzoli M., Manfredini S., Braccioli E., Bruni R. (2004) Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian



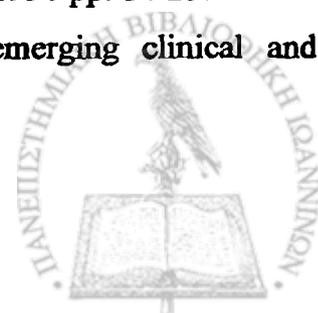
- Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. J. Agric. Food Chem. 52:3486-3491.
201. Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry 91:621-632.
202. Safo M., Zhao Q., Ko T.P., Musayev F., Robinson H., Scarsdale N., Wang A., Archer G. (2005) Crystal structures of the BlaI Repressor from *Staphylococcus aureus* and its complex with DNA: Insights into transcriptional regulation of the *bla* and *mec* operons. Journal of Bacteriology 187(5): 1833-1844.
203. Sagdic O. (2003) Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. Food Science and Technology- LWT 36:467-473.
204. Sakkas V.A., Arabatzis I.M., Konstantinou I.K., Dimou A.D., Albanis T.A., Falaras P. (2004) Metolachlor photocatalytic degradation using TiO₂ photocatalysts. Applied Catalysis B: Environmental 49:195-205.
205. Salgado C., Farr B., Calfee D. (2003) Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors. Clinical Infectious Diseases 36:131-9.
206. Salgueiro L.R., Cavaleiro C., Pinto E., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., Palmeira A., Tavares C., Costa de Oliveira S., Goncalves M.J., Martinez de Oliveira J. (2003) Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. Planta Medica 69:871-874.
207. Sampson B., Tabanca N., Kirimer N., Demirci B., Baser K., Khan I., Spiers J., Wedge D. (2005) Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae:Homoptera). Pest Management Science 61:1122-1128.
208. Sanglard D., Ischer F., Parkinson T., Falconer D., Bille J. (2003) *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47(8): 2404-2412.
209. Sanguinetti M., Posteraro B., Fiori B., Ranno S., Torelli R., Fadda G. (2005) Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49(2):668-679.



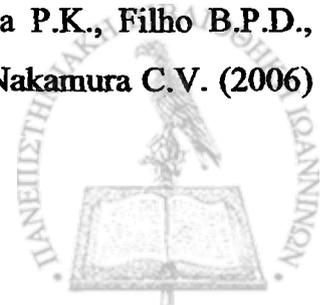
210. Sartorelli P., Marquioreto A., Amaral-Baroli A., Lima M., Moreno P.R. (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytotherapy Research* 21:231-237.
211. Schelz Z., Molnar J., Hohmann J. (2006) Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77:279-285.
212. Schulz H., Quilitzsch R., Kruger H. (2003a) Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 661-662:299-306.
213. Schulz H., Schrader B., Quilitzsch R., Pfeffer S., Kruger H. (2003b) Rapid Classification of Basil Chemotypes by Various Vibrational Spectroscopy Methods. *J. Agric. Food Chem.* 51:2475-2481.
214. Senatore F. (1996) Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy) *J. Agric. Food Chem* 44:1327-1332.
215. Seymour R. (2003) Additional properties and uses of essential oils. *J. Clin. Periodont.* 30 (5):19-21.
216. Shelef, L.A. (1983) Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6:29-44.
217. Shin S., Kang A. (2003) Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze. and its synergism with ketokonazole. *Letters in Applied Microbiology* 36:111-115.
218. Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., Yue Y., Guolin Z (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology* 96:151-158.
219. Si W., Gong J., Tsao R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R., Du Z. (2006) Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 100:296-305.
220. Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B. (1995) Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59(2):201-222.
221. Skaltsa H., Demetzos C., Lazari D., Sokovic M. (2003) Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry* 64:743-752.
222. Skandamis P.N., Nychas G-J.E. (2001) Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91:1011-1022.



223. Skoula M., Kamenopoulos S. (1996) *Origanum dictamnus* L. and *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) letswaart: Traditional uses and production in Greece. In *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*; Padulosi S., ed; CIHEAM: Valenzano, Bari, Italy, IPGRI, 1996 pp.26-33.
224. Skoula M., Gotsiou P., Naxakis G., Johnson C. (1999) A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry* 52:649-657.
225. Smith M., Navilliat P. (1997) A new protocol for antimicrobial testing of oils. *Journal of Microbiological Methods* 28:21-24.
226. Smith R.L., Cohen S.M., Doull J., Feron V.J., Goodman J.I., Marnett L.J., Portoghese P.S., Waddell W.J., Wagner B.M., Hall R.L., Higley N.A., Lucas-Gavin C., Adams T.B. (2005) A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 43:345-363.
227. Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (1998) Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26:118-122.
228. Sokmen M., Serkedjieva J., Daferera D., Gulluce M., Polissiou M., Tepe B., Akpulat A., Sahin F., Sokmen A. (2004) In vitro antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J. Agric. Food Chem* 52:3309-3312.
229. Soliman K.M., Badeaa R.I. (2002) Effect of oil extracted from some medicinal plants of different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology* 40:1669-1675.
230. Song G.H., Hiramatsu K., Suh J.Y., Ko K.S., Ito T., Kapi M., Kiem S., Kim Y.S., Oh W.S., Peck K.R., Lee N.Y. and ANSORP Study Group. (2004) Emergence in Asian Countries of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(12): 4926-4928.
231. Southwell I., Russell M. (2002) Volatile oil of cotyledon leaves of chemotypes of *Melaleuca alternifolia*. *Phytochemistry* 59:391-393.
232. Spada P., Perrino P. (1996) Conservation of oregano species in national and international collections: an assessment. In *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*; Padulosi S., ed; CIHEAM: Valenzano, Bari, Italy, IPGRI, 1996 pp. 14-23.
233. Sterling T., Merz W. (1998) Resistance to amphotericin-B: emerging clinical and microbiological patterns. *Drug Resistance Updates* 1:161-165.



234. Struelens M. (1998) The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. *BMJ* 317:652-4.
235. Suhr K.I., Nielsen P.V. (2003) Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology* 94:665-674.
236. Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., Bigger S. (2003) Antimicrobial Properties of Basil and its Possible Application in Food Packaging. *J. Agric. Food Chem.* 51(11):3197-3207.
237. Szentmihalyi K., Forgacs E., Hajdu M., Then M. (2001) In vitro study on the transfer of volatile oil components. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24:1073-1080.
238. Takarada K., Kimizuka R., Takahashi R., Honma K., Okuda K., Kato T. (2004) A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiology Immunology* 19:61-64.
239. Tampieri M.P., Galuppi R., Macchioni F., Carelle M.S., Falcioni L., Cioni P.L., Morelli I. (2005) The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia* 159:339-345.
240. Tassou C., Koutsoumanis K., Nychas G-J.E. (2000) Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International* 33:273-280.
241. Teuber M. (2001) Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 4:493-499.
242. Thompson J., Chalchat J.C., Michet A., Linhart Y., Ehlers B. (2003) Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology* 29(4):859-880.
243. Trevisan M.T.S., Silva M.G.V., Pfundstein B., Spiegelhalter B., Owen R.W. (2006) Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. *J. Agric. Food Chem.* 54:4378-4382.
244. Tsigarida E., Skandamis P., Nychas G-J.E. (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5° C. *Journal of Applied Microbiology* 89:901-909.
245. Ueda-Nakamura T., Mendonca-Filho R., Morgado-Diaz J.A., Maza P.K., Filho B.P.D., Cortez D.A.G., Alviano D.S., Rosa M., Lopes A.H., Alviano C.S., Nakamura C.V. (2006)



- Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International* 55:99-105.
246. Ultee A., Gorris L.G.M., Smid E.J. (1998) Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* 85:211-218.
247. Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R. (2002) The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4):1561-1568.
248. Uzel A., Guvensen A., Cetin E. (2004) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* 95:151-154.
249. Valero M., Salmeron M.C. (2003) Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* 85:73-81.
250. Vagi E., Simandi B., Suhajda A., Hethelyi E. (2005) Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International* 38:51-57.
251. Vazquez J., Arganoza M., Boikov D., Vaishampayan J., Akins R. (2000) In vitro susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:60-63.
252. Veldhuizen E., Tjeerdsma-Van Bokhoven J., Zweijtzter C., Burt S., Haagsman H. (2006) Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem* 54:1874-1879.
253. Vieira R., Grayer R., Paton A. (2003) Chemical profiling of *Ocimum americanum* using external flavonoids. *Phytochemistry* 63:555-567
254. Villalobos-Pascual M.J & Acosta-Ballesta M.C (2003) Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:673-679.
255. Wallace R.J. (2004) Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society* 63:621-629.
256. Walsh S.E., Maillard J.Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L., Bartolo R.G. (2003) Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 94:240-247.



257. Wan J., Wilcock A., Coventry M.J. (1998) The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology* 84:152-158
258. Wilkinson J., Cavanagh H. (2005) Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytotherapy Research* 19:643-646.
259. Wise R., Hart T., Cars O., Streulens M., Helmuth R., Huovinen P., Sprenger M. (1998) Antimicrobial resistance. *BMJ*. 317:609-610
260. Yamazaki K., Yamamoto T., Kawai Y., Inoue N. (2004) Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiology* 21:283-289.
261. Zetola N., Francis J., Nuermberger E., Bishai W. (2005) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*. 5:275-286.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι. (2000) Ιατρική Μικροβιολογία. Εκδόσεις Πασχαλίδης.
2. Αρσένη Α. (1994) Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων. Εκδόσεις «Ζήτα», 4^η έκδοση.
3. Αρσένη Α., Δεληγιάννη Β., Ζουλλιέν Ζ. (1991) Χρωματογραφία. Ιατρική Βιοχημεία, Αθήνα, σελ. 71-77 Εκδόσεις «Ζήτα», 2^η έκδοση.
4. Βερυκοκίδου-Βιτσαροπούλου Ε. (1997) Σημειώσεις Φαρμακογνωσίας. Πανεπιστήμιο Αθηνών
5. Δαφερέρα Δ., Ταραντίλης Π., Πολυσιού Μ. (2006) Θυμάρι (Thyme): Φαρμακολογική-Βιολογική δράση. Πρακτικά επιστημονικού συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Εθνοφαρμακολογίας: «Το Θυμάρι».
6. Δεμέτζος Κ., Λουκής Α., Χαρβάλα Α. (1996) Εργαστηριακές ασκήσεις Φαρμακογνωσίας (Δρογοφυσική). Πανεπιστήμιο Αθηνών
7. Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σ. (2004) Μέθοδοι ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Σημειώσεις Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
8. Λουκής Α. (2000) Εφηρμοσμένη Φαρμακογνωσία. Σημειώσεις μαθήματος Φαρμακογνωσίας. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
9. Μάλαμας Μ. (1982) Η Λαϊκή Βοτανοθεραπευτική στο Ζαγόρι. Διδακτορική διατριβή.
10. Νεώτερον Εγκυκλοπαιδικόν Λεξικόν «Ηλίου» (1975) «Βασιλικός»: Τόμος Ε, σελ. 624-625.
11. Νεώτερον Εγκυκλοπαιδικόν Λεξικόν «Ηλίου» (1975) «Δίκταμνος»: Τόμος Η, σελ. 216-217.
12. Παπαδόπουλος Γ. (2001) Σταθμοί της Αρχαίας Ελληνικής Ιατρικής. Πρακτικά εκπαιδευτικού διημέρου Ελληνικής Εταιρίας Εθνοφαρμακολογίας: «Θεραπευτική και Φάρμακα στην Αρχαία Ελλάδα».
13. Παπαδοπούλου Χ. (2006) Μικροβιολογία και υγιεινή τροφίμων. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 2^η έκδοση.
14. Παπαπαναγιώτου Ι. (1988) Ιατρική Μικροβιολογία και Ανοσοβιολογία.
15. Περόγαμβρος Α., Λεγάκης Ν. (1987) Μέθοδοι χρήσιμες στην αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία.



16. Ρηγάτος Γ. (2001) Η Αρχαία Ιατρική στη λαϊκή μας παράδοση. Πρακτικά εκπαιδευτικού διημέρου Ελληνικής Εταιρίας Εθνοφαρμακολογίας: «Θεραπευτική και Φάρμακα στην Αρχαία Ελλάδα».
17. Σακκάς Β. (2002) Επίπεδα συγκεντρώσεων και μελέτη της φωτολυτικής και φωτοκαταλυτικής διάσπασης επιλεχθέντων βιοκτόνων συστατικών υφαλοχρωμάτων σε υδατικά συστήματα. Διδακτορική διατριβή.
18. Σκαλτσά Ε. (2001) Τα φάρμακα στην Αρχαία Ελλάδα. Πρακτικά εκπαιδευτικού διημέρου Ελληνικής Εταιρίας Εθνοφαρμακολογίας: «Θεραπευτική και Φάρμακα στην Αρχαία Ελλάδα».
19. Χαρβάλα Α. (1994) Αλκαλοειδή και μη μορφοποιημένες δρόγες. Πανεπιστήμιο Αθηνών.

