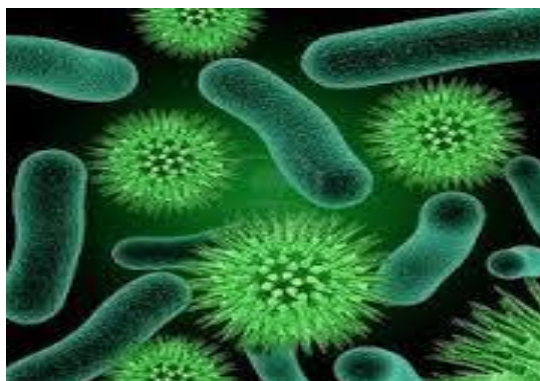




ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ & ΤΡΟΦΙΜΩΝ
Δ/ΝΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΑΛΚΙΔΑΣ
ΠΕΙ ΔΟΚΟΥ, ΧΑΛΚΙΔΑ, ΕΥΒΟΙΑ
ΤΗΛ.: 2221042521
ΦΑΞ: 2221041421
e-mail: vetlab7@otenet.gr

Έκθεση αναφοράς των αποτελεσμάτων από τον πρώτο χρόνο του προγράμματος παρακολούθησης της αντοχής των ζωνοσογόνων και συμβιωτικών βακτηρίων στις αντιμικροβιακές ουσίες σύμφωνα με την υπ. αριθ. 1571/72152 ΚΥΑ (ΦΕΚ Β' 1464)



Χαλκίδα, Μάιος 2016

Πρόλογος

Το 2014 εφαρμόστηκε στη χώρα μας το πρόγραμμα παρακολούθησης της αντοχής των ζωνοσογόνων και συμβιωτικών βακτηρίων στις αντιμικροβιακές ουσίες σύμφωνα με τις υπ. αριθ. 1571/72152 ΚΥΑ (ΦΕΚ Β'1464) ακολουθώντας τις απαιτήσεις της κοινοτικής απόφασης 652/2013/EU. Η αναφορά αυτή επιδιώκει να δημοσιοποιήσει τα πρώτα δεδομένα και συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρακολούθηση των παραπάνω μικροοργανισμών. Το πρόγραμμα παρακολούθησης θα συνεχιστεί έως το 2020 και τα δεδομένα από αυτό ευελπιστούμε να μας δώσουν αρκετές πληροφορίες για τη χώρα μας. Το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας, ως Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς για τη Σαλμονέλλα και την Μικροβιακή Αντοχή, σε αυτή την αναφορά παρουσιάζει τα αποτελέσματα του πρώτου έτους παρακολούθησης.

Για τη διεξαγωγή του προγράμματος συνεργάστηκαν οι:

1. Μεθενίτου Γεωργία, Γενική Διεύθυνση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής, Δ/ση Υγιεινής & Ασφάλειας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Βερανζέρου 46, Αθήνα, τηλ. 2125759, ka6u016@minagric.gr
2. Μίντζα Διονυσία, Γενική Διεύθυνση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής, Δ/ση Υγιεινής & Ασφάλειας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Αλιευμάτων, Γάλατος, Αυγών, μελιού και λοιπών προϊόντων, Βερανζέρου 46, Αθήνα, τηλ. 2102125757, dmintza@minagric.gr
3. Χατζηγιαννακού Ευανθία, Γενική Διεύθυνση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής, Δ/ση Υγιεινής & Ασφάλειας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Αλιευμάτων, Γάλατος, Αυγών, μελιού και λοιπών προϊόντων, Βερανζέρου 46, Αθήνα, 2102125770, echatzigian@minagric.gr
4. Παπαδάκη Παναγιώτα, Γενική Διεύθυνση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής, Δ/ση Υγιεινής & Ασφάλειας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα σφαγείων και λοιπών εγκαταστάσεων, κρέατος και προϊόντων κρέατος, Βερανζέρου 46, Αθήνα, τηλ. 2125755, ppapadaki@minagric.gr
5. Τζανή Μυρσίνη, Γενική Διεύθυνση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής & Κτηνιατρικής, Δ/ση Υγείας των Ζώων, Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων, Βερανζέρου 46, Αθήνα, τηλ. 2125727, ka6u058@minagric.gr
6. Αποστόλου Ιωάννα, Δ/ση Κτηνιατρικού Κέντρου Θεσ/νίκης, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Ιωαννίνων, Χρ. Κάτσαρη 2 Τ.Κ. 45444, Ιωάννινα, τηλ. 2651027396, keioan1@otenet.gr
7. Χρυσοχόου Δημήτριος, Δ/ση Κτηνιατρικού Κέντρου Θεσ/νίκης, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Ιωαννίνων, Χρ. Κάτσαρη 2 Τ.Κ. 45444, Ιωάννινα, τηλ. 2651027396, keioan1@otenet.gr
8. Κατσιμπρας Αθανάσιος, Δ/ση, Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας, Πεί Δοκού, 34100 Χαλκίδα, τηλ.2221042521, vetlab7@otenet.gr
9. Σμπιράκη Αφροδίτη, Δ/ση, Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας, Πεί Δοκού, 34100 Χαλκίδα, τηλ.2221042521, vetlab7@otenet.gr
10. Κατσαρός Δημήτριος, Δ/ση, Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας, Πεί Δοκού, 34100 Χαλκίδα, τηλ.2221042521, vetlab7@otenet.gr
11. Στέκας Γεώργιος, Σταματούκος Ευάγγελος, Σπάρου Παναγιώτα, Γιαννακού Αργυρώ, Χατζηνάκη Βασιλεία, Μαλλιούρης Κων/νος, Περιφερειακή Ενότητα Εύβοιας, Δ/ση Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής, Χαϊνά 93, 34100 Χαλκίδα
12. Οικονόμου Ευθαλία, Σταμούλη Λαμπρινή, Καραπέτσιου Χρυσάνθη, Περιφερειακή Ενότητα Ιωαννίνων, Δ/ση Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής, Διοικητήριο, 453 32 Ιωάννινα

Συγγραφή και επιμέλεια της αναφοράς:

Νίκη Κ. Μουττωτού (DVM, PhD) Κτηνίατρος – Επιδημιολόγος

Ελένη Βαλκάνου (DVM, MSc) Κτηνίατρος

Δ/ση, Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας, Πεί Δοκού, 34100 Χαλκίδα, τηλ.2221042521, vetlab7@otenet.gr

Ευχαριστίες για τη συνδρομή τους στην εκχύλιση του βακτηριακού DNA και στην εκπαίδευση αναλυτών στις μοριακές μεθόδους αντίστοιχα:

1. Ιωαννίδης Αναστάσιος-Βιοπαθολόγος, Βιοπαθολογικό Εργαστήριο Αιγινήτειου Νοσοκομείου, Βασιλίσσης Σοφίας, 72-74, 11528 Αθήνα, 2107289157
2. Μανδηλαρά Γεωργία -Βιολόγος, Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς για τη Σαλμονέλλα, Σιγκέλα & VTEC, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Φλέμιγκ 34, 16672 Βάρη, 210 892 1082

Υλικά και μέθοδοι

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε σμήνη κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης, τα οποία είχαν σφαγεί σε μεγάλα σφαγεία πουλερικών των περιφερειακών ενοτήτων (ΠΕ) Ευβοίας και Ιωαννίνων. Οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στα Κτηνιατρικά Εργαστήρια Χαλκίδας και Ιωαννίνων και αφορούσαν στα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα σφαγεία των ΠΕ.

Δέκα (10) τυφλά έντερα από κάθε σμήνος, συλλέχθηκαν στο σφαγείο από κτηνίατρο της ΠΕ. Τα δείγματα τυφλών διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C και μεταφέρθηκαν στα αρμόδια εργαστήρια σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών, στην πλειονότητα των περιπτώσεων.

Απομόνωση *Campylobacter spp.* και συμβιωτικού *E. coli*

Η απομόνωση του *Campylobacter spp.* βασίστηκε στο πρότυπο ISO 10727. Ειδικότερα, το περιεχόμενο των δέκα (10) τυφλών απομακρύνθηκε άσηπτα σε σακούλα Stomacher και προστέθηκαν 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος Peptone salt (Oxoid) και ομοιογενοποιήθηκαν. Έπειτα, 10ml από το παραπάνω μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο σε εκλεκτικό υπόστρωμα mCCDA και επώαστηκαν σε κλίβανο σε μικροαερόφιλες συνθήκες σε θερμοκρασία 41,5°C ± 1°C για 44 ± 4 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης εξετάστηκαν για την παρουσία τυπικών ή/και ύποπτων αποικιών. Η επιβεβαίωση του γένους *Campylobacter spp.* έγινε μετά από απομόνωση σε αιματούχο υπόστρωμα και επώαση σε μικροαερόφιλες συνθήκες σε θερμοκρασία 41,5°C ± 1°C για 44 ± 4 ώρες και τη διενέργεια μοριακής ταυτοποίησης.

Επιπλέον, 10ml από το αρχικό ομοιογενοποιημένο ελαιώδη περιεχόμενο τυφλών με ρυθμιστικό διάλυμα, μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο σε χρωμογόνο υπόστρωμα TBX agar και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 44°C ± 1°C για 24 ± 2 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης εξετάστηκαν για την παρουσία τυπικών ή/και ύποπτων αποικιών *E.coli*. Μια τυπική αποικία μεταφέρθηκε σε υπόστρωμα Nutrient Agar.

Δύο απομονώματα από κάθε δείγμα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη και θα διατηρηθούν για διάστημα τουλάχιστο πέντε ετών σύμφωνα με τις απαιτήσεις της απόφασης 1571/72152 ΚΥΑ (ΦΕΚ Β'1464).

Απομόνωση DNA Καμπυλοβακτηρίου για μοριακή ταυτοποίηση ειδών

Η απομόνωση DNA έγινε από καθαρές καλλιέργειες του Καμπυλοβακτηριδίου σε αιματούχο υπόστρωμα. Βακτηριακά εναιωρήματα σε φυσιολογικό ορό ετοιμάστηκαν για να χρησιμοποιηθούν για μοριακή τυποποίηση και φυλάχτηκαν στους -20°C. Η εκχύλιση του βακτηριακού DNA έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Instagene Matrix (BioRad Laboratories, California USA) ακολουθώντας τις οδηγίες του παρασκευαστή. Η αντίδραση της PCR διενεργήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλό του Κοινοτικού Εργαστηρίου Αναφοράς για τη Μικροβιακή Αντοχή (DTU - Food) σε συνολικό όγκο 25μL χρησιμοποιώντας 12.5 μl 2X Green PCR Master Mix, 9,5 μl PCR H₂O και 0,5 μl από τον καθένα εκκινητή που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Έξι εκκινητές επιλέχθηκαν για την ταυτοποίηση των ειδών *Campylobacter jejuni* και *Campylobacter coli* ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κοινοτικού εργαστηρίου αναφοράς για τη μικροβιακή αντοχή (EURL AR) (PCR amplification of *Campylobacter jejuni* and *coli*; 1st version August 2013). Χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής Biometra UNO II και οι συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης των εκκινητών στα άκρα του DNA και επέκτασης του DNA ήταν: 10' στους 95°C, 30 κύκλοι 30'' στους 94°C, 90'' στους 59°C, 60'' στους 72°C και 10' στους 72°C.

Η φόρτωση του μίγματος PCR, έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% σε διάλυμα 1X TBE, το οποίο χρωματίστηκε με φωτοευαίσθητη χρωστική GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10.000X (Biotium Inc.) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 45' σε συνθήκες τάσης 100 V.

Campylobacter jejuni ATCC 33560 και *Campylobacter coli* ATCC 33559 χρησιμοποιήθηκαν ως στελέχη ελέγχου.

Πίνακας 1: Γονίδια στόχος και αλληλουχίες τους που χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή τυποποίηση των ειδών *Campylobacter*

Γονίδιο στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία	Αναμενόμενο μέγεθος αμπλικονίου
mapAC.jejuni	MDmapA1	5'-CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG-3'	589bp
mapAC.jejuni	MDmapA2	5'-GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A-3'	589bp
ceuEC.coli	COL3	5'-AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG -3'	462bp
ceuEC.coli	MDCOL2	5'-TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG-3'	462bp
16S	16S R primer 804RX	5'-GAC TAC CNG GGT ATC TAA TCC-3'	800bp
16S	16S F primer 10FX	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTN AG-3'	800bp

Έλεγχος της αντοχής του *C.jejuni* και του συμβιωτικού *E. coli* στις αντιμικροβιακές ουσίες

Τα απομονωθέντα στελέχη συμβιωτικού *E. coli* και *Campylobacter jejuni* υποβλήθηκαν σε έλεγχο ευαισθησίας στις αντιμικροβιακές ουσίες (όπως προβλεπόταν στο Άρθρο 4 της ΚΥΑ 1571/72152/2-6-2014 ΦΕΚ Β'1464) με τη δοκιμή προσδιορισμού της ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μικροπλάκες 96 βοθρίων επικαλυμμένες με αντιμικροβιακές ουσίες σε λυόφιλη μορφή (Trek, Thermo Scientific). Το εύρος των συγκεντρώσεων των αντιμικροβιακών ουσιών καθώς και οι επιδημιολογικές τιμές κατωφλίου για το χαρακτηρισμό των στελεχών ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά φαίνονται στον Πίνακα 2.

Αποτελέσματα

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στο διάστημα μεταξύ Σεπτεμβρίου - Δεκεμβρίου 2014, σε ένα σύνολο 494 σμηνών κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης τα οποία είχαν σφαγεί σε μεγάλα σφαγεία πουλερικών των περιφερειακών ενοτήτων (ΠΕ) Ευβοίας και Ιωαννίνων. Ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν ανά σφαγείο και ΠΕ εκτροφής φαίνεται στους Πίνακες 3 & 4.

Συνολικά 494 ομαδοποιημένα δείγματα δέκα τυφλών εντέρων εξετάστηκαν στα πλαίσια του εν λόγω προγράμματος. 374/494 (75,7%) δείγματα εξετάστηκαν από το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Χαλκίδας και 120/494 (24,3%) από το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Ιωαννίνων. Κατ'επέκταση ο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων συλλέχθηκαν από σφαγεία της ΠΕ Ευβοίας, όπως φαίνεται στην κατανομή των δειγμάτων ανά σφαγείο στον Πίνακα 3. Το 45,7% των σμηνών που εξετάστηκαν είχαν εκτραφεί στην ΠΕ Ιωαννίνων και το 20,4% στην ΠΕ Ευβοίας. Ο αριθμός των σμηνών που εξετάστηκαν ανά ΠΕ φαίνεται στον Πίνακα 4. 226 σμήνη που εκτράφηκαν στην ΠΕ Ιωαννίνων, σφάχτηκαν σε τρία σφαγεία. 62% (137/222) αυτών των σμηνών οδηγήθηκαν σε σφαγείο της ΠΕ Ευβοίας.

Πίνακας 2: Εύρος συγκεντρώσεων αντιμικροβιακών ουσιών μικροπλάκας MIC Sensitive (Trek) και χαρακτηρισμός στελεχών ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά στις χρησιμοποιούμενες αντιμικροβιακές ουσίες σύμφωνα με τις επιδημιολογικές τιμές κατωφλίου (Eucast Epidemiological cut off values)

<i>MIC 1^η μικροπλάκα για E.coli</i>		
Αντιμικροβιακή ουσία	Συγκεντρώσεις (mg/L) (εντός παρενθέσεως αρ βοθρίων)	Χαρακτηρισμός στελεχών R> MIC (mg/ml)
<i>Ampicillin</i>	1-64 (7)	8
<i>Cefotaxime</i>	0,25-4 (5)	0.25
<i>Ceftazidime</i>	0,5-8 (5)	0.5
<i>Meropenem</i>	0,03-16 (10)	0.125
<i>Nalidixic Acid</i>	4-128 (6)	16
<i>Ciprofloxacin</i>	0,015-8 (10)	0.06
<i>Tetracycline</i>	2-64 (6)	8
<i>Colistin</i>	1-16 (5)	
<i>Gentamycin</i>	0,5-32 (7)	2
<i>Trimethoprim</i>	0,25-32 (8)	2
<i>Sulfamethoxazole</i>	8-1.024 (8)	64
<i>Chloramphenicol</i>	8-128 (5)	16
<i>Azithromycin</i>	2-64 (6)	
<i>Tigecycline</i>	0,5-8 (6)	1
<i>MIC 2^η μικροπλάκα για E.coli ανθεκτικά στο Cefotaxime, Ceftazidime &/ή Meropenem</i>		
<i>Cefoxitin</i>	0,5-64 (8)	8
<i>Cefepime</i>	0,06-32 (10)	0.125
<i>Cefotaxime +clavulanic acid</i>	0,06-64(11)	8
<i>Ceftazidime +clavulanic acid</i>	0,125-128 (11)	
<i>Meropenem</i>	0,03-16 (10)	0.125
<i>Temocillin</i>	0,5-64 (8)	
<i>Imipenem</i>	0,12-16 (8)	0.5
<i>Ertapenem</i>	0,015-2 (8)	0.06
<i>Cefotaxime</i>	0,25-64 (9)	0.25
<i>Ceftazidime</i>	0,25-128 (10)	0.5
<i>MIC μικροπλάκα για C. jejuni</i>		
<i>Erythromycin</i>	1-128 (8)	8
<i>Ciprofloxacin</i>	0,12-16 (8)	0.5
<i>Tetracycline</i>	0,5-64 (8)	2
<i>Gentamycin</i>	0,12-16 (8)	2
<i>Nalidixic Acid</i>	1-64 (7)	16
<i>Streptomycin</i>	0,25-16 (7)	4

Πίνακας 3: Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν σε κάθε σφαγείο και προέλευση σμηνών

Σφαγείο	Αριθμός δειγμάτων/ Σύνολο δειγμάτων (%)	ΠΕ εκτροφής ορνιθίων κρεοπαραγωγής
HQF*	143/494 (29%)	ΑΡΤΑ, ΒΟΙΩΤΙΑ, ΕΥΒΟΙΑ, ΛΑΡΙΣΑ
ΑΓΡΟΖΩΗ*	137/494 (27%)	ΙΩΑΝΝΙΝΑ
ΑΓΓΕΛΑΚΗΣ*	52/494 (10%)	ΕΥΒΟΙΑ, ΑΝ ΑΤΤΙΚΗ
ΚΕΛΑΙΔΙΤΗΣ*	44/494 (9%)	ΑΝ. & ΔΥΤ. ΑΤΤΙΚΗ, ΒΟΙΩΤΙΑ,ΕΥΒΟΙΑ
ΠΙΝΔΟΣ**	61/494 (12%)	ΙΩΑΝΝΙΝΑ
ΝΙΤΣΙΑΚΟΣ**	59/494 (12%)	ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΑΡΤΑ, ΠΡΕΒΕΖΑ, ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ, ΣΕΡΡΕΣ,ΚΙΛΚΙΣ, ΘΕΣ/ΝΙΚΗ

*σφαγεία στην ΠΕ Ευβοίας, ** σφαγεία στην ΠΕ Ιωαννίνων

Επιπολασμός *Campylobacter spp.*

Ο επιπολασμός του *Campylobacter spp.* κυμάνθηκε στο 81% (400/494). Το είδος *Campylobacter coli* ανιχνεύθηκε στο 59,2% (237/400) των δειγμάτων και το *Campylobacter jejuni* στο 40,8% (163/400). Το ποσοστό θετικών δειγμάτων και τα ποσοστά ανά είδος μικροοργανισμού και ΠΕ φαίνονται στον Πίνακα 3. Το κυρίαρχο είδος σε όλες τις ΠΕ ήταν το *C.coli*.

Πίνακας 4: Αριθμός σμηνών που εξετάστηκαν ανά περιφερειακή ενότητα (ΠΕ), επιπολασμός *Campylobacter spp.*, *C. coli* /*C. jejuni* ανά ΠΕ

Περιφερειακή Ενότητα (ΠΕ)	Αρ. σμηνών/σύνολο εξεταζομένων σμηνών (%)	Επιπολασμός <i>Campylobacter spp.</i> (%)	Επιπολασμός <i>C. coli</i> (%)	Επιπολασμός <i>C. jejuni</i> (%)
Ιωάννινα*	223/494 (45.1)	183/400 (45.7)	107/400 (26.7)	76/400 (19)
Εύβοια	104/494 (21)	84/400 (21)	45/400 (11.5)	38/400 (9.5)
Βοιωτία	74/494 (15)	64/400 (16)	41/400 (10.2)	23/400 (5.7)
Άρτα	40/494 (8)	24/400 (6)	19/400 (4.7)	5/400 (1.3)
Αν Αττική	17/494 (3.4)	13/400 (3.2)	7/400 (1.7)	6/400 (1.5)
Λάρισα	15/494 (3.0)	13/400 (3.2)	8/400 (2)	5/400 (1.2)
Πρέβεζα	11/494 (2.2)	8/400 (2)	3/400 (0.7)	5/400 (1.2)
Σέρρες	3/494 (0.6)	3/400 (0.7)	2/400 (0.5)	1/400 (0.2)
Θες/νίκη	3/494 (0.6)	3/400 (0.7)	2/400 (0.5)	1/400 (0.2)
Κιλκίς	3/494 (0.6)	1/400 (0.2)	1/400 (0.2)	1/400 (0.2)
Δυτ Αττική	2/494 (0.4)	1/400 (0.2)	1/400 (0.2)	
Χαλκιδική	2/494 (0.4)	1/400 (0.2)	1/400 (0.2)	
Σύνολο		400/494 (81)	237/400 (59.2)	163/400 (40.8)

*137/223 (61,4%) σμηνή που εκτράφηκαν στην ΠΕ Ιωαννίνων έχουν σφαγεί στον νομό Εύβοιας

Αντοχή του *Campylobacter jejuni* στις αντιμικροβιακές ουσίες

80 απομονώματα *C. jejuni* εξετάστηκαν ως προς τη μικροβιακή τους αντοχή, σε 4 ομάδες αντιμικροβικών ουσιών. Κανένα από αυτά δεν βρέθηκε ανθεκτικό στη Γενταμικίνη και στην Ερυθρομικίνη. Το υψηλότερο ποσοστό αντοχής (91,2%) βρέθηκε στις Φθοριοκινολόνες και συγκεκριμένα στη Σιπροφλοξασίνη ακολουθούμενη από τις Κινολόνες (Ναλιδιξικό οξύ - 77,5%). Μικρότερο ποσοστό αντοχής παρατηρήθηκε στις Τετρακυκλίνες (71,2%) και στη Στρεπτομικίνη (21,2%).

Πίνακας 5: Αριθμός στελεχών και ποσοστά αντοχής *C. jejuni* στις αντιμικροβιακές ουσίες

Ομάδα	Αντιμικροβιακή ουσία	Αρ. ανθεκτικών/σύνολο εξετασθέντων	% αντοχής	% αντοχής από 25 ΚΜ ΕΕ*
Αμινογλυκοσίδες	Γενταμικίνη	0/80	0	0
	Στρεπτομικίνη	17/80	21,3	6,9
Κινολόνες	Ναλιδιξικό οξύ	62/80	77,5	65,1
Φθοριοκινολόνες	Σιπροφλοξασίνη	73/80	91,3	69,8
Τετρακυκλίνες	Τετρακυκλίνη	57/80	71,3	54,4
Μακρολίδια	Ερυθρομικίνη	0/80	0	5,9

4/80 απομονώματα ήταν ευαίσθητα σε όλες τις αντιμικροβιακές ουσίες (5%)

*EFSA Journal 2016:14(2):4380

Πίνακας 6: Αριθμός στελεχών και ποσοστά αντοχής *C. jejuni* στις αντιμικροβιακές ουσίες ανά ΠΕ

ΠΕ	Ναλιδιξικό Αρ. ανθεκτικών στελεχών (%)	Σιπροφλοξασίνη Αρ. ανθεκτικών στελεχών (%)	Τετρακυκλίνη Αρ. ανθεκτικών στελεχών (%)	Στρεπτομικίνη Αρ. ανθεκτικών στελεχών (%)	Σύνολο
Αττική	5 (100)	5 (100)	3 (60)	1 (20)	5
Εύβοια	9 (64,3)	13 (92,8)	13 (92,8)	3 (21,4)	14
Βοιωτία	10 (83,3)	11 (91,6)	6 (50)	1 (8,3)	12
Πρέβεζα	1 (33,3)	2 (66,6)	1 (33,3)	0	3
Ιωάννινα	31 (79,4)	35 (89,7)	27 (69,2)	9 (23)	39
Άρτα	3 (75)	4 (100)	4 (100)	1 (25)	4
Λάρισα	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2
Θες/νίκη	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0	1
	62 (77,5)	73 (91,2)	57 (71,2)	17 (21,2)	80

Πίνακας 6: Φαινότυποι Αντοχής *C. jejuni*

Φαινότυπος Αντοχής	Αρ. στελεχών	% Παρουσία Φαινότυπου
Σιπροφλοξασίνη, Ναλιδιξικό Τετρακυκλίνη	28/76	36,8
Σιπροφλοξασίνη, Ναλιδιξικό	23/76	30,2
Σιπροφλοξασίνη, Ναλιδιξικό, Στρεπτομικίνη, Τετρακυκλίνη	14/76	18,4
Σιπροφλοξασίνη, Τετρακυκλίνη	10/76	13,1
Τετρακυκλίνη, Στρεπτομικίνη	1/76	1,3

Πίνακας 7: Αριθμός στελεχών και ποσοστό αντοχής συμβιωτικού *E. coli* ανά αντιμικροβιακή ουσία

Ομάδα	Αντιμικροβιακή ουσία	Αρ. εξετασθέντων	% αντοχής	% αντοχής σε 27 KM EE*
Αμινογλυκοσίδες	Γενταμικίνη	172	12.8	11.6
Κινολόνες	Ναλιδιξικό	172	86.0	62.6
Φθοριοκινολόνες	Σιπροφλοξασίνη	172	89.0	65.7
Τετρακυκλίνες	Τετρακυκλίνη	172	68.0	50.1
Γλυκυκυκλίνες	Τιγκεκυκλίνη	172	0.0	0.0
Μακρολίδια	Αζιθρομικίνη	172	9.3	6.7
B-Λακτάμες	Αμπικιλίνη	172	69.8	58.6
Κεφαλοσπορίνες	Κεφοταξίμη	172	2.9	5.1
	Κεφταζιτίμη	172	2.9	5.0
Καρβαπενέμες	Μεροπενέμη	172	0.0	0.0
Αμφενικόλες	Χλωραμφαινικόλη	172	35,5	21.6
Πολυμυξίνες	Κολιστίνη	172	0,0	0.9
Σουλφοναμίδες	Σουλφομεθοξαζόλη	172	70.3	53.1
Τριμεθοπρίμη		172	61.6	40.6

*EFSA Journal 2016:14(2):4380

Πίνακας 8: Αριθμός στελεχών, ποσοστά αντοχής συμβιωτικού *E. coli* στις αντιμικροβιακές ουσίες, ανά ΠΕ εκτροφής σμηνών

Αντιμικροβιακή ουσία	Άρτα		Αττική		Εύβοια		Ιωάννινα		Λάρισα		Πρέβεζα		Βοιωτία	
	No	%R	No	%R	No	%R	No	%R	No	%R	No	%R	No	%R
Αμπικιλίνη	12	66,7	8	87,5	43	72,1	81	70,4	4	100,0	2	0,0	22	59,1
Αζιθρομικίνη	12	16,7	8	0,0	43	27,9	81	16,0	4	50,0	2	0,0	22	9,1
Κεφοταξίμη	12	0,0	8	0,0	43	2,3	81	3,7	4	0,0	2	0,0	22	4,5
Κεφταζιτίμη	12	0,0	8	0,0	43	2,3	81	3,7	4	0,0	2	0,0	22	4,5
Χλωραμφαινικόλη	12	41,7	8	25,0	43	48,8	81	38,3	4	25,0	2	0,0	22	27,3
Σιπροφλοξασίνη	12	91,7	8	100,0	43	93,0	81	85,2	4	100,0	2	50,0	22	90,9
Κολιστίνη	12	0,0	8	0,0	43	2,3	81	0,0	4	0,0	2	0,0	22	0,0
Γενταμικίνη	12	8,3	8	12,5	43	23,3	81	19,8	4	0,0	2	0,0	22	22,7
Μεροπενέμη	12	0,0	8	0,0	43	0,0	81	0,0	4	0,0	2	0,0	22	0,0
Ναλιδιξικό οξύ	12	83,3	8	100,0	43	93,0	81	85,2	4	100,0	2	50,0	22	81,8
Σουλφομεθοξαζόλη	12	75,0	8	75,0	43	81,4	81	70,4	4	100,0	2	0,0	22	54,5
Τετρακυκλίνη	12	66,7	8	75,0	43	81,4	81	64,2	4	100,0	2	0,0	22	72,7
Τιγκεκυκλίνη	12	0,0	8	0,0	43	0,0	81	0,0	4	0,0	2	0,0	22	0,0
Τριμεθοπρίμη	12	58,3	8	75,0	43	72,1	81	61,7	4	100,0	2	0,0	22	36,4

Ποσοστό ανθεκτικών στελεχών ανά αντιβιοτικό & γεωγραφική περιοχή

No -> Αριθμός στελεχών που απομονώθηκαν

%R -> ποσοστό ανθεκτικών στελεχών

Συζήτηση

Επιπολασμός Καμπυλοβακτηριδίου

Η πλειονότητα των στελεχών Καμπυλοβακτηριδίου που δηλώθηκαν στην ετήσια αναφορά της EFSA για το έτος 2013 προέρχονταν από κράτη μέλη της βόρειας Ευρώπης (Nordic countries) και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο επιπολασμός του Καμπυλοβακτηριδίου στα ορνίθια κρεοπαραγωγής ήταν γενικά χαμηλός (15,1% των σμηνών που εξετάστηκαν) και αυτό παρατηρείται λόγω των προγραμμάτων ελέγχου που εφαρμόζονται σε αυτές τις χώρες. Ο επιπολασμός του Καμπυλοβακτηριδίου στα ορνίθια κρεοπαραγωγής ποικίλει. Το 2008, σε μια έρευνα που διεξήχθη ανάμεσα σε 24 κράτη μέλη της ΕΕ για να διερευνηθεί ο επιπολασμός του μικροοργανισμού σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων που εξετάστηκαν στο σφαγείο, έδειξε ότι 71,2% των σμηνών ήταν θετικά σε μόλυνση από *Campylobacter* spp. (διακύμανση 2,0%- 96,8%) (EFSA 2010a). Η μέχρι τώρα έρευνα, δείχνει πως διαφορετικοί ορότυποι εμφανίζονται στα κράτη μέλη. Σε κράτη μέλη της Ν.Ευρώπης φαίνεται ότι *C. coli* κυριαρχεί, ενώ στα κράτη μέλη της Β.Ευρώπης το *C. jejuni* είναι το μόνο είδος που απομονώνεται. Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης στη χώρα μας, που έδειξαν ότι το είδος *Campylobacter coli* ανιχνεύθηκε στο 59,2% (237/400) των δειγμάτων και το *Campylobacter jejuni* στο 40,8% (163/400). Η εικόνα αυτή είναι η ίδια σε όλες τις ΠΕ της χώρας που συμμετείχαν στη δειγματοληψία.

Αντοχή σε αντιμικροβιακές ουσίες του Καμπυλοβακτηριδίου, που απομονώνεται από ορνίθια κρεοπαραγωγής

Η σημασία της μελέτης της μικροβιακής αντοχής του Καμπυλοβακτηριδίου είναι πολύ μεγάλη και αυτό οφείλεται σε δύο λόγους :

(1) το *Campylobacter* spp. αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα τροφιμογενούς διάρροιας στον άνθρωπο (παρόλο που η καμπυλοβακτηρίωση στους ανθρώπους είναι μια αυτοπεριοριζόμενη νόσος) και η κύρια πηγή μόλυνσης είναι τα πουλερικά και

(2) οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αντιμικροβιακές ουσίες για τη θεραπεία της καμπυλοβακτηρίωσης στον άνθρωπο είναι τα μακρολίδια (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, αζιθιοπρίμη) και οι φθοριοκινολόνες (σιπροφλοξασίνη), συνεπώς εγείρεται μεγάλη ανησυχία καθώς τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός ανθεκτικών στελεχών καμπυλοβακτηριδίου, τα οποία έχουν αναπτύξει αντοχή στις φθοριοκινολόνες καθώς και στα μακρολίδια, τις αμινογλυκοσίδες και στις β-λακτάμες. Οι τάσεις στην μικροβιακή αντοχή δείχνουν μια καθαρή συσχέτιση ανάμεσα στην χρήση των αντιμικροβιακών στην κτηνιατρική και ειδικότερα στα παραγωγικά ζώα και την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στον ανθρώπινο πληθυσμό. Ακόμα μεγαλύτερη ανησυχία προκύπτει από το γεγονός ότι η αντοχή στις αντιμικροβιακές ουσίες προκαλείται από εστιακές μεταλλάξεις στο DNA που έχουν ως αποτέλεσμα διασταυρούμενη αντοχή ανάμεσα σε διαφορετικά μακρολίδια. Κατά συνέπεια, η χρήση μακρολιδίων για τη θεραπεία λοιμώξεων των παραγωγικών ζώων οδηγεί σε αυξημένη αντοχή σ' αυτή την ομάδα των αντιμικροβιακών ουσιών, η οποία κατ' επέκταση θα έχει ως κατάληξη την αναποτελεσματική θεραπεία των λοιμώξεων στον άνθρωπο.

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της κοινοτικής απόφασης 2014/652/EU στα 25 ΚΜ που συμμετείχαν, φανέρωσαν ένα γενικό μοντέλο στην συμπεριφορά του *C. jejuni*, ως προς τη μικροβιακή του αντοχή, το οποίο συνοψίζεται ως υψηλή αντοχή στη σιπροφλοξασίνη (69,8%), το ναλιδιξικό οξύ (65,1%) και τις τετρακυκλίνες (54,4%), χαμηλή αντοχή στην ερυθρομυκίνη (5,9%) και πολύ χαμηλή αντοχή στη γενταμυκίνη (0,9%). Τα αποτελέσματα αυτά, είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης στη χώρα μας με τη μόνη διαφορά ότι στη γενταμυκίνη δεν καταγράφηκε αντοχή.

Αντοχή σε αντιμικροβιακές ουσίες του συμβιωτικού *E. coli*, που απομονώνεται από ορνίθια κρεοπαραγωγής

Το συμβιωτικό *E. coli* επιλέγεται ως μικροοργανισμός δείκτης για την παρακολούθηση της μικροβιακής αντοχής στα Gram αρνητικά βακτήρια, λόγω της παρουσίας του στα περιττώματα των ζώων, γιατί ενδέχεται να σχετίζεται με την υγεία των ανθρώπων και τέλος γιατί μπορεί να προσλαμβάνει πλασμίδια αντοχής που μεταφέρονται μεταξύ των εντερικών βακτηρίων.

Τα συμβιωτικά *E. coli* που υπάρχουν στο έντερο των παραγωγικών ζώων μπορούν να αποτελέσουν πηγή ανθεκτικών γονιδίων, τα οποία μπορούν να εξαπλωθούν οριζόντια σε ζωνοσογόνα και άλλα βακτήρια που υπάρχουν στην τροφική αλυσίδα.

Η παρακολούθηση της αντοχής στα συμβιωτικά *E. coli* που έχουν απομονωθεί από τυχαία επιλεγμένα υγιή ζώα, είναι αντιπροσωπευτική για το γενικό πληθυσμό των ζώων και δίνει αξιόπιστα δεδομένα για την μικροβιακή αντοχή που υπάρχει στον συγκεκριμένο πληθυσμό. Τα δεδομένα αυτά, χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της σχέσης μεταξύ της εκλεκτικής πίεσης που ασκείται στον πληθυσμό των εντερικών βακτηρίων στα παραγωγικά ζώα από την χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών. Επιπλέον, το συμβιωτικό *E. coli* χρησιμοποιείται ως εκπρόσωπος ολόκληρης της ομάδας των Εντεροβακτηριοειδών για την παρακολούθηση της εμφάνισης και των αλλαγών που συμβαίνουν στην αναλογία των βακτηρίων που παράγουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες.

Για το 2014, υπέβαλαν ποσοτικά στοιχεία για την Μικροβιακή Αντοχή στην EFSA 27 ΚΜ και η Νορβηγία. Τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν στην σιπροφλοξασίνη σε ποσοστό 65.7% & στο ναλιδιξικό οξύ 62.6% , στην αμπικιλίνη (58.7%), στις σουλφοναμίδες (53.1%) και στην τετρακυκλίνη (50.1%). Η αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς υπολογίστηκε στο 5.1% για την κεφταξίμη και στο 5.0% για την κεφταζινίμη.

Η αντοχή των συμβιωτικών *E. coli* στις φθοριοκινολόνες (κατατάσσονται στα κρίσιμης σημασίας αντιβιοτικά για τον άνθρωπο σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας) βρέθηκε σε πολύ ψηλά επίπεδα και αυτό μπορεί να οφείλεται, είτε στην εκλεκτική πίεση που ασκείται από την συνολική χρήση των αντιβιοτικών της ομάδας αυτής στα ορνίθια κρεοπαραγωγής, είτε στο ότι η χρήση των φθοριοκινολονών σε συγκεκριμένο στάδιο της πυραμίδας παραγωγής προκαλεί αντοχή η οποία διασπείρεται στα σμήνη των χαμηλότερων στρωμάτων της πυραμίδας μέσω της εξάπλωσης και μετάδοσης των ανθεκτικών βακτηριακών κλώνων. Τα υψηλά ποσοστά αντοχής στις φθοριοκινολόνες πιθανότατα συνδέονται με την υψηλή κατανάλωση αυτών των αντιβιοτικών, καθώς επίσης και με το βαθμό επιβίωσης των ανθεκτικών στελεχών μετά την τελική απολύμανση του θαλάμου και την μετάδοση των ανθεκτικών στελεχών που επιβιώνουν της απολύμανσης στο επόμενο σμήνος που τοποθετείται στον ίδιο θάλαμο.

Συνολικά για όλες τις χώρες, το 54.3% των στελεχών του συμβιωτικού *E. coli* από ορνίθια κρεοπαραγωγής ήταν πολυανθεκτικά (αντοχή σε τουλάχιστον 3 ομάδες αντιβιοτικών), ενώ συναντοχή στη σιπροφλοξασίνη και την κεφταξίμη ανιχνεύθηκε στο 5% αυτών, με βάση τις επιδημιολογικές τιμές κατωφλίου. Το ποσοστό συναντοχής υπολογίστηκε γιατί τα δύο αυτά αντιβιοτικά έχουν ιδιαίτερη σημασία για την ιατρική.

Κανένα από τα εξετασθέντα στελέχη δεν βρέθηκε ανθεκτικό στη μεροπενέμη (καρβαπενέμες- κρίσιμης σημασίας για τον άνθρωπο αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως τελευταία αποτελεσματικά αντιβιοτικά για τη θεραπεία λοιμώξεων από πολυανθεκτικά Εντεροβακτηριοειδή). Πολύ λίγα στελέχη από ορνίθια κρεοπαραγωγής βρέθηκαν ανθεκτικά στην Ερταπενέμη και εξετάζονται γενετικά.

Αντοχή στην κολιστίνη ανιχνεύθηκε από διάφορα κράτη μέλη, όχι όμως στη χώρα μας. Τα στελέχη αυτά βρίσκονται υπό περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να βρεθεί ο μηχανισμός αντοχής στην κολιστίνη. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ένα ειδικό γονίδιο, το *mcr-1*, το οποίο εδράζεται σε πλασμίδιο, γεγονός που κάνει εύκολη τη μετάδοσή του μεταξύ διαφορετικών μικροοργανισμών. Έως την ανακάλυψη του γονιδίου αυτού, η αντοχή στην κολιστίνη θεωρούνταν ότι μπορούσε μόνο να μεταφερθεί μέσω κυτταρικής διαίρεσης και ότι οφειλόταν μόνο σε χρωμοσωμικές μεταλλάξεις.

Τα συμβιωτικά *E. coli* των ζώων είναι αντικείμενο μελέτης, επειδή θεωρούνται δεξαμενή γονιδίων αντοχής, όπως ήδη αναφέρθηκε, και ιδιαίτερα γονιδίων αντοχής στις κεφαλοσπορίνες (γονίδια παραγωγής ενζύμων ESBL & AmpC που υδρολύουν τα ευρέως φάσματος β-λακταμικά αντιβιοτικά) τα οποία μπορούν να μεταφερθούν σε άλλους μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να είναι παθογόνοι για τους ανθρώπους και /ή τα ζώα, όπως η Σαλμονέλλα και η μεταφορά αυτή μπορεί να συντελεστεί μέσα στο έντερο ζώων και ανθρώπων. Όταν τα στελέχη Σαλμονέλλας έχουν αποκτήσει τα πλασμίδια που φέρουν γονίδια αντοχής στις 3^{ης} & 4^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνες, μπορούν να εξαπλωθούν οι κλώνοι αυτοί, και όχι μόνο λόγω της πίεσης που ασκείται από την χρήση των αντιβιοτικών, αλλά και λόγω της μετακίνησης των ζώων ή επειδή η αντοχή έχει συμβεί στην κορυφή της παραγωγικής πυραμίδας στα ζώα αναπαραγωγής.

Οι 3^{ης} & 4^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνες είναι αντιβιοτικά με ιδιαίτερη σημασία στον άνθρωπο, επειδή χρησιμοποιούνται ως αντιβιοτικά πρώτης επιλογής στην θεραπεία συστηματικών λοιμώξεων από Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς, όπως για παράδειγμα το *E. coli* & η *Salmonella*. Μεταξύ των στελεχών *E. coli* που υπάρχουν στα ζώα υπάρχουν ορισμένα στελέχη που θα μπορούσαν να προκαλέσουν λοίμωξη στον άνθρωπο (τα περισσότερα στελέχη είναι συμβιωτικά και απαθογόνα) και κάποια παρόλο που αρχικά αποτελούν συμβιωτικούς μικροοργανισμούς των ζώων μπορούν να αποικήσουν προσωρινά ή μόνιμα το ανθρώπινο έντερο. Κατά το πέρασμα τους από το έντερο των ανθρώπων τα στελέχη του *E. coli* θα μπορούσαν να ανταλλάξουν πλασμίδια αντοχής με τα ανθρώπινα συμβιωτικά *E. coli*.

Για το λόγο αυτό είναι επιβεβλημένη η ανάγκη διατήρησης των επιπέδων αντοχής των συμβιωτικών ζωικών *E. coli* στα κρίσιμα για τον άνθρωπο αντιβιοτικά, σε πολύ χαμηλά επίπεδα, τα οποία υπό άλλες συνθήκες, όπως αναφέρθηκε ήδη, θα μπορούσαν να αποτελέσουν δεξαμενές γονιδίων αντοχής.

Βιβλιογραφία

1. Eucast www.eucast.org
2. Decision 2013/652/EU on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria
3. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal* 2016;14(2):4380