

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



## Μεταπτυχιακή διατριβή

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
*ESCHERICHIA COLI* ΚΑΙ *ENTEROCOCCUS* SPP ΣΤΟ  
ΚΡΕΑΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΥ

ΚΥΡΙΑΚΗ ΝΕΟΦΥΤΟΥ

ΛΕΜΕΣΟΣ 2013



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
*ESCHERICHIA COLI* ΚΑΙ *ENTEROCOCCUS* SPP ΣΤΟ  
ΚΡΕΑΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΥ

της  
Κυριακής Νεοφύτου

Λεμεσός 2013

**ΕΝΤΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ**

Μεταπτυχιακή διατριβή

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑ  
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *ESCHERICHIA COLI* ΚΑΙ *ENTEROCOCCUS* SPP ΣΤΟ ΚΡΕΑΣ  
ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΥ

Παρουσιάστηκε από την

Κυριακή Νεοφύτου

Επιβλέπων καθηγητής \_\_\_\_\_

Μέλος επιτροπής (Πρόεδρος) \_\_\_\_\_

Μέλος επιτροπής \_\_\_\_\_

Μέλος επιτροπής \_\_\_\_\_

Μέλος επιτροπής \_\_\_\_\_

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Ιούνιος, 2013

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Κυριακή Νεοφύτου, 2013

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Ιάκωβο Αναστασίου, επιστημονικό συνεργάτη του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, του οποίου η πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση συνέβαλε τα μέγιστα στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, κ. Δημήτρη Τσάλτα για την αμέριστη υποστήριξη του σε όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

*Στους αγαπημένους μου γονείς,  
παντοτινούς φάρους στο μονοπάτι μου*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κρέας των πουλερικών σχετίζεται με υψηλό φορτίο ανθεκτικών βακτηρίων σε πολλές χώρες του κόσμου, και θεωρείται σημαντική πηγή μετάδοσης της ανθεκτικότητας στον άνθρωπο. Στην παρούσα μελέτη, εκτιμήσαμε τον επιπολασμό της ανθεκτικότητας ανάμεσα στα είδη *Escherichia coli* και *Enterococcus* spp, που απομονώθηκαν από το κρέας πουλερικών, από τρεις εγχώριες πτηνοτροφικές μονάδες (Α, Β, Γ). Κατατάξαμε τον πληθυσμό των *E. coli* (n=227) στις τέσσερις κύριες φυλογενετικές ομάδες (Α, Β1, Β2, D) και τον ελέγξαμε για την παρουσία γονιδίων β-λακταμασών (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *ampC*), ενώ παράλληλα αναλύσαμε 37 απομονώσεις με multilocus sequence typing (MLST). Ο πληθυσμός των enterococci διαχωρίστηκε σε *E. faecium* (n=98) και *E. faecalis* (n=32). Ολόκληρος ο πληθυσμός του *E. faecium* αναλύθηκε με multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), ενώ 28 απομονώσεις αναλύθηκαν με MLST. Το κρέας από τις φάρμες Α και Γ είχε αυξημένα ποσοστά ανθεκτικών στην κεφοταξίμη (CTX-R) *E. coli*, 40% και 68% αντίστοιχα, σε αντίθεση με τη φάρμα Β όπου τα CTX-R *E. coli* ήταν μόνο 12%. Τα γονίδια *ampC* (CIT) βρέθηκαν στο 41% των CTX-R *E. coli* και τα *bla*<sub>CTX-M</sub> (CTX-M-1, CTX-M-9) στο 26% των CTX-R *E. coli*. Οι φυλογενετικές ομάδες Β1 και D, περιλαμβάνουν CTX-R *E. coli* σε ποσοστά 81% και 86% αντίστοιχα. Οι συχνότεροι τύποι αλληλουχίας (ST) των *E. coli* από το κρέας των πουλερικών, ήταν τα ST10, 93, 117 και 2309. Το ST117 θεωρείται στέλεχος υψηλού κινδύνου για πρόκληση επιδημιών με πολυανθεκτικά (MDR) *E. coli* στον άνθρωπο. Το κρέας της φάρμας Β, είχε αυξημένα ποσοστά ανθεκτικών *E. faecium* (72% στην αμπικιλίνη και 68% στη γενταμυκίνη υψηλής συγκέντρωσης-HLGN), σε αντίθεση με τις φάρμες Α και Γ όπου η ανθεκτικότητα στους enterococci ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης (< 250 cfu/g). Όλες οι απομονώσεις του *E. faecalis* ήταν ευαίσθητες στα αντιβιοτικά. Ο *E. faecium* επικρατεί στις φάρμες Α και Β (72% και 96% αντίστοιχα), ενώ στη φάρμα Γ επικρατεί ο *E. faecalis* (100%). Τα συχνότερα στελέχη του *E. faecium* ήταν τα ST148, 157 και 236. Τα ST148 που βρέθηκαν αποκλειστικά στη φάρμα Β, είχαν 100% ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και στην HLGN. Από τα αποτελέσματά μας συμπεραίνουμε ότι στις φάρμες Α και Γ ευνοείται η επιλογή της ανθεκτικότητας στις κεφαλοσπορίνες ανάμεσα στα *E. coli*, κάτι που δεν συμβαίνει στη φάρμα Β. Δεδομένου ότι η χρήση των κεφαλοσπορινών στα κοτόπουλα απαγορεύεται, μια πιθανή εξήγηση είναι η χρήση κινολόνων στις φάρμες Α και Γ, οι οποίες είναι



γνωστό ότι συνεπιλέγουν την ανθεκτικότητα στις κεφαλοσπορίνες. Το φαινόμενο αυτό, γνωστό ως PMQR (plasmid-mediated quinolone resistance), είναι πρόσφατη ανακάλυψη, και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για το χαρακτηρισμό των γενετικών στοιχείων που εμπλέκονται. Στη φάρμα Β, ευνοείται η επικράτηση ανθεκτικών στελεχών *E. faecium*, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από τη χρήση αμοξικιλίνης. Επομένως, φαίνεται ότι η αντιμικροβιακή στρατηγική κάθε φάρμας, καθορίζει την επιλογή της ανθεκτικότητας και πιθανόν την επικράτηση συγκεκριμένων στελεχών. Η παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων στο κρέας, τα οποία στην περίπτωση των *E. coli* φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν β-λακταμάσες ευρέως φάσματος (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *ampC*) που πιθανότατα συνδέονται με ανθεκτικότητα στις κινολόνες, και μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης ατελώς ψημένου κρέατος ή λόγω λανθασμένων πρακτικών υγιεινής, εγείρουν ανησυχητικά ερωτήματα για την ασφάλεια της δημόσιας υγείας.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ix
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xiii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	xiv
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xvii
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xviii
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	xix
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Ανθεκτικότητα στο περιβάλλον.....	1
1.2. <i>Escherichia coli</i> και <i>Enterococcus</i> spp ως δείκτες της ανθεκτικότητας.....	2
1.3. <i>Escherichia coli</i> – κλινική σημασία.....	3
1.4. Οι β-λακταμάσες ευρέως φάσματος – ESBLs.....	4
1.4.1. Ομάδες των ESBLs.....	5
1.4.2. Επιδημιολογία των ESBLs.....	6
1.4.3. Συν-επιλογή της ανθεκτικότητας στις κεφαλοσπορίνες από άλλες ομάδες αντιβιοτικών στα <i>Enterobacteriaceae</i> : ο ρόλος των κινολόνων.....	7
1.5. <i>Enterococcus</i> spp – κλινική σημασία.....	8
1.6. Ερευνητικοί στόχοι.....	11
1.7. Σχεδιασμός του πειράματος.....	12
2. Υλικά και μέθοδοι.....	14
2.1. Συλλογή του δείγματος.....	14
2.2. Απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση.....	14
2.3. Θρεπτικά υποστρώματα.....	16
2.3.1. Απομόνωση των <i>E. coli</i> .....	16
2.3.2. Απομόνωση των <i>Enterococcus</i> spp.....	16
2.3.3. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	17
2.4. Διαλύματα αντιβιοτικών.....	17

2.4.1. Αμπικιλλίνη.....	17
2.4.2. Κεφοταξίμη.....	18
2.4.3. Γενταμυκίνη.....	18
2.4.4. Βανκομυκίνη.....	18
2.5. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	19
2.6. Εξαγωγή ολικού DNA.....	20
2.7. Δημιουργία βιβλιοθήκης.....	21
2.8. Αντιδράσεις PCR, ηλεκτροφόρηση και οπτικοποίηση των προϊόντων.....	21
2.9. Καθορισμός φυλογενετικής ομάδας των απομονώσεων <i>E. coli</i> .....	22
2.10. Ανίχνευση ESBLs στις απομονώσεις των <i>E. coli</i> .....	23
2.11. Ταυτοποίηση του είδους των <i>Enterococci</i> .....	25
2.12. Ανίχνευση του γονιδίου <i>esp</i> στις απομονώσεις των <i>Enterococci</i> .....	25
2.13. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA).....	26
2.13.1. Συνθήκες PCR.....	27
2.14. Multi-locus sequence typing (MLST).....	28
2.14.1. MLST – <i>Enterococcus faecium</i> .....	28
2.14.2. MLST – <i>Escherichia coli</i> .....	29
2.14.3. Αλληλούχιση DNA.....	30
3. Αποτελέσματα: <i>Escherichia coli</i> .....	32
3.1. Καταμέτρηση των πληθυσμών των <i>E. coli</i> που απομονώθηκαν στο κρέας των πουλερικών.....	32
3.2. Επιπολασμός της ανθεκτικότητας σε κάθε φάρμακo.....	33
3.3. Φαινότυποι ανθεκτικότητας: κατανομή στον ολικό πληθυσμό κάθε φάρμακo.....	35
3.4. Γονότυποι ανθεκτικότητας: επιπολασμός σε κάθε φάρμακo.....	36
3.4.1. Ολικός πληθυσμός (Total).....	36
3.4.2. Πληθυσμός αμπικιλλίνης (AMP-R).....	37
3.4.3. Πληθυσμός κεφοταξίμης (CTX-R).....	37
3.4.4. Πληθυσμός γενταμυκίνης (GN-R).....	37
3.5. Συσχέτιση γονότυπων ανθεκτικότητας με φαινότυπους ανθεκτικότητας.....	38
3.6. Φυλογενετικές ομάδες: συσχέτιση με φαινότυπο ανθεκτικότητας.....	39

3.6.1. Ολικός πληθυσμός (Total).....	40
3.6.2. Πληθυσμός αμπικιλίνης (AMP-R).....	40
3.6.3. Πληθυσμός κεφοταξίμης (CTX-R).....	41
3.6.4. Πληθυσμός γενταμυκίνης (GN-R).....	41
3.7. Multi-locus sequence typing.....	42
4. Αποτελέσματα: <i>Enterococcus</i> spp.....	45
4.1. Καταμέτρηση των πληθυσμών <i>Enterococcus</i> spp που απομονώθηκαν στο κρέας των πουλερικών.....	45
4.2. Επιπολασμός της ανθεκτικότητας σε κάθε φάρμα.....	46
4.3. Επιπολασμός των <i>E. faecalis</i> και <i>E. faecium</i> σε κάθε φάρμα .....	47
4.4. Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας ανάμεσα στα είδη των <i>Enterococci</i> .....	48
4.5. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA).....	50
4.6. Multi-locus sequence typing.....	51
5. Συζήτηση.....	54
5.1. <i>Escherichia coli</i> .....	54
5.2. <i>Enterococcus</i> spp.....	59
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	84
8.1. Συμπληρωματικά δεδομένα.....	84

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επιδημιολογικά σημεία καμπής των <i>E. coli</i> και συγκεντρώσεις επιλογής των ανθεκτικών πληθυσμών στα θρεπτικά υποστρώματα.....	20
Πίνακας 2: Επιδημιολογικά σημεία καμπής των Enterococci και συγκεντρώσεις επιλογής των ανθεκτικών πληθυσμών στα θρεπτικά υποστρώματα.....	20
Πίνακας 3: Εκκινητές για την ανίχνευση των ESBLs στα <i>E. coli</i> .....	24
Πίνακας 4: Εκκινητές για την ταυτοποίηση των <i>E.faecalis</i> και <i>E.faecium</i> .....	25
Πίνακας 5: Εκκινητές για την ανίχνευση του γονιδίου <i>esp</i> .....	26
Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των VNTR.....	27
Πίνακας 7: Δομικά γονίδια στο πρωτόκολλο MLST του <i>E.faecium</i> .....	29
Πίνακας 8: Δομικά γονίδια στο πρωτόκολλο MLST του <i>E. coli</i> .....	30
Πίνακας 9: Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας των <i>E. coli</i> ανάμεσα στον ολικό πληθυσμό κάθε φάρμας.....	84
Πίνακας 10: Επιπολασμός γονότυπων ανθεκτικότητας των <i>E. coli</i> σε κάθε φαινότυπο ανθεκτικότητας.....	85
Πίνακας 11: Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας των <i>E. coli</i> στον ολικό πληθυσμό κάθε φάρμας και φυλογενετικής ομάδας.....	86
Πίνακας 12: Πιθανά MTs της βάσης δεδομένων του UMC που αντιστοιχούν σε κάθε ομάδα MT-1-20.....	87
Πίνακας 13: Κατανομή των 98 απομονώσεων του <i>E. faecium</i> ανάμεσα σε 20 ομάδες MT και 15 ST.....	88

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1: Μηχανισμοί οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς μεταξύ βακτηρίων.....	1
Εικόνα 2: Ποσοστά ανθεκτικών απομονώσεων <i>E. coli</i> σε κεφαλοσπορίνες 3 <sup>ης</sup> γενιάς από νοσηλευτικά ιδρύματα σε χώρες της Ευρώπης το 2011.....	5
Εικόνα 3. Διχοτομικό δενδρόγραμμα για τον καθορισμό της φυλογενετικής ομάδας ενός στελέχους <i>E. coli</i> .....	22
Εικόνα 4: Πληθυσμοί των <i>E.coli</i> στο κρέας των πουλερικών ως ο γεωμετρικός μέσος όρος των τριών δειγμάτων που λήφθηκαν από κάθε φάρμα σε log cfu/g.....	32
Εικόνα 5: Επιπολασμός της ανθεκτικότητας των <i>E. coli</i> στον ολικό πληθυσμό κάθε φάρμας με βάση τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης.....	34
Εικόνα 6: Επιπολασμός της ανθεκτικότητας των <i>E. coli</i> στους πληθυσμούς των αντιβιοτικών με βάση τη δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης.....	35
Εικόνα 7: Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας των <i>E. coli</i> σε κάθε φυλογενετική ομάδα.....	39
Εικόνα 8: MS <sub>TREE1</sub> : Γενετική δομή των 16 STs των 37 Ecom και κατανομή τους ανάμεσα στα 291 STs των 1584 <i>E. coli</i> της βάσης δεδομένων MLST του UCC.....	43
Εικόνα 9: MS <sub>TREE2</sub> : Γενετική δομή των 16 STs των 37 Ecom και κατανομή τους ανάμεσα στις τρεις φάρμες.....	44
Εικόνα 10: MS <sub>TREE3</sub> : Γενετική δομή των 16 STs των 37 Ecom και κατανομή τους ανάμεσα στους φαινότυπους ανθεκτικότητας (AMP, CTX, SXT, W, GN).....	44
Εικόνα 11: Πληθυσμοί των <i>Enterococcus spp</i> στο κρέας των πουλερικών ως ο γεωμετρικός μέσος όρος των τριών δειγμάτων που λήφθηκαν από κάθε φάρμα σε log cfu/g.....	45

Εικόνα 12: Επιπολασμός της ανθεκτικότητας των <i>Enterococcus</i> spp σε κάθε φάρμα και πληθυσμιακή ομάδα με βάση τη δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης.....	47
Εικόνα 13: Επιπολασμός των <i>E. faecalis</i> και <i>E. faecium</i> σε κάθε φάρμα και πληθυσμιακή ομάδα.....	48
Εικόνα 14: Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας ανάμεσα στους <i>E. faecalis</i> και <i>E. faecium</i> σε κάθε φάρμα και πληθυσμιακή ομάδα.....	49
Εικόνα 15: MS <sub>TREE4</sub> : Γενετική δομή του πληθυσμού των 98 <i>E. faecium</i> με βάση τα MT τους και κατανομή τους ανάμεσα στις τρεις φάρμες.....	51
Εικόνα 16: MS <sub>TREE5</sub> : Γενετική δομή του πληθυσμού των 28 <i>E. faecium</i> με βάση τα ST τους και κατανομή τους ανάμεσα στις τρεις φάρμες.....	53
Εικόνα 17: MS <sub>TREE6</sub> : Γενετική δομή του πληθυσμού των 28 <i>E. faecium</i> με βάση τα ST τους και κατανομή τους ανάμεσα στα προφίλ ανθεκτικότητας.....	53

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AFLP:	Amplified fragment length polymorphism
AMP:	Αμπικιλίνη
AMP-R:	Πληθυσμός ανθεκτικός στο θεραπευτικό υπόστρωμα με αμπικιλίνη
APEC:	Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i>
AST:	Antibiotic susceptibility testing
BAPS:	Bayesian analysis of population structure
Bp:	Ζεύγη βάσεων DNA
Cfu/g:	Colony forming units per gram
CTX:	Κεφοταξίμη
CTX-R:	Πληθυσμός ανθεκτικός στο θεραπευτικό υπόστρωμα με κεφοταξίμη
ddH <sub>2</sub> O:	Αποστειρωμένο νερό
ddNTPs:	Δι-δεοξυνουκλεοτίδια
dNTPs:	Δεοξυνουκλεοτίδια
Ecom:	Οι 37 απομονώσεις των <i>E. coli</i> που επιλέχθηκαν για MLST
Efa:	<i>Enterococcus faecalis</i>
Efm:	<i>Enterococcus faecium</i>
Entm:	Οι 28 απομονώσεις των <i>E. faecium</i> που επιλέχθηκαν για MLST
ESBLs:	Extended-spectrum β-lactamases
EUCAST:	European committee on antimicrobial susceptibility testing
ExPEC:	Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>
GN:	Γενταμικίνη
GN-R:	Πληθυσμός ανθεκτικός στο θεραπευτικό υπόστρωμα με γενταμικίνη
HLGN:	Γενταμικίνη υψηλής συγκέντρωσης
HLGN-R:	Πληθυσμός ανθεκτικός στο θεραπευτικό υπόστρωμα με γενταμικίνη υψηλής συγκέντρωσης
MA:	Φάρμα Α
MB:	Φάρμα Β



MC:	Φάρμα Γ
MDR:	Multidrug-resistant
MIC:	Minimum inhibitory concentration
MLEE:	Multi-locus enzyme electrophoresis
MLST:	Multi-locus sequence typing
MLVA:	Multi-locus variable-number tandem repeat analysis
MRSA:	Methycillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSP:	Methycillin resistant <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
MS <sub>TREE</sub> :	Minimal spanning tree
MT:	MLVA type
PCR:	Polymerase chain reaction
qDisk diffusion	Quantitative Disk diffusion
R:	Resistant
S:	Susceptible
SLV	Single locus variant
ST:	Sequence type
SXT:	Τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη
Total:	Ολικός πληθυσμός σε θεραπευτικό υπόστρωμα χωρίς αντιβιοτικά
UMC	University Medical Center Utrecht
UCC	University College Cork
VAN-R:	Πληθυσμός ανθεκτικός στο θεραπευτικό υπόστρωμα με βανκομυκίνη
VNTR:	Variable-number tandem repeat
VRE:	Vancomycin resistant <i>Enterococci</i>
W:	Τριμεθοπρίμη
X-gal:	X-γαλακτοσιδάση

## ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

AFLP	Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων
AST	Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά
Broilers	Κοτόπουλα κρεοπαραγωγής
ESBLs	β-λακταμάσες ευρέως φάσματος
ExPEC	Εξω-εντερικά παθογόνα <i>Escherichia coli</i>
MDR	Πολυ-ανθεκτικός
MIC	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
MLEE	Πολυ-τοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση
MLST	Πολυ-τοπική τυποποίηση αλληλουχιών
MLVA	Πολυ-τοπική ανάλυση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μεταβλητού αριθμού
MS <sub>TREE</sub>	Φυλογενετικό δέντρο ελάχιστης έκτασης
VNTR	Επαναλαμβανόμενη αλληλουχία μεταβλητού αριθμού

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ερευνητικό πεδίο της παρούσας εργασίας, αποτελεί η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Το συγκεκριμένο θέμα είναι μείζονος σημασίας και συγκεντρώνει το ερευνητικό ενδιαφέρον ολόενα και περισσότερων επιστημονικών ομάδων. Η αντιμικροβιακή αντοχή όπως αποκαλείται αλλιώς, εξελίσσεται σε σοβαρή απειλή της δημόσιας υγείας, με παγκόσμια εξάπλωση και ταχύτατη διάδοση. Η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική επιστήμη είναι η κύρια αιτία πρόκλησης του προβλήματος.

Βασικός πυλώνας της εργασίας είναι η επιδημιολογική καταγραφή της ανθεκτικότητας ανάμεσα σε δύο περιβαλλοντικά είδη βακτηρίων: *Escherichia coli* και *Enterococcus spp.* Τα είδη αυτά ονομάζονται και βακτήρια δείκτες γιατί αντικατοπτρίζουν την εικόνα της ανθεκτικότητας ανάμεσα σε άλλα παθογόνα είδη βακτηρίων. Ως δείγμα για την απομόνωση τους επιλέχθηκε το κρέας των πουλερικών από τρεις εγχώριες πτηνοτροφικές μονάδες. Η επιλογή του δείγματος προέκυψε μετά από μελέτη της τρέχουσας διεθνούς βιβλιογραφίας γύρω από την ανθεκτικότητα, όπου πολλές έρευνες υποστηρίζουν ότι τα πουλερικά είναι φορείς σημαντικού φορτίου ανθεκτικών μικροοργανισμών, και συμβάλλουν στη διάδοση της ανθεκτικότητας διαμέσου της τροφικής αλυσίδας.

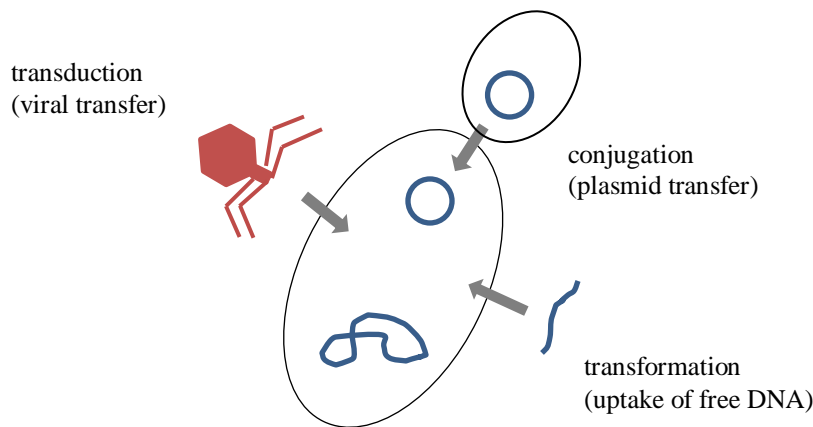
Σκοπός της εργασίας είναι να αναδείξει το πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής στην Κύπρο, με βάση ένα τρόφιμο ζωικής προέλευσης που θεωρείται εν δυνάμει φορέας της ανθεκτικότητας. Στόχος είναι η ευαισθητοποίηση του κοινού και των αρμόδιων αρχών για τη λήψη μέτρων προς την κατεύθυνση της αντιμετώπισης του προβλήματος.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Ανθεκτικότητα στο περιβάλλον

Η ανθεκτικότητα είναι όρος που περιγράφει την σχετική απευαισθητοποίηση ενός μικροοργανισμού σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό κάτω από ορισμένες συνθήκες. Εκφράζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού η οποία απαιτείται για την επίτευξη ενός καθορισμένου αποτελέσματος (π.χ. αναστολή ανάπτυξης) σε ένα πληθυσμό κυττάρων. Πολλοί μικροοργανισμοί είναι από τη φύση τους ανθεκτικοί σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό λόγω της δομής, φυσιολογίας ή βιοχημείας τους. Οι ευαίσθητοι μικροοργανισμοί μπορούν να γίνουν ανθεκτικοί μέσω μετάλλαξης ή ενσωμάτωσης της γενετικής πληροφορίας που κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα (Murray, 1997).

Η μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας ευνοείται από την παρουσία αντιβιοτικών γιατί η πίεση επιλογής γίνεται με στόχο την επιβίωση σε δυσμενές περιβάλλον (Davies and Davies, 2010). Η έκθεση των βακτηρίων στα αντιβιοτικά για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις, όπως για παράδειγμα η χρήση τους ως αυξητικοί παράγοντες ή η προληπτική χορήγηση στην πτηνοτροφία, εντείνει το ρυθμό επιλογής των ανθεκτικών στελεχών (Salyers, 2002). Τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα βρίσκονται είτε στο βακτηριακό χρωμόσωμα



**Εικόνα 1: Μηχανισμοί οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς μεταξύ βακτηρίων: μεταφορά πλασμιδίων (σύζευξη/conjugation), πρόσληψη ελεύθερου DNA (μετασηματισμός/transformation) και μεταφορά με φάγους ως φορείς (μεταγωγή/transduction).**

είτε σε εξω-χρωμοσωμικά πλασμίδια και μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά (κάθετη γονιδιακή μεταφορά). Γενετικά στοιχεία όπως τα πλασμίδια, μπορούν επίσης να ανταλλάγουν μεταξύ

βακτηρίων διαφορετικής ταξινόμικής προέλευσης (οριζόντια γονιδιακή μεταφορά). Η οριζόντια γονιδιακή μεταφορά μπορεί να επιτευχθεί μέσω α) σύζευξης με άμεση διακυτταρική επαφή, β) μεταγωγής με φάγους ως γονιδιακούς φορείς ή γ) μετασχηματισμού όπου ελεύθερο DNA μεταφέρεται εντός του βακτηριακού κυττάρου (Madigan *et al.*, 1997).

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται εκτενώς για την πρόληψη ή θεραπεία μικροβιακών λοιμώξεων στην ιατρική και την κτηνιατρική. «Δεξαμενές» όπως τα νοσοκομεία, οι κοινότητες και οι μονάδες εντατικής κτηνοτροφίας είναι οι κύριοι χώροι ανάπτυξης αντιμικροβιακής αντοχής (Kümmerer, 2004). Τα συζευκτικά βακτηριακά πλασμίδια είναι ο αποτελεσματικότερος τρόπος οριζόντιας διάδοσης γονιδίων και θεωρείται μια από τις κυριότερες αιτίες αύξησης του αριθμού των πολυανθεκτικών βακτηρίων. Η χρήση των αντιβιοτικών παρέχει την πίεση επιλογής η οποία διευκολύνει την διάδοση της ανθεκτικότητας μέσω του μηχανισμού της σύζευξης (Levy and Marshall, 2004). Η ανθεκτικότητα που αποκτάται μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς μπορεί να διαδοθεί ταχύτατα μέσα σε ένα βακτηριακό πληθυσμό είτε μέσω διασποράς συγκεκριμένων κλώνων είτε με συνεχή ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ κυττάρων που ανήκουν στα ίδια ή διαφορετικά ευαίσθητα στελέχη (D'Costa *et al.*, 2006). Η ενσωμάτωση γονιδίων ανθεκτικότητας είναι συχνή σε συστήματα όπου η πίεση επιλογής από τη χρήση αντιβιοτικών και η πυκνότητα των βακτηριακών κυττάρων είναι υψηλές, όπως για παράδειγμα ο γαστρεντερικός σωλήνας του ανθρώπου και των ζώων (Murray, 1997).

## **1.2. *Escherichia coli* και *Enterococcus spp* ως δείκτες της ανθεκτικότητας**

Τα είδη *Escherichia coli* και *Enterococcus spp* είναι βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων όπου δρουν συμβιωτικά (Tenailon *et al.*, 2010, Benyacoub *et al.*, 2003). Είναι γνωστό ότι γονίδια ανθεκτικότητας που επιλέγονται σε συμβιωτικά βακτήρια μπορούν στη συνέχεια να μεταφερθούν σε παθογόνα βακτηριακά είδη (Phillips *et al.*, 2004, Wassenaar, 2005). Συνεπώς, τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας μπορούν να διαδραματίσουν ρόλο κλειδί ως αποδέκτες και δότες της μικροβιακής αντοχής (Saenz *et al.*, 2004).

Ο λόγος που επιλέχθηκαν τα δύο αυτά βακτηριακά είδη στην παρούσα μελέτη, είναι ότι εκπροσωπούν τις δύο μεγάλες κατηγορίες βακτηρίων: τα Gram-αρνητικά και τα Gram-θετικά αντίστοιχα. Η λογική της παρακολούθησης των δύο αυτών συμβιωτικών βακτηρίων είναι ότι αποτελούν δεξαμενές κινητών γενετικών στοιχείων ανθεκτικότητας, που μπορούν να μεταφερθούν σε βακτήρια κλινικής σημασίας. Επιπλέον, ο επιπολασμός της ανθεκτικότητας ανάμεσα στα «βακτήρια δείκτες» θεωρείται ότι αντικατοπτρίζει το μέγεθος της πίεσης επιλογής από τη χρήση των αντιβιοτικών σε ένα πληθυσμό (van den Bogaard and Stobberingh, 2000).

### **1.3. *Escherichia coli* – κλινική σημασία**

Ο πληθυσμός των *E. coli* διαιρείται σε τέσσερις κύριες φυλογενετικές ομάδες που ορίστηκαν ως A, B1, B2 και D (Ochman and Selander, 1984, Herzer *et al.*, 1990). Οι τέσσερις αυτές ομάδες διαφέρουν ως προς τα φαινοτυπικά και γονοτυπικά τους χαρακτηριστικά (Selander *et al.*, 1987, Bergthorsson and Ochman, 1998). Τα παθογόνα εξω-εντερικά στελέχη (ExPEC) ανήκουν κυρίως στις ομάδες B2 και D, ενώ τα συμβιωτικά και λιγότερο παθογόνα στελέχη ανήκουν στις ομάδες A ή B1 (Boyd and Hartl, 1998, Picard *et al.*, 1999). Οι ομάδες αυτές αρχικά ανιχνεύτηκαν με τη χρήση multi locus enzyme electrophoresis (MLEE) και επαληθεύτηκαν μετέπειτα με multi locus sequence typing (MLST) (Herzer *et al.*, 1990, Maiden, 2006). Επιπλέον, η τυποποίηση με MLST, ανέδειξε συχνό ανασυνδυασμό μεταξύ στελεχών που προέρχονται από διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες, με αποτέλεσμα την ανάδυση υβριδικών ομάδων στον πληθυσμό των *E. coli* (AxB1 και ABD). Οι υβριδικές ομάδες AxB1 και ABD, συγκεντρώνουν περισσότερο παθογόνα στελέχη *E. coli* σε σχέση με τις κλασσικές ομάδες, καταδεικνύοντας έτσι μια σύνδεση μεταξύ παθογένειας και συχνότητας ομόλογου ανασυνδυασμού (Wirth *et al.*, 2006).

Τα ExPEC είναι υπεύθυνα για εντερικές ασθένειες, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, μηνιγγίτιδα στα νεογνά, πνευμονία, και βακτηριαμία. Η βακτηριαμία είναι η 10<sup>1</sup> κύρια αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες και το *E. coli* είναι ο συχνότερος αιτιολογικός παράγοντας (Kaper 2005, Jaureguy *et al.*, 2008). Έχει αποδειχθεί ότι τα ExPEC στελέχη συχνά φέρουν μεγάλα κινητά πλασμίδια πολυανθεκτικότητας (multi-drug resistant - MDR) (Johnson and Nolan, 2009). Εφόσον τα ExPEC στελέχη θεωρείται ότι αναδύονται από

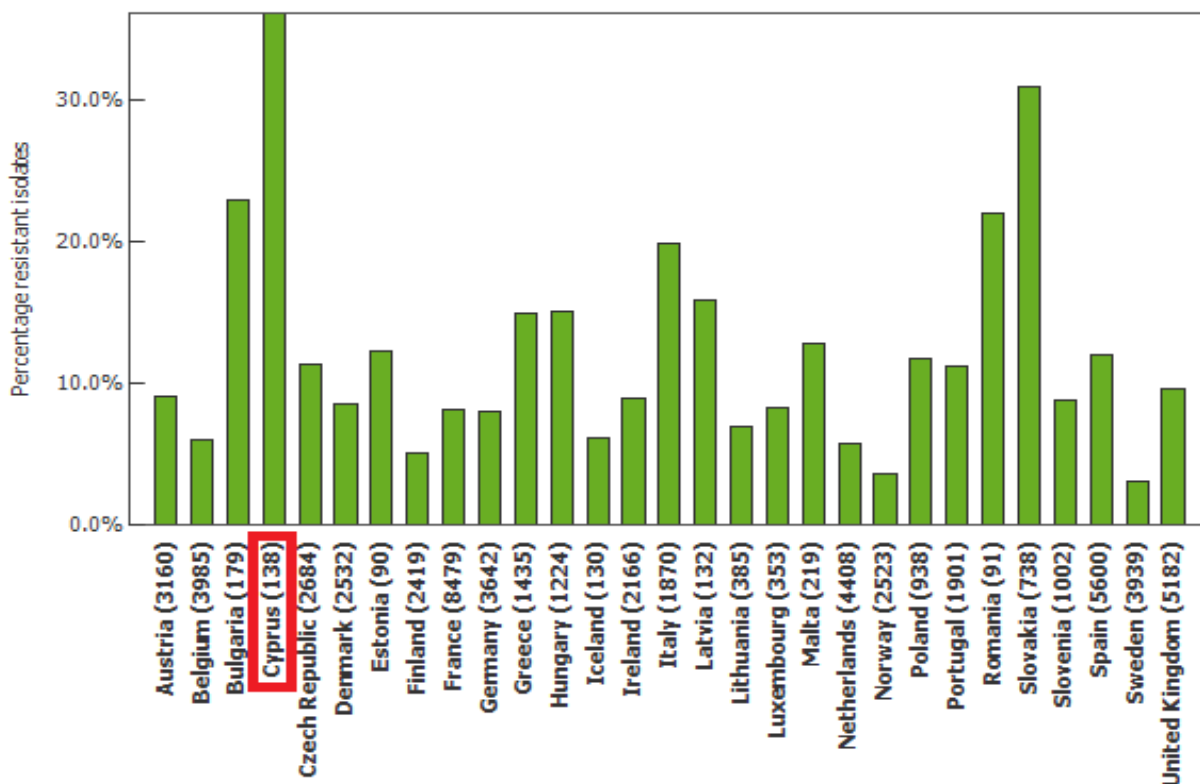
την εντερική μικροχλωρίδα υγιών ξενιστών, είναι λογικό ότι ορισμένα συμβιωτικά *E. coli* φέρουν επίσης κινητά πλασμίδια που αποδίδουν MDR φαινότυπο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν τα παθογόνα στελέχη των πτηνών (APEC) γιατί αφενός προκαλούν κολιβακίλλωση στα πτηνά με σημαντικές οικονομικές απώλειες για την πτηνοτροφία και αφετέρου επειδή συνδέονται με τα ExPEC στελέχη του ανθρώπου (Ewers *et al.*, 2007, Johnson *et al.*, 2007).

Η μικροβιακή αντοχή στα συμβιωτικά και παθογόνα *E. coli* εγείρει παγκόσμιες ανησυχίες όχι μόνο στην κτηνιατρική και την ιατρική, αλλά και στην ασφάλεια των τροφίμων (EFSA, 2010a). Η μεταφορά ανθεκτικών στελεχών *E. coli* από τα κοτόπουλα στην τροφική αλυσίδα είναι ένα καλά γνωστό φαινόμενο (Seza and Ayla, 2011). Λόγω της έντονης χρήσης αντιβιοτικών στη ζωική παραγωγή και δη στην πτηνοτροφία, το κρέας των πουλερικών επιμολύνεται συχνά από ανθεκτικά στελέχη *E. coli* κατά τη διαδικασία της σφαγής, με την επαφή με το περιεχόμενο του εντερικού σωλήνα. Οι άνθρωποι μπορούν να αποικιστούν με *E. coli* ζωικής προέλευσης, και εξαιτίας της ανθεκτικότητας τους σε αντιβιοτικά συχνής χρήσης, τα στελέχη αυτά μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις για τις οποίες οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες (Hammerum and Heuer, 2009). Τα συμβιωτικά βακτήρια (*E. coli*, *Enterococci*) ζωικής προέλευσης τα οποία φέρουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που θεωρούνται κρίσιμα στη θεραπευτική του ανθρώπου (π.χ. αμινογλυκοσίδες, φλουοροκινολόνες, κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> γενιάς), είναι εξαιρετικού ενδιαφέροντος για τη δημόσια υγεία (WHO 2007).

#### **1.4. Οι β-λακταμάσες ευρέος φάσματος - ESBLs**

Την τελευταία δεκαετία η ανθεκτικότητα στα *Enterobacteriaceae* έχει αυξηθεί δραματικά παγκόσμια (εικόνα 2). Η αύξηση αυτή έχει προκληθεί κυρίως λόγω της αύξησης του επιπολασμού των *Enterobacteriaceae* που παράγουν β-λακταμάσες ευρέος φάσματος (extended-spectrum β-lactamases-ESBLs) (Canton *et al.*, 2008). Η παραγωγή των ESBLs είναι η κύρια αιτία ανθεκτικότητας των Gram-αρνητικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά της β-λακτάμης. Η ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες εκδηλώνεται με τρεις κύριους μηχανισμούς: α) ενζυμική αποδόμηση - απενεργοποίηση του φαρμάκου, β) τροποποίηση του στόχου από το βακτηριακό κύτταρο έτσι ώστε να μην αναγνωρίζεται από το αντιβιοτικό και γ) μείωση της διαπερατότητας

του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η είσοδος του αντιβιοτικού. Τα ESBLs προσδίδουν ανθεκτικότητα στα Gram-αρνητικά βακτήρια μέσω ενζυμικής αποδόμησης του δακτυλίου της β-λακτάμης, καθιστώντας τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αδρανή (Coque *et al.*, 2008). Τα ένζυμα αυτά, κωδικοποιούνται από πλασμιδιακά γονίδια τα οποία μπορούν εύκολα να μεταφερθούν μεταξύ βακτηρίων του ίδιου ή διαφορετικού είδους και είναι η κυρίαρχη αιτία εξάπλωσης της ανθεκτικότητας των Gram-αρνητικών βακτηρίων στις κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> γενιάς (Bonnet, 2004).



Εικόνα 2: Ποσοστά ανθεκτικών απομονώσεων *E. coli* σε κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> γενιάς από νοσηλευτικά ιδρύματα σε χώρες της Ευρώπης το 2011

Πηγή: <http://EARS-Net/database>

#### 1.4.1. Ομάδες των ESBLs

Τα ESBLs προέρχονται από ένζυμα με στενότερο φάσμα δράσης όπως τα πολύ διαδεδομένα TEM-1, SHV-1 και OXA-1 τα οποία προσδίδουν ανθεκτικότητα στις αμινοπενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες 1<sup>ης</sup> γενιάς (Gniadkowski, 2001) Μεταλλάξεις αντικατάστασης ή ένθεσης στα



γονίδια που κωδικοποιούν τα TEM και SHV, οδηγούν σε επέκταση του φάσματος δράσης σε περισσότερα υποστρώματα (οξυαμινο-κεφαλοσπορίνες και μονοβακτάμες) καθώς και σε αυξημένο ρυθμό διάσπασης τους. Ο αριθμός των γνωστών ενζύμων των οικογενειών TEM και SHV αυξάνεται συνεχώς (Jacoby and Munoz-Price, 2005). Την περασμένη δεκαετία, μετά και την εισαγωγή των κεφαλοσπορινών 3<sup>ης</sup> γενιάς στην ιατρική και την κτηνιατρική, αναδύθηκε μια νέα ομάδα ESBLs, τα ένζυμα CTX-M (cefotaximases). Παρόλο που τα CTX-M κωδικοποιούνται από πλασμιδιακά γονίδια στα *E. coli*, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι προήλθαν από το χρωμόσωμα του άφθονου στη φύση Gram-αρνητικού βακτηρίου *Kluyvera ascorbata* (Rodriguez *et al.*, 2004). Η οικογένεια των CTX-M υποδιαιρείται με βάση φυλογενετικές μελέτες της αμινοξικής αλληλουχίας τους σε πέντε κύριες ομάδες: τα ένζυμα της ομάδας CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 και CTX-M-25. Όλα έχουν σαν κοινό χαρακτηριστικό την υδρόλυση της κεφοταξίμης και ορισμένα της κεφεπίμης (κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> γενιάς αντίστοιχα) καθώς και το γεγονός ότι η δράση τους αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ (αναστολέας των β-λακταμασών) (Bonnet, 2004).

Εκτός από τις παραπάνω ομάδες ESBLs οι οποίες εδράζονται σε πλασμίδια, υπάρχει και μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που κωδικοποιούνται από το χρωμόσωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων, οι τύπου Amp-C β-λακταμάσες. Οι Amp-C β-λακταμάσες έχουν ευρύτερο φάσμα δράσης που περιλαμβάνει και τις κεφαμυκίνες και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Επομένως, οι θεραπευτικές επιλογές σε λοιμώξεις από μικροοργανισμούς που παράγουν ESBLs ή/και AmpC είναι περιορισμένες (Philippon *et al.*, 2002).

#### **1.4.2. Επιδημιολογία των ESBLs**

Την δεκαετία του '90 οι περισσότερες αναφορές σε γονίδια ESBL αφορούσαν τους τύπους TEM και SHV που σχετίζονταν με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Ωστόσο, η πρόσφατη παγκόσμια αύξηση των ESBLs οφείλεται κυρίως στα CTX-M γονίδια τα οποία φαίνεται να κινητοποιούνται από περιβαλλοντικά-εξωνοσοκομειακά βακτήρια (Hawkey and Jones, 2009). Το φορτίο του εντερικού περιεχομένου των ζώων σε γονίδια ESBL, έχει ταυτοποιηθεί ως σημαντική δεξαμενή τους στο περιβάλλον (Smet *et al.*, 2008). Επειδή τα βακτηριακά είδη που μεταφέρουν γονίδια

ESBL είναι μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας της πεπτικής οδού, τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης είναι μια πιθανή πηγή τους για τον άνθρωπο (Machado et al., 2008, DuPont, 2007).

Η παρουσία γονιδίων ESBL έχει καταγραφεί επανειλημμένα στα παραγωγικά ζώα και ιδιαίτερα στα πουλερικά. Η ανθεκτικότητα στα ζώα έχει προκληθεί κυρίως εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας αντιβιοτικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη ζωική παραγωγή (Overdevest *et al.*, 2011). Ανησυχία προκαλεί η αυξανόμενη παρουσία γονιδίων ESBL στο κρέας, με το υψηλότερο ποσοστό να καταγράφεται στο κρέας των πουλερικών (Seza and Ayla, 2010). Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ βακτηρίων που αποικίζουν τα ζώα και αυτών που αποικίζουν τους ανθρώπους έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Lester *et al.*, 2006, Mulvey *et al.*, 2008, Smet *et al.*, 2010, Johnson *et al.*, 2012). Συνεπώς, ο χειρισμός κρέατος επιμολυσμένου με βακτήρια που παράγουν ESBL αποτελεί ορατό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Συγκεκριμένα, επαγγελματίες που σχετίζονται με την πτηνοτροφία (πτηνοτρόφοι, κτηνίατροι) και την επεξεργασία του κρέατος (σφαγείς, μεταποιητές), διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο (Castillo Neyra *et al.*, 2012).

#### **1.4.3. Συν-επιλογή της ανθεκτικότητας στις κεφαλοσπορίνες από άλλες ομάδες αντιβιοτικών στα *Enterobacteriaceae*: ο ρόλος των κινολόνων**

Τα *E. coli* που παράγουν ESBLs ή/και AmpC συχνά είναι ανθεκτικά και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα γονίδια που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα στα μη κεφαλοσπορινούχα αντιβιοτικά, συνδέονται στο ίδιο πλασμίδιο ή κινητό γενετικό στοιχείο στο οποίο κωδικοποιούνται και τα ESBLs (Canton and Coque, 2006). Παραδείγματα συν-ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες και σουλφοναμίδες αναφέρονται συχνά σε απομονώσεις *Enterobacteriaceae* από ζώα (Blanc *et al.*, 2006, B Li *et al.*, 2007, Kazuki and Tetsuo, 2010). Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί η σύνδεση μεταξύ γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα CTX-M ή AmpC με πλασμίδια που κωδικοποιούν ανθεκτικότητα στις φλουοροκινολόνες, δεδομένου ότι οι τελευταίες χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην κτηνιατρική και την ιατρική (Robicsek *et al.*, 2006, Thorsteinsdottir *et al.*, 2010). Οι (φλουορο)κινολόνες είναι μια πλήρως συνθετική βακτηριοκτόνος ομάδα αντιβιοτικών ουσιών, εξαιρετικά πολύτιμη στην αντιμετώπιση λοιμώξεων από ανθεκτικά Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια

(Collignon *et al.*, 2009). Το 1998 αναφέρθηκε για πρώτη φορά πλασμιδιακά επαγόμενη ανθεκτικότητα στις κινολόνες (plasmid-mediated quinolone resistance – PMQR), σε ένα κλινικό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). Το πλασμίδιο pMG252 της συγκεκριμένης απομόνωσης, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που προστατεύει το βακτηριακό DNA από τη δράση των κινολόνων (Tran and Jacoby, 2002), και το υπεύθυνο γονίδιο ονομάστηκε *qnrA* (quinolone resistance). Από τότε μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί διεθνώς πολυάριθμα παράγωγα *qnr*, σε διάφορα πλασμίδια από *Enterobacteriaceae* στους ανθρώπους και τα ζώα (Rodríguez-Martinez *et al.*, 2011). Πολλά γονίδια β-λακταμασών (π.χ. *bla<sub>CTX-M</sub>* και *ampC*), σχετίζονται με *qnr*-θετικά πλασμίδια τα οποία μεταδίδονται με μηχανισμούς οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Οι Mammeri *et al.* απέδειξαν το 2005 ότι ένα συζευκτικό πλασμίδιο μετέφερε μια γενετική κασέττα που απέδιδε ανθεκτικότητα στις κινολόνες, τις β-λακτάμες, τις αμινογλυκοσίδες, τις σουλφοναμίδες, την τριμεθοπρίμη και την χλωραμφενικόλη. Σήμερα οι ερευνητές είναι πεπεισμένοι για την τεράστια σημασία της PMQR στα φαινόμενα συνανθεκτικότητας και πολλές μελέτες το καταδεικνύουν (Poirel *et al.*, 2012, Strahilevitz *et al.*, 2009), ενώ η έρευνα στα PMQR επεκτείνεται ραγδαία.

Οι κινολόνες (διφλοξασίνη) και τα μακρολίδια (τυλβαζολίνη) είναι οι μόνες ομάδες αντιβιοτικών που είναι επίσημα εγκεκριμένες από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency - EMA) για χρήση στα κοτόπουλα (<http://www.ema.europa.eu>). Ωστόσο, η ανθεκτικότητα στις κεφαλοσπορίνες έχει καταγραφεί σε πτηνοτροφικά συστήματα πολλών ευρωπαϊκών χωρών όπου δεν επιτρέπεται η χρήση τους. Επομένως, η συν-επιλογή της ανθεκτικότητας στις κεφαλοσπορίνες από άλλα αντιβιοτικά (π.χ κινολόνες), φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην διάδοση πολυ-ανθεκτικών στελεχών, με όλους τους κινδύνους που απορρέουν για τη θεραπευτική των ζώων και του ανθρώπου (Greco *et al.*, 2009).

## **1.5. *Enterococcus spp* – κλινική σημασία**

Οι εντερόκοκκοι είναι Gram-θετικά προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που αποικούν τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων (Murray, 1990). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι συμβιωτικά μη παθογόνα βακτήρια που θεωρείται ότι έχουν και ευεργετική επίδραση σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού (Franz *et al.*, 2011, Benyacoub *et al.*, 2003).

Τα τελευταία χρόνια όμως αναγνωρίζονται ως σημαντικά ευκαιριακά παθογόνα, που προκαλούν κυρίως νοσοκομειακές λοιμώξεις με ποικιλία κλινικών συνδρόμων όπως μηνιγγίτιδα, βακτηριαμία, ενδοκαρδίτιδα, περιτονίτιδα και λοιμώξεις του ουροποιητικού (Fisher and Phillips, 2009). Τα πιο σημαντικά είδη από κλινικής άποψης είναι ο *E. faecalis* και ο *E. faecium*, οι οποίοι αποτελούν τον τρίτο κατά σειρά αιτιολογικό παράγοντα νοσοκομειακών λοιμώξεων σε μονάδες εντατικής θεραπείας στις Η.Π.Α (Werner et al., 2008, CDC, 2001). Παρόλο που ο *E. faecalis* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για τις περισσότερες εντεροκοκκικές λοιμώξεις, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια τάση αντικατάστασης του *E. faecalis* από τον *E. faecium* (Damborg et al., 2009, Iwen et al., 1997). Η επικράτηση του *E. faecium* έναντι του *E. faecalis* σε ένα πληθυσμό, συνδέεται με αλλαγές στη χρήση των αντιβιοτικών και φαίνεται να ευνοείται ιδιαίτερα όταν υπάρχει πίεση επιλογής από αμπικιλίνη (Willems et al., 2005, Willems and Schaick, 2010). Η αμπικιλίνη είναι πολύτιμη θεραπευτική ουσία στις εντεροκοκκικές λοιμώξεις, σε αντίθεση με τα *Enterobacteriaceae* όπου θεωρείται αχρηστευμένο αντιβιοτικό (Klare et al., 2003). Η αύξηση της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη ανάμεσα στον πληθυσμό του *E. faecium* είναι ένα άκρως ανησυχητικό φαινόμενο (Fontana et al., 1994).

Οι εντερόκοκκοι είναι ανθεκτικοί σε ποικιλία αντιβιοτικών και η ανθεκτικότητα αυτή μπορεί να είναι εγγενής ή επίκτητη (Murray, 1990). Ιδιαίτερη σημασία έχει η εγγενής ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων στις αμινογλυκοσίδες χαμηλής συγκέντρωσης, που οφείλεται στην έλλειψη ενός ενζύμου υπεύθυνου για την ενεργειακή πρόσληψη των αμινογλυκοσιδών ενδοκυτταρικά (Rice and Bonomo, 1996). Ωστόσο, αυτή η χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα, παρακάμπτεται με συνδυασμένη θεραπεία αμινογλυκοσίδης με αμπικιλίνη. Σε περιπτώσεις όμως ανθεκτικότητας του εντεροκοκκικού στελέχους στην αμπικιλίνη ή/και επίκτητης ανθεκτικότητας σε αμινογλυκοσίδες υψηλής συγκέντρωσης, ο συνεργικός μηχανισμός παύει να λειτουργεί (Klare et al., 2003).

Ο *E. faecium* συγκεντρώνει μεγαλύτερη σημασία λόγω της συχνής ανθεκτικότητας που παρουσιάζει στα αντιβιοτικά (French, 1998). Η πλειοψηφία των κλινικών απομονώσεων του *E. faecium* φέρουν το γονίδιο *esp* (enterococcal surface protein) το οποίο κωδικοποιεί μια εντεροκοκκική πρωτεΐνη επιφανείας που σχετίζεται με την ικανότητα σχηματισμού βιοφιλμ πάνω σε αβιοτικές επιφάνειες (Eaton and Gasson, 2002). Συνεπώς, θεωρείται ότι η παρουσία του έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των λοιμώξεων από *E. faecium*. Επιπλέον, έχει

καταγραφεί υψηλή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του γονιδίου *esp* και νοσοκομειακών επιδημιών από ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη *E. faecium* (Willems *et al.*, 2001, Leavis *et al.*, 2003, van der Steen *et al.*, 2000). Η χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές ήταν μια κοινή και διαδεδομένη πρακτική για αρκετά χρόνια στην Ευρώπη. Γλυκοπεπτίδια όπως η αβοπαρυκίνη, χρησιμοποιούνταν για το σκοπό αυτό στην κτηνοτροφία, ενώ παράλληλα άλλα παράγωγα γλυκοπεπτιδίων όπως η βανκομυκίνη χρησιμοποιούνται ως φάρμακα έσχατης λύσης για τη θεραπεία εντεροκοκκικών λοιμώξεων στον άνθρωπο που δεν αντιμετωπίζονται με κοινά αντιβιοτικά. Η αβοπαρυκίνη προσδίδει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με την βανκομυκίνη, και η ανεξέλεγκτη χρήση της στην ζωική παραγωγή είχε ως αποτέλεσμα την ανάδυση ανθεκτικών στη βανκομυκίνη στελεχών *enterococci*: τα γνωστά VRE - Vancomycin Resistant *Enterococcus* spp (Klare *et al.*, 2003). Η χρήση της αβοπαρυκίνης στην Ευρώπη απαγορεύτηκε το 1997 (van den Bogaard *et al.*, 2000). Ωστόσο, χρόνια μετά την διακοπή της χρήσης της συνεχίζουν να απομονώνονται VRE από ζώα σε χώρες στις οποίες χρησιμοποιούσαν αβοπαρυκίνη στο παρελθόν (Jung *et al.*, 2007, Nilsson, 2012). Η πιθανότητα ο εντερικός σωλήνας των ζώων να συνιστά δεξαμενή ανθεκτικών στελεχών εντεροκόκκων που μπορούν δυνητικά να μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας, είναι ένα ερώτημα που εγείρει ανησυχίες και απασχολεί τους ερευνητές (Dogru *et al.*, 2010, Koluman *et al.*, 2009).

Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αντοχή σε δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος (υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, ακραίες τιμές pH και αλατότητας) γεγονός που εξηγεί την ικανότητα τους να αποικίζουν ποικίλους οικολογικούς θώκους και να διασπείρονται στην τροφική αλυσίδα μέσω μολυσμένων ζώων και τροφών (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Η τροφική αλυσίδα έχει αναγνωριστεί ως πηγή ανθεκτικών στα αντιβιοτικά εντερόκοκκων. Πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει την αντιμικροβιακή αντοχή των εντερόκοκκων (Aslam *et al.*, 2012, Dogru *et al.*, 2010, Rizzoti *et al.*, 2005, Busani *et al.*, 2004), λόγω του κινδύνου μεταφοράς ανθεκτικών στελεχών στον άνθρωπο μέσω μολυσμένου κρέατος. Πράγματι, η κατανάλωση κρέατος επιμολυσμένου με ανθεκτικούς βακτηριακούς πληθυσμούς είναι μια πιθανή οδός μεταφοράς από τα ζώα στον άνθρωπο και μπορεί να οδηγήσει είτε σε αποικισμό του πεπτικού συστήματος από τα ίδια τα ανθεκτικά στελέχη είτε στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας στα στελέχη της φυσιολογικής χλωρίδας του ξενιστή (Sparo *et al.*, 2012, Lester *et al.*, 2006).

Η παρουσία των εντερόκοκκων στο πεπτικό σύστημα των ζώων οδηγεί σε υψηλές πιθανότητες επιμόλυνσης του κρέατος κατά τη διαδικασία της σφαγής (Franz et al., 2003). Συνεπώς οι εντερόκοκκοι χρησιμοποιούνται και ως δείκτες επιμόλυνσης με κόπρανα. Δεν επιμολύνουν μόνο νωπό κρέας αλλά έχουν συσχετιστεί και με επεξεργασμένο ή θερμικά κατεργασμένο κρέας (Foulquié-Moreno et al., 2006). Η θέρμανση του επεξεργασμένου κρέατος κατά τη διαδικασία παραγωγής μπορεί να προσδώσει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στους εντερόκοκκους, καθώς είναι ανάμεσα στα πιο θερμοάντοχα μη σποριογόνα βακτήρια (Bradley and Fraise, 1996). Οι εντερόκοκκοι έχουν απομονωθεί από επιδημίες διατροφικών λοιμώξεων και τα κοτόπουλα έχουν αναφερθεί ως σημαντικός φορέας (Radu et al., 2001, Gambarotto et al., 2001). Συγκεκριμένα, τα πουλερικά παρουσιάζουν αυξανόμενη συσχέτιση με τη μεταφορά πολυ-ανθεκτικών στελεχών εντερόκοκκων (Joseph et al., 2001). Η συνάθροιση όλων των πιο πάνω δεδομένων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είναι επιτακτική η ανάγκη παρακολούθησης και αξιολόγησης της ανθεκτικότητας των πληθυσμών των *Enterococcus* spp που απομονώνονται στο κρέας και ιδιαίτερα στο κρέας των πουλερικών.

## **1.6. Ερευνητικοί στόχοι**

Μέχρι στιγμής ο χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής αντοχής και η μελέτη της επιδημιολογίας της Κύπρου παρεμποδίζεται από ορισμένα μείζονα ζητήματα. Πρώτον υπάρχει ανεπάρκεια δεδομένων από τις κύριες δεξαμενές (νοσοκομεία, κοινότητες, κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις) καθώς επίσης και από τις πιθανές οδούς μετάδοσης της αντιμικροβιακής αντοχής (π.χ. τρόφιμα ζωικής προέλευσης). Άλλο εμπόδιο είναι η απόλυτη απουσία μοριακού χαρακτηρισμού των βακτηριακών πληθυσμών που αποικίζουν τις διάφορες δεξαμενές και τους ξενιστές μεταφοράς της ανθεκτικότητας. Τέτοια μοριακά δεδομένα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα καθώς παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την γενετική δομή των βακτηριακών πληθυσμών και κατ'επέκταση για την πιθανή συμπεριφορά και προέλευση τους (π.χ. νοσοκομειακά, περιβαλλοντικά, σχετιζόμενα με την ζωική παραγωγή). Η ελλειπής τοπική επιδημιολογία δυσχεραίνει την επιτακτική ανάγκη για καθιέρωση και εφαρμογή ενιαίας εθνικής στρατηγικής για την χρήση των αντιβιοτικών. Ως αποτέλεσμα, συνεχίζεται απρόσκοπτα η διάδοση της ανθεκτικότητας με κίνδυνο την «αχρήστευση» ολοένα και περισσότερων αντιβιοτικών και την εμφάνιση επιδημιών με εξαιρετικά περιορισμένη έως ανύπαρκτη θεραπευτική αντιμετώπιση. Συνεπώς αναδύεται η

ανάγκη για έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση, σε μια προσπάθεια παρακολούθησης της επιδημιολογίας της αντιμικροβιακής αντοχής στην Κύπρο.

## 1.7. Σχεδιασμός του πειράματος

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι να χαρακτηρίσει τους πληθυσμούς *E. coli* και *Enterococcus* spp που απομονώνονται στο κρέας των κοτόπουλων κρεοπαραγωγής της Κύπρου. Ο χαρακτηρισμός περιλαμβάνει την ποσοτικοποίηση των ολικών πληθυσμών των βακτηρίων, των ανθεκτικών πληθυσμών στα επιμέρους αντιβιοτικά, καθώς και τον μοριακό χαρακτηρισμό των απομονώσεων. Οι απομονώσεις θα εξεταστούν ως προς την ανθεκτικότητα τους σε αντιβιοτικά που θεωρούνται πρώτης γραμμής ή/και κρίσιμα στην ιατρική και την κτηνιατρική όπως οι β-λακτάμες, οι κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> γενιάς, οι σουλφοναμίδες, οι αμινογλυκοσίδες και τα γλυκοπεπτίδια. Η ποσοτικοποίηση θα γίνει με κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους σε τρυβλία με θρεπτικά υποστρώματα χωρίς αντιβιοτικά για την καταμέτρηση των ολικών πληθυσμών, καθώς και σε θρεπτικά υποστρώματα με προσθήκη αντιβιοτικών στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, για την επιλογή των ανθεκτικών πληθυσμών. Η επιλογή των *E. coli* θα γίνει σε τρυβλία με αμπικιλίνη, κεφοταξίμη και γενταμυκίνη ενώ η επιλογή των enterococci σε τρυβλία με αμπικιλίνη, γενταμυκίνη υψηλής συγκέντρωσης (ορίζεται στο 2.2.) και βανκομυκίνη. Ο σκοπός της καλλιέργειας σε τρυβλία με αντιβιοτικά, είναι η προεπιλογή ανθεκτικών στελεχών, σε αντιβιοτικές ουσίες που θεωρούνται πρώτης γραμμής για το κάθε είδος. Στη συνέχεια οι απομονώσεις από τα διάφορα υποστρώματα θα εξεταστούν για την ευαισθησία τους με τη χρήση αντιβιοτικών δισκίων διάχυσης. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των *E. coli* περιλαμβάνει την κατάταξη τους στις τέσσερις κύριες φυλογενετικές ομάδες (A, B1, B2, D) και την ανίχνευση διαφόρων ομάδων ESBLs. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των enterococci περιλαμβάνει την ταυτοποίηση του είδους (*E. faecium* ή *E. faecalis*), την ανίχνευση του γονιδίου *esp* και την πραγματοποίηση multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) για την μοριακή τυποποίηση των απομονώσεων. Το πειραματικό μέρος θα ολοκληρωθεί με multi-locus sequence typing (MLST) σε ένα αριθμό αντιπροσωπευτικών απομονώσεων από κάθε βακτηριακό είδος. Το MLST θα πραγματοποιηθεί για τους εξής λόγους: α) για να επαληθευτεί ο διαχωρισμός των απομονώσεων των *E. coli* στις φυλογενετικές ομάδες β) για να επιβεβαιωθεί η γενετική

συσχέτιση των τύπων MLVA των *Enterococcus* spp γ) για να αποδειχθεί ότι τα ανθεκτικά στελέχη που απομονώνονται στο κρέας προέρχονται από επιμόλυνση του σφάγιου από το εντερικό περιεχόμενο των πτηνών κατά τη διαδικασία της σφαγής και όχι από μεταγενέστερους χειρισμούς (θα γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων με ήδη υπάρχουσες βάσεις δεδομένων MLST σχετικά με την προέλευση των απομονώσεων) και δ) για τη διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ φαινότυπων ανθεκτικότητας με άλλα χαρακτηριστικά (π.χ. φυλογενετική ομάδα, τύπος αλληλουχίας - ST).

Έγινε η υπόθεση ότι το κρέας των πουλερικών της Κύπρου φέρει σημαντικούς πληθυσμούς ανθεκτικών στελεχών *E. coli* και *Enterococcus* spp δεδομένης και της εντατικής μορφής των συστημάτων εκτροφής. Θεωρείται ότι η πίεση από τα αντιβιοτικά στην εντατική πτηνοτροφία, ευνοεί την επιλογή και επικράτηση των ανθεκτικών στελεχών στο πεπτικό σύστημα των πτηνών, με αποτέλεσμα να υπάρχει αυξημένος κίνδυνος επιμόλυνσης του κρέατος από την επαφή με το εντερικό περιεχόμενο κατά τη διαδικασία της σφαγής. Τέλος, τέθηκε το ερώτημα αν οι ενδεχόμενες διαφορές ως προς τη στρατηγική χρήσης των αντιβιοτικών σε κάθε πτηνοτροφική μονάδα, συμβάλλουν στη διαμόρφωση της τοπικής επιδημιολογίας των μικροοργανισμών και της επικράτησης συγκεκριμένων κλώνων.



## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1. Συλλογή του δείγματος

Έγιναν τρεις δειγματοληψίες την περίοδο Ιουνίου-Ιουλίου 2012. Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν τρία νωπά κοτόπουλα της ίδιας ημερομηνίας σφαγής και της ίδιας εκτροφής, συσκευασμένα και διατηρημένα σε συνθήκες 0-4<sup>0</sup>C σε σημεία λιανικής πώλησης. Τα δείγματα επιλέχθηκαν τυχαία από τρεις διαφορετικές εκτροφές εντατικής πτηνοτροφίας, πτηνών κρεοπαραγωγής (broilers). Έγινε άμεση μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο υπό συνθήκες ψύξης και ελεγχόμενης θερμοκρασίας και τα δείγματα επεξεργάστηκαν εντός τριών ωρών από την ώρα της συλλογής τους.

### 2.2. Απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση

Από κάθε δείγμα λήφθηκαν ασηπτικά 50 gr δέρματος από ολόκληρο το ημιμόριο του σώματος του πτηνού και τοποθετήθηκαν σε στείρες σακούλες πολυαιθυλενίου για Stomacher®. Προστέθηκαν 200 ml φυσιολογικού διαλύματος πεπτόνης (MRD – Maximum Recovery Diluent) (Oxoid, CM0733) και έγινε ομογενοποίηση στο Stomacher® για 1,5 λεπτό με 230 παλμούς ανά λεπτό. Το ομογενοποιημένο υλικό αποτέλεσε την 1<sup>η</sup> αραιώση (1:5). Ακολούθησαν δύο δεκαδικές αραιώσεις της αρχικής που αποτέλεσαν τη 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> αραιώση.

Για την απομόνωση των *E. coli* ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

A) Για τον ολικό πληθυσμό τα δείγματα επώαστηκαν σε υπόστρωμα χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ευαίσθητο στα αντιβιοτικά στέλεχος του *E. coli* ATCC 25922 και ως αρνητικός μάρτυρας το στέλεχος ATCC 29212 του *Enterococcus faecalis*.

B) Για την επιλογή των ανθεκτικών στην αμπικιλίνη στελεχών έγινε επώαση σε υπόστρωμα με αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 16mg/L.

Γ) Για την επιλογή των ανθεκτικών στην κεφοταξίμη στελεχών έγινε επώαση σε υπόστρωμα με κεφοταξίμη σε συγκέντρωση 2mg/L.

Δ) Για την επιλογή των ανθεκτικών στη γενταμυκίνη στελεχών έγινε επώαση σε υπόστρωμα με γενταμυκίνη σε συγκέντρωση 8mg/L.

Για τα Β-Γ-Δ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ανθεκτικό στέλεχος Δ97 του *E. coli* και ως αρνητικός μάρτυρας το στέλεχος ATCC 25922. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 30<sup>0</sup>C για 6 ώρες και ακολούθως στους 44<sup>0</sup>C για 18 ώρες.

Για την απομόνωση των *Enterococci* ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Α) Για τον ολικό πληθυσμό τα δείγματα επώαστηκαν σε υπόστρωμα χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ευαίσθητο στέλεχος ATCC 29212 του *Enterococcus faecalis* και ως αρνητικός μάρτυρας το στέλεχος του *E. coli* ATCC 25922.

Β) Για την επιλογή των ανθεκτικών στην αμπικιλίνη στελεχών έγινε επώαση σε υπόστρωμα με αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 16mg/L. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Δ93 του *Enterococcus faecium*

Γ) Για την επιλογή των ανθεκτικών στη γενταμυκίνη στελεχών έγινε επώαση σε υπόστρωμα με γενταμυκίνη σε συγκέντρωση 200mg/L (γενταμυκίνη υψηλής συγκέντρωσης - HLGN). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Δ91 του *Enterococcus faecium*

Δ) Για την επιλογή των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη στελεχών έγινε επώαση σε υπόστρωμα με βανκομυκίνη σε συγκέντρωση 8mg/L. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Δ94 του *Enterococcus faecium*. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε και στις τρεις περιπτώσεις το στέλεχος ATCC 29212 του *Enterococcus faecalis*.

Τα δείγματα επώαστηκαν στους 30<sup>0</sup>C για 6 ώρες και στους 44<sup>0</sup>C για 42 ώρες.

Όλα τα Δx στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ήταν ευγενική παραχώρηση της Δρ. Μαρίας Αλεξάνδρου, Μικροβιολόγου του Γενικού Νοσοκομείου Λεμεσού. Πρόκειται για στελέχη που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος από νοσηλευόμενους ασθενείς, τα οποία είναι πλήρως χαρακτηρισμένα βιοχημικά και φαινοτυπικά.

Σε όλες τις περιπτώσεις έγιναν δύο επαναλήψεις από κάθε αραιώση. Ο όγκος ενοφθαλμισμού ήταν 100 μl και η επίστρωση έγινε με τη μέθοδο plating σε τρυβλία Petri 90 mm x 15 mm.

Για την απομόνωση των *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το χρωμογόνο υπόστρωμα HiCrome (HiMedia, M12951-500G) ενώ για τους *Enterococci* το υπόστρωμα Slanetz and Bartley (HiMedia, M612-500G). Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που προστέθηκαν κατά περίπτωση στα υποστρώματα, έγιναν με βάση τα επιδημιολογικά σημεία καμπής (breakpoints) του European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Στην καταμέτρηση συμπεριλήφθηκαν όσα τρυβλία είχαν μεταξύ 5-150 αποικίες, άρα με βάση τις αραιώσεις που προηγήθηκαν, το όριο ανίχνευσης ήταν 250 cfu/ml. Στην καταμέτρηση των *E. coli* λήφθηκαν υπόψη μόνο όσες αποικίες είχαν χαρακτηριστικό μπλε χρωματισμό λόγω της διάσπασης του ενζύμου X-gal του υποστρώματος από το βακτήριο. Στην καταμέτρηση των *Enterococci* συμπεριλήφθηκαν όσες αποικίες είχαν χαρακτηριστικό μαύρο χρωματισμό. Ακολούθησαν ανακαλλιέργειες για την απομόνωση 25 καθαρών αποικιών από τον κάθε πληθυσμό. Με στείρο βακτηριακό κρίκο μεταφέρθηκαν μονές αποικίες που επιλέχθηκαν τυχαία, σε αντίστοιχα υποστρώματα με αυτά από τα οποία απομονώθηκαν αρχικά. Η επίστρωση έγινε με γραμμική διασπορά. Τα *E.coli* επώστηκαν για 24 ώρες στους 44<sup>0</sup>C ενώ οι *Enterococci* για 48 ώρες στους 44<sup>0</sup>C.

### **2.3. Θρεπτικά υποστρώματα**

#### **2.3.1. Απομόνωση των *E.coli***

Χρησιμοποιήθηκε το HiCrome *E. coli* Agar (HiMedia, M12951-500G). Αιωρηματοποιήθηκαν 36,58gr σκόνης του υποστρώματος σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού (15ΜΩ). Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού με ταυτόχρονη ανάδευση μέχρι πλήρους ομογενοποίησης. Ακολούθησε αποστείρωση σε υγρό κλίβανο στους 121<sup>0</sup>C για 15 λεπτά. Το υπόστρωμα ψύχθηκε στους 50<sup>0</sup>C σε υδατόλουτρο. Σε αυτό το στάδιο προστέθηκαν τα αντιβιοτικά στην κατάλληλη συγκέντρωση κατά περίπτωση με βάση τα επιδημιολογικά σημεία καμπής του EUCAST. Μετά από προσεκτική ανάδευση, το υπόστρωμα περιχύθηκε σε στείρα τρυβλία Petri 90mm x 15mm σε συνθήκες στείρου αέρα. Τα τρυβλία αφέθηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους 4<sup>0</sup>C έως τη χρήση τους.

#### **2.3.2. Απομόνωση των *Enterococcus spp***

Χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Slanetz & Bartley Media (HiMedia, M612-500G) το οποίο είναι πλούσιο σε χολικά οξέα, επιτρέποντας την εκλεκτική ανάπτυξη μόνο των enterococci. Αιωρηματοποιήθηκαν 46,5gr σκόνης του υποστρώματος σε ένα λίτρο απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού (121<sup>0</sup>C για 15 λεπτά). Στη συνέχεια προστέθηκαν τα διαλύματα των αντιβιοτικών στις συγκεντρώσεις που ορίζει το EUCAST. Το υπόστρωμα περιχύθηκε σε στείρα

τρυβλία Petri 90mm x 15mm σε συνθήκες στείρου αέρα. Τα τρυβλία διατηρήθηκαν στους 4<sup>0</sup>C έως τη χρήση τους.

### **2.3.3. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά**

Διαλυτοποιήθηκαν 38gr σκόνης του υποστρώματος Mueller Hinton Agar No.2 (HiMedia, M1084-500G) σε ένα λίτρο απιονισμένου νερού (15MΩ). Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού με ταυτόχρονη ανάδευση μέχρι πλήρους ομογενοποίησης. Ακολούθησε αποστείρωση σε υγρό κλίβανο στους 121<sup>0</sup>C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να μειωθεί στους 50<sup>0</sup>C και περιχύθηκε σε τρυβλία Petri τα οποία διατηρήθηκαν στους 4<sup>0</sup>C έως τη χρήση τους.

## **2.4. Διαλύματα αντιβιοτικών**

### **2.4.1. Αμπικιλίνη**

Πρόκειται για αντιβιοτικό της ομάδας της β-λακτάμης. Αναστέλλει τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα τη λύση του βακτηριακού κυττάρου (Madigan *et al.*, 1997). Η αμπικιλίνη παρουσιάζει στενό φάσμα δράσης που περιλαμβάνει *Streptococcus*, *Staphylococcus* που δεν παράγουν β-λακταμάσες καθώς και άλλους gram-θετικούς κόκκους και βάκιλλους. Οι πλείστοι εντερικοί gram-αρνητικοί βάκιλλοι της οικογένειας *Enterobacteriaceae* είναι ανθεκτικοί (Papich, 2011). Χρησιμοποιήθηκε Ampicillin Trihydrate Compacted (Remedica, A0016D1). Μελέτες κατέδειξαν ότι η σταθερότητα της αμπικιλίνης σε διάλυμα είναι συνάρτηση του pH και της θερμοκρασίας (Florey, 1973). Παρόλο που η αμπικιλίνη έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα στα αλκάλια, χάνει γρήγορα τη δραστηριότητα της όταν διατηρείται σε pH πάνω από 7 (Florey, 1973, Gallelli, 1967, Lynn, 1981). Οι ιδανικές συνθήκες διατήρησης διαλύματος αμπικιλίνης που προτείνονται είναι σε θερμοκρασία -20<sup>0</sup>C και pH 3,8-5. Για τη ρύθμιση του pH του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε HCl 1M. Ζυγίστηκαν 100mg της ουσίας και προστέθηκαν σε 1ml απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος στο 4,2 με την προσθήκη κατάλληλης αναλογίας οξέος και βάσης. Το διάλυμα συμπληρώθηκε με νερό έως

συνολικού όγκου 10ml έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας να είναι 10mg/ml. Ακολούθησε διήθηση του διαλύματος με στείρα φίλτρα 0,22μm σε αποστειρωμένους μικροσωλήνες φυγοκέντρησης Eppendorf® και αποθήκευση στους -20°C.

#### **2.4.2. Κεφοταξίμη**

Η κεφοταξίμη είναι κεφαλοσπορίνη 3<sup>ης</sup> γενεάς. Έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με άλλα αντιβιοτικά της β-λακτάμης. Ως κεφαλοσπορίνη 3<sup>ης</sup> γενεάς, έχει αυξημένη δραστηριότητα έναντι Gram-αρνητικών βάκιλλων, ιδίως των *Enterobacteriaceae*, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί σε κεφαλοσπορίνες πρώτης και δεύτερης γενεάς καθώς και σε παράγωγα της αμπικιλίνης (Papich, 2011). Παρασκευάστηκε διάλυμα κεφοταξίμης συγκέντρωσης 20mg/ml. Ζυγίστηκαν 100mg Cefotaxime Sodium (Medochemie, Valoran®) και διαλυτοποιήθηκαν με έντονη ανάδευση σε 5ml αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού. Το διάλυμα κατανεμήθηκε σε στείρους μικροσωλήνες φυγοκέντρησης Eppendorf® ύστερα από διήθηση με φίλτρα 0,22μm και το στοκ αποθηκεύτηκε στους -20°C.

#### **2.4.3. Γενταμυκίνη**

Η γενταμυκίνη ανήκει στις αμινογλυκοσίδες. Έχει βακτηριοκτόνο δράση, αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση του βακτηριακού κυττάρου, μέσω δέσμευσης στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα. Παρουσιάζει ευρύ φάσμα δράσης έναντι *Staphylococcus* και Gram-αρνητικών βάκιλλων της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* (Papich, 2011). Χρησιμοποιήθηκε έτοιμο διάλυμα γενταμυκίνης με τη μορφή θεικού άλατος, συγκέντρωσης 40mg/ml (Medochemie, Gentamed Injection). Το διάλυμα διήθηκε με φίλτρο 0,22μm και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

#### **2.4.4. Βανκομυκίνη**

Η βανκομυκίνη ανήκει στα γλυκοπεπτιδία. Αναστέλλει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω δέσμευσης στις πρόδρομες ουσίες D-αλανυλ-D-αλλανίνη και αναστολής της δράσης των τρανσγλυκοσιδασών και τρανσπεπτιδασών. Η βακτηριοκτόνος δράση ενισχύεται με την ενεργοποίηση των αυτολυσινών του κυτταρικού τοιχώματος. Η βανκομυκίνη είναι δραστική

έναντι *Streptococcus* και *Staphylococcus* (βακτηριοκτόνος), καθώς και *Enterococcus* (βακτηριοστατική), ενώ δεν έχει καμία επίδραση έναντι gram-αρνητικών βακτηρίων. Η κλινική σημασία της έγκειται στη χρήση της έναντι στελεχών *Staphylococcus aureus* ανθεκτικών στη μεθικιλίνη (MRSA) και *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP), καθώς και ανθεκτικών στελεχών *Enterococcus* στα ζώα και στον άνθρωπο (Papich, 2011). Παρασκευάστηκε διάλυμα βανκομυκίνης συγκέντρωσης 5mg/ml. Χρησιμοποιήθηκε vancomycin hydrochloride (Mylan, Vancomycine). Το διάλυμα αποθηκεύτηκε στους -20<sup>0</sup>C.

## 2.5. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος έγινε με τη μέθοδο αντιβιοτικών δισκίων διάχυσης ([http://www.eucast.org/disk\\_diffusion\\_methodology/](http://www.eucast.org/disk_diffusion_methodology/)) σε τρυβλία Petri με το θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton (HiMedia, M1084-500G). Λήφθηκαν αποικίες 18-24 ωρών από κάθε απομόνωση με αποστειρωμένο μάκτρο και εμβαπτίστηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 1 ml NaCl 0,45%. Έγινε μέτρηση της πυκνότητας του εναιωρήματος σε φασματοφωτόμετρο. Ως αποδεκτά όρια ορίστηκαν 0,5-0,62 μονάδες στην κλίμακα McFarland που ισοδυναμούν με βακτηριακό εναιώρημα που περιέχει 150 x 10<sup>6</sup> cfu/ml. Στη συνέχεια με στείρο μάκτρο έγινε επίστρωση του εναιωρήματος πάνω στα τρυβλία σε τρία στρώματα. Το δεύτερο στρώμα ήταν κάθετο πάνω στο πρώτο και το τρίτο στρώμα σε γωνία 60<sup>0</sup> σε σχέση με το δεύτερο. Οι απομονώσεις των *E. coli* εξετάστηκαν για την ευαισθησία τους χρησιμοποιώντας τα εξής αντιβιοτικά δισκία: αμπικιλίνη 10μg (AMP10) (Oxoid, CT0003), κεφοταξίμη 5μg (CTX5) (Oxoid, CT0407), γενταμυκίνη 10μg (GN10) (Oxoid, CT0024), τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη 25μg (SXT25) (Oxoid, CT0052), και τριμεθοπρίμη 5μg (W5) (Oxoid, CT0076). Οι απομονώσεις των enterococci εξετάστηκαν για την ευαισθησία τους χρησιμοποιώντας τα εξής αντιβιοτικά δισκία: αμπικιλίνη 2μg (AMP2) (Oxoid, CT0002), γενταμυκίνη 30μg (GN30) (Oxoid, CT0072), και βανκομυκίνη 5μg (VAN5) (Oxoid, CT0188). Όλα τα τρυβλία επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37<sup>0</sup>C. Ακολούθως μετρήθηκε η διάμετρος αναστολής ανάπτυξης γύρω από κάθε δισκίο και εκτιμήθηκε η ευαισθησία του μικροοργανισμού στο κάθε αντιβιοτικό με βάση τα επιδημιολογικά σημεία καμπής του EUCAST. Για τα *E.coli* ως

θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πολυανθεκτικό στέλεχος Δ97 και ως αρνητικός μάρτυρας το ευαίσθητο στέλεχος ATCC 25922. Για τους enterococci ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πολυανθεκτικό στέλεχος Δ94 και ως αρνητικός μάρτυρας το ευαίσθητο στέλεχος ATCC 29212.

**Πίνακας 1: Επιδημιολογικά σημεία καμπής των *E. coli* και συγκεντρώσεις επιλογής των ανθεκτικών πληθυσμών στα θρεπτικά υποστρώματα**

<b>E. COLI EPIDEMIOLOGICAL BREAKPOINTS</b>				
<b>MIC</b>	<b>Concentration Selected</b>	<b>Disk content</b>	<b>R</b>	<b>S</b>
AMP > 8 mg/L	16 mg/L	AMP10	< 14 mm	≥ 14mm
GN > 4 mg/L	8 mg/L	GN10	< 16 mm	≥ 16 mm
CTX > 0.25 mg/L	2 mg/L	CTX5	< 23 mm	≥ 23 mm
-	-	SXT25	< 16 mm	≥ 16 mm
-	-	W5	< 20 mm	≥ 20 mm

Πηγή: EUCAST, 2012

**Πίνακας 2: Επιδημιολογικά σημεία καμπής των Enterococci και συγκεντρώσεις επιλογής των ανθεκτικών πληθυσμών στα θρεπτικά υποστρώματα**

<b>ENTEROCOCCI EPIDEMIOLOGICAL BREAKPOINTS</b>				
<b>MIC</b>	<b>Concentration Selected</b>	<b>Disk content</b>	<b>R</b>	<b>S</b>
AMP > 4 mg/L	16 mg/L	AMP2	< 10mm	≥ 10mm
GN > 32 mg/L	200 mg/L	GN30	< 8mm	≥ 8mm
VAN > 4 mg/L	8 mg/L	VAN5	< 12mm	≥ 12mm

Πηγή: EUCAST, 2012

## 2.6. Εξαγωγή ολικού DNA

Απομονώθηκαν συνολικά 227 *E.coli* (75 από τον ολικό πληθυσμό, 74 από την αμπικιλίνη, 37 από την κεφοταξίμη και 41 από την γενταμυκίνη) και 130 *Enterococci* (74 από τον ολικό πληθυσμό, 28 από την αμπικιλίνη και 28 από την γενταμυκίνη). Από κάθε απομόνωση

λήφθηκαν ασηπτικά 6 αποικίες και επαναιωρηματοποιήθηκαν σε 20μl Lysis Buffer (0.25% SDS, 0.05% NaOH, Merck). Ακολούθησε επώαση στους 95<sup>0</sup>C για 5 λεπτά και σύντομη φυγοκέντρωση. Τα δείγματα στη συνέχεια, αραιώθηκαν σε 180μl 10mM Tris-HCl, pH 8.5 (Merck), αναμείχθηκαν με έντονο vortex, και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 16,100 rpm για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Η υπερκείμενη φάση αραιώθηκε κατά 10 φορές (50 μl μεταφέρθηκαν σε 450μl αποστειρωμένου νερού) και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -30<sup>0</sup>C για μεταγενέστερη χρήση.

## **2.7. Δημιουργία βιβλιοθήκης**

Όλες οι απομονώσεις μεταφέρθηκαν άσηπτα σε κρυογονικούς μικροσωλήνες με 1ml στείρου διαλύματος γλυκερόλης 22% και αποθηκεύτηκαν στους -80<sup>0</sup>C, από όπου μπορούν να αντληθούν ξανά ανά πάσα στιγμή για μελλοντικές μελέτες.

## **2.8. Αντιδράσεις PCR, ηλεκτροφόρηση και οπτικοποίηση των προϊόντων**

Όλες οι αντιδράσεις PCR ήταν συνολικού όγκου 10μl και πραγματοποιήθηκαν σε PCR strips 0,2ml (Nippon Genetics). Στα υποκεφάλαια 2.10.-2.13. τα διαλύματα της PCR (PCR Mastermix) στήθηκαν με βάση τις οδηγίες του KaraTaq<sup>TM</sup> PCR kit (KaraBiosystems). Στο υποκεφάλαιο 2.9. χρησιμοποιήθηκε το Kara SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR kit (KaraBiosystems) για βελτιστοποίηση των αντιδράσεων. Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-dNTPs (Invitrogen) συγκέντρωσης 10mM το καθένα. Όλοι οι εκκινητές που αναφέρονται πιο κάτω παραγγέλθηκαν και συντέθηκαν από την εταιρεία Microsynth AG σε λυοφιλοποιημένη μορφή και αραιώθηκαν με ddH<sub>2</sub>O για τελική συγκέντρωση 10mM με βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Τα πρωτόκολλα PCR που εφαρμόστηκαν περιγράφονται ξεχωριστά σε κάθε υποκεφάλαιο. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους θερμικούς κυκλοποιητές C1000<sup>TM</sup> (BioRad). Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης 1% (Sigma<sup>®</sup>) με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1× με ταχύτητα 90V/100mA σε οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης (HU series, Scie-Plas). Ως δείκτες χρησιμοποιήθηκαν DNA ladders 100 bp

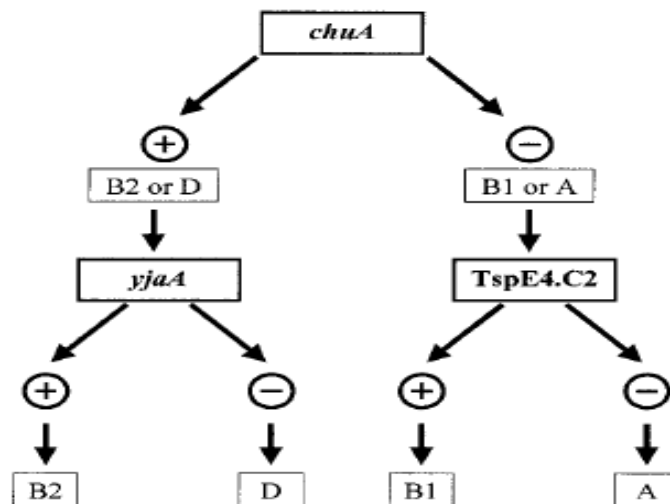


(Invitrogen) ενώ για τη χρώση του gel χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen). Η οπτικοποίηση των προϊόντων έγινε με έκθεση των gels σε UV (Infinity system, Vilbert Lourmat, France).

## 2.9. Καθορισμός φυλογενετικής ομάδας των απομονώσεων *E. coli*

Η φυλογενετική ομαδοποίηση μπορεί να γίνει με πολυτοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση (multilocus enzyme electrophoresis - MLEE) (Herzer *et al.*, 1990, Selander *et al.*, 1986) ή ανάλυση του ριβότυπου (ribotyping) (Bingen *et al.*, 1994), όμως και οι δύο αυτές τεχνικές είναι πολύπλοκες και χρονοβόρες ενώ απαιτούν και μια συλλογή από τυποποιημένα στελέχη.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που ανέπτυξαν οι Clermont *et al.* (2000) για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής ομάδας των απομονώσεων των *E. coli*. Η μέθοδος Clermont βασίζεται σε ένα πρωτόκολλο μιας (τριπλής) triplex PCR με την οποία προσδιορίζεται η παρουσία ή απουσία δύο γονιδίων (*chuA* και *yjaA*) και ενός ανώνυμου κλάσματος DNA (TspE4C2). Η παρουσία/απουσία των τριών προϊόντων PCR, χρησιμοποιείται σε ένα διχοτομικό



Εικόνα 3. Διχοτομικό δενδρόγραμμα για τον καθορισμό της φυλογενετικής ομάδας ενός στελέχους *E. coli* με βάση τα αποτελέσματα της ενίσχυσης με PCR των γονιδίων *chuA* και *yjaA* και του κλάσματος DNA TSPE4.C2

Πηγή: Clermont, 2000

δενδρόγραμμα το οποίο κατατάσσει μια άγνωστη απομόνωση *E. coli* σε μια από τις τέσσερις φυλογενετικές ομάδες (A, B1, B2, D). Ένα ποσοστό των στελεχών της A ομάδας είναι αρνητικά και στα τρία προϊόντα PCR (Clermont *et al.*, 2000). Στα στελέχη όπου δεν παράχθηκε κανένα από τα τρία προϊόντα PCR, η αντίδραση επαναλήφθηκε. Όσα στελέχη ήταν εκ νέου αρνητικά και στα τρία προϊόντα PCR, ταξινομήθηκαν στην ομάδα A<sub>0</sub>. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είχε ως εξής: αρχική αποδιάταξη για 3 min στους 94°C και ακολούθως 34 κύκλοι από 15 sec στους 94°C (αποδιάταξη) και 45 sec στους 59°C (υβριδισμός εκκινητών και επέκταση σε ένα στάδιο). Ακολούθησε τελική επέκταση για 3 min στους 72°C. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ChuA.1 (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3'), ChuA.2 (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'), YjaA.1 (5'-TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG-3'), YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'), TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3') και TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'), τα οποία παράγουν τμήματα 279-, 211-, και 152 βάσεων αντίστοιχα (Clermont *et al.*, 2000).

## 2.10. Ανίχνευση ESBLs στις απομονώσεις των *E. coli*

Οι απομονώσεις των *E. coli* υποβλήθηκαν σε τρεις πολλαπλές (multiplex) και μια απλή (simplex) PCR με βάση τα πρωτόκολλα που σχεδίασαν οι Dallene *et al.* (2010) για γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση των πιο συχνά απαντούμενων β-λακταμασών (*bla*). Η πρώτη και δεύτερη πολλαπλή (multiplex) PCR περιλάμβαναν τις πλασμιδιακές *bla*<sub>TEM</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>OXA-1</sub> και *bla*<sub>CTX-M-1,2,9</sub> αντίστοιχα, και η τρίτη multiplex τις χρωμοσωμικές AmpC *bla*<sub>ACC</sub>/*bla*<sub>FOX</sub>/*bla*<sub>MOX</sub>/*bla*<sub>DHA</sub>/*bla*<sub>CIT</sub>. Η απλή (simplex) PCR σχεδιάστηκε για τις ομάδες *bla*<sub>CTX-M-8/-25</sub>. Η ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων έγινε ως εξής: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 10 min, ακολούθως 30 κύκλοι στους 94°C για 40 sec, 60°C για 40 sec, 72°C για 1 min και τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 7 min (Dallene *et al.*, 2010).

Πίνακας 3: Εκκινητές για την ανίχνευση των ESBLs στα *E. coli*

PCR name	Primer name	$\beta$ -Lactamases targeted	Sequence (5' - 3')	Amplicon size (bp)
Multiplex I TEM, SHV and OXA-1 like	MultiTSO-T_for	TEM variants	CATTTCCGTGTGCGCCCTTATTC	800
	MultiTSO-T_rev		CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
	MultiTSO-S_for	SHV variants	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713
	MultiTSO-S_rev		ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
	MultiTSO-O_for	OXA-1 like variants	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564
	MultiTSO-O_rev		GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	
Multiplex II CTX-M group 1, group2, group 9	MultiCTX-MGp1_for	CTX-M group 1 variants	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA <sup>a</sup>	688
	MultiCTX-MGp1-2_rev		CGATATCGTTGGTGGTRCCAT <sup>a</sup>	
	MultiCTX-MGp2_for	CTX-M group 2 variants	CGTTAACGGCACGATGAC	404
	MultiCTX-MGp1-2_rev		CGATATCGTTGGTGGTRCCAT <sup>a</sup>	
	MultiCTX-MGp9_for	CTX-M group 9 variants	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561
	MultiCTX-MGp9_rev		TGATTCTCGCCGCTGAAG	
Simplex CTX-M group 8/25	CTX-MGp8/25_for	CTX-M group 8, group 25	AACRCRCAGACGCTCTAC <sup>a</sup>	326
	CTX-MGp8/25_rev		TCGAGCCGGAASGTGYAT <sup>a</sup>	
Multiplex III Amp C	MultiCaseACC_for	ACC-1 and ACC-2	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	346
	MultiCaseACC_rev		GTTAGCCAGCATCACGATCC	
	MultiCaseFOX_for	FOX-1 to FOX-5	CTACAGTGCGGGTGGTTT	162
	MultiCaseFOX_rev		CTATTTGCGGCCAGGTGA	
	MultiCaseMOX_for	MOX-1, MOX-2, CMY-8 to CMY-11 and CMY-19	GCAACAACGACAATCCATCCT	895
	MultiCaseMOX_rev		GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	
	MultiCaseDHA_for	DHA-1 and DHA-2	TGATGGCACAGCAGGATATTC	997
	MultiCaseDHA_rev		GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG	
	MultiCaseCIT_for	LAT-1 to LAT-3, BIL-1, CMY-2 to CMY-7, CMY- 12 to CMY-18 and CMY- 21 to CMY-23	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	538
MultiCaseCIT_rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY <sup>a</sup>			

<sup>a</sup>Y = T ή C, R = A ή G, S = G ή C, D = A ή G ή T

Πηγή: Dallene *et al.*, 2010

## 2.11. Ταυτοποίηση του είδους των *Enterococci*

Μέχρι στιγμής είναι γνωστά 24 είδη εντερόκοκκων. Τα είδη *E.faecalis* και *E.faecium* είναι τα σημαντικότερα μιας και αντιπροσωπεύουν πάνω από το 95% των απομονώσεων σε ένα πληθυσμό, και επιπλέον ευθύνονται για την πλειοψηφία των εντεροκοκκικών λοιμώξεων στους ανθρώπους (Klare *et al.*, 2003). Με αυτά τα δεδομένα, οι απομονώσεις εξετάστηκαν για την ταυτοποίηση μόνο των δύο αυτών ειδών. Η μέθοδος βασίστηκε στην ενίσχυση ενός τμήματος εσωτερικά του γονιδίου *ddl* το οποίο κωδικοποιεί μια D-Ala-D-Ala λιγάση. Χρησιμοποιήθηκε το εξής πρωτόκολλο PCR: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 min και ακολούθως 34 κύκλοι αποτελούμενοι από 30 sec στους 94°C, 30 sec στους 54°C, 70 sec στους 72°C και τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 7 min (Dutka-Malen *et al.*, 1995).

Πίνακας 4: Εκκινητές για την ταυτοποίηση των *E. faecalis* και *E. faecium*

Primer name	Sequence (5'-3')	Gene	Encoding	Amplicon size (bp)
ddlEfc <sub>m</sub> _for	GAGTAAATCACTGAACGA	<i>ddl</i>	D-Ala-D-Ala ligase of <i>E.faecium</i>	1091
ddlEfc <sub>m</sub> _rev	CGCTGATGGTATCGATTTCAT			
ddlEfc <sub>a</sub> _for	CACCTGAAGAAACAGGC		D-Ala-D-Ala ligase of <i>E.faecalis</i>	475
ddlEfc <sub>a</sub> _rev	ATGGCTACTTCAATTTTCACG			

Πηγή: Dutka-Malen *et al.*, 1995

## 2.12. Ανίχνευση του γονιδίου *esp* στις απομονώσεις των *Enterococci*

Όλες οι απομονώσεις των *enterococci* εξετάστηκαν για την παρουσία του *esp* με PCR χρησιμοποιώντας το ακόλουθο πρωτόκολλο: αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 15 min, ακολούθως 34 κύκλοι από 30 sec στους 94°C, 30 sec στους 52°C, 30 sec στους 72°C και τελικό στάδιο επέκτασης για 5 min στους 72°C (Leavis *et al.*, 2003).

Πίνακας 5: Εκκινητές για την ανίχνευση του γονιδίου *esp*

Primer name	Sequence (5'-3')	Gene	Encoding	Amplicon size (bp)
esp_for	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG	<i>esp</i>	enterococcal surface protein	510
esp_rev	AATTGATTCTTTAGCATCTGG			

Πηγή: Leavis *et al.*, 2003

### 2.13. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)

Η μέθοδος MLVA χρησιμοποιείται για τη μοριακή τυποποίηση διάφορων βακτηριακών ειδών (Keim *et al.*, 2000, van Belkum *et al.*, 1998). Βασίζεται στην ανίχνευση πολυμορφίας ως προς τον αριθμό των αντιγράφων μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (variable-number tandem repeat-VNTR) για ένα σύνολο γενετικών τόπων (loci). Πρόκειται για μια γρήγορη, εύκολη και φθηνή μέθοδο με υψηλή αναπαραγωγιμότητα αποτελεσμάτων. Άλλες μέθοδοι μοριακής τυποποίησης είναι τα AFLP και MLST. Η πρώτη έχει το μειονέκτημα ότι τα αποτελέσματα της δεν είναι επαναλήψιμα άρα ούτε και συγκρίσιμα ενώ η δεύτερη είναι χρονοβόρα και ακριβή μέθοδος (Top *et al.*, 2004). Στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκε η μέθοδος MLVA που σχεδιάστηκε για τον *E. faecium*. Επιλέξαμε να αναλύσουμε με MLVA μόνο τις απομονώσεις του *E. faecium* γιατί μόνο αυτές παρουσίασαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, σε αντίθεση με τον πληθυσμό του *E. faecalis* που ήταν εξολοκλήρου ευαίσθητος.

Με βάση τη μέθοδο MLVA των Top *et al.* (2004), χρησιμοποιήθηκαν έξι VNTR loci για την μελέτη της φυλογένειας και επιδημιολογίας του *E. faecium*. Με βάση τους αλληλόμορφους που προέκυψαν για κάθε VNTR, δημιουργήθηκε ένα προφίλ MLVA για κάθε απομόνωση του *E. faecium*. Σε κάθε προφίλ MLVA ανατέθηκε ένας τύπος MLVA (MT) χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων της ιστοσελίδας <http://www.umcutrecht.nl>.

### 2.13.1. Συνθήκες PCR

VNTR-1: Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 15 min και ακολούθως 35 κύκλοι από 30 sec στους 94°C, 30 sec στους 52°C, 1 min στους 72°C και τελική επέκταση στους 72°C για 5 min.

VNTR-2: Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 15 min. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε touch down PCR που περιλάμβανε 10 κύκλους. Σε κάθε κύκλο η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών μειωνόταν κατά 1°C ξεκινώντας από τους 70°C και φτάνοντας στους 60°C στο τέλος του 10<sup>ου</sup> κύκλου. Ακολούθησαν άλλοι 30 κύκλοι από 30 sec στους 94°C, 30 sec στους 60°C και 4 min στους 72°C. Η τελική επέκταση έγινε στους 72°C για 5 min.

VNTR-7,-8,-9,-10: Η αρχική αποδιάταξη έγινε στους 95°C για 15 min. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε touch down PCR που περιλάμβανε 10 κύκλους. Σε κάθε κύκλο η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών μειωνόταν κατά 1°C ξεκινώντας από τους 65°C και φτάνοντας στους 55°C στο τέλος του 10<sup>ου</sup> κύκλου. Ακολούθησαν άλλοι 30 κύκλοι από 30 sec στους 94°C, 30 sec στους 55°C και 1 min στους 72°C. Η τελική επέκταση έγινε στους 72°C για 5 min (Top *et al.*, 2004).

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των VNTR

Locusname	Repeat length (bp)	Range no. repeats	No.of alleles	Estimated size (bp)	Primer sequence (5'-3')
VNTR-1	123	0 to 8	8	250-1012	F: CTGTGATTTGGAGTTAGATGG
					R: CATTGTCCAGTAGAATTAGATTTG
VNTR-2	279	1 to 14	13	724-4351	F: GATGCTTATTTCCACTGCTTGTG
					R: GTTTTACCCCTCTCTTTTAAGGTC AATG
VNTR-7	121	1 to 7	7	416-1021	F: CTATCAGTTTCAGCTATTCCATC
					R: CTGGTACGAATCAAATCAAGTG
VNTR-8	121	1 to 7	7	237-963	F: GGGGAGTGGCAAAAATAGTGTG
					R: CAGATCATCAACTATCAACCGCTG
VNTR-9	121	1 to 3	3	205-447	F: CTGCATCTAATAACAAGGACCCATG
					R: ACATTCCGATTAACGCGAAATAAG
VNTR-10	121	0 to 3	4	174-474	F: CCTACAGAAAATCCAGACGG
					R: TTTTTTCCATCCTCT TGAATTG

Πηγή: <http://www.umcutrecht.nl>

## 2.14. Multi-locus sequence typing (MLST)

Η μέθοδος MLST παρέχει μια νέα προσέγγιση στη μοριακή επιδημιολογία. Επιτρέπει την ταυτοποίηση και παρακολούθηση της παγκόσμιας διασποράς και εξελικτικής βιολογίας παθογόνων ή ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηριακών απομονώσεων, με τη χρήση της βιοπληροφορικής (Baker *et al.*, 2010). Οι βάσεις δεδομένων MLST περιέχουν εκατοντάδες χιλιάδες απομονώσεις μικροοργανισμών και είναι προσβάσιμες μέσω διαδικτύου (<http://www.mlst.net/> και <http://pubmlst.org/>). Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση πολυμορφίας στην αλληλουχία του DNA εσωτερικών τμημάτων 7 δομικών γονιδίων. Σε κάθε γονίδιο αντιστοιχεί ένας αριθμός αλληλόμορφων. Ο συνδυασμός των 7 αριθμών καθορίζει τον τύπο αλληλουχίας (sequence type-ST) που είναι μοναδικός για κάθε στέλεχος ενός μικροοργανισμού (Enright and Spratt, 1999).

Όλες οι αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση των εσωτερικών τμημάτων των δομικών γονιδίων ήταν συνολικού όγκου 25μl: 14,9μl ddH<sub>2</sub>O 18μΩ, 2,5μl buffer A (Kapa Biosystems), 0,5μl dNTPs 10mM, 1μl από κάθε εκκινητή 10mM, 0,1μl KapaTaq polymerase 5U/μl (Kapa Biosystems) και 5μl template DNA (5-20 ng/μl).

### 2.14.1. MLST- *Enterococcus faecium*

Η μέθοδος MLST έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα για τα στελέχη του *E. faecium* σε σχέση με τη μέθοδο MLVA (Werner *et al.*, 2007). Για το λόγο αυτό, η γενετική συσχέτιση των τύπων MLVA επιβεβαιώθηκε με MLST σε ένα υποσύνολο 28 αντιπροσωπευτικών απομονώσεων του *E. faecium* που ονομάστηκαν Entm-1-28. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο MLST του *E. faecium* των Homan *et al.* (2002) με τις ακόλουθες συνθήκες PCR: αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 15 min, 35 κύκλοι από 30 sec στους 94°C, 30 sec στους 55°C και 30 sec στους 72°C και τελική επέκταση για 5 min στους 72°C.

Πίνακας 7: Δομικά γονίδια στο πρωτόκολλο MLST του *E. faecium*

Housekeeping gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>adk</i>	adk1n	GAACCTCATTTTAATGGGG	437
	adk2n	TGATGTTGATAGCCAGACG	
<i>atpA</i>	atpA1n	TTCAAATGGCTCATACGG	556
	atpA2n	AGTTCACGATAAGCAACAGC	
<i>ddl</i>	ddl1	GAGACATTGAATATGCCTTATG	465
	ddl2	AAAAAGAAATCGCACCG	
<i>gdh</i>	gdh1	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
	gdh2	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd</i>	gyd1	CAAACCTGCTTAGCTCCAATGGC	395
	gyd2	CATTTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>purk</i>	purk1n	CAGATTGGCACATTGAAAG	492
	purk2n	TTCATTACATATAGCCCG	
<i>pstS</i>	pstS1n	TTGAGCCAAGTCGAAGC	583
	pstS2	CGTGATCACGTTTCTACTTCC	

Πηγή: <http://efaecium.mlst.net>

#### 2.14.2. MLST- *Escherichia coli*

Για λόγους εργονομικότητας επιλέχθηκαν 37 αντιπροσωπευτικές απομονώσεις από το σύνολο των 227 απομονώσεων *E. coli*. Η επιλογή των στελεχών έγινε έτσι ώστε να συμπεριληφθούν όλοι οι συνδυασμοί γονότυπων ανθεκτικότητας από κάθε φυλογενετική ομάδα. Τα 37 στελέχη ονομάστηκαν Ecom-1-37. Για την ενίσχυση των εσωτερικών τμημάτων των 7 δομικών γονιδίων που περιλαμβάνονται στο πρωτόκολλο MLST του *E. coli* (Wirth *et al.*, 2006), χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες PCR: αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 min, ακολούθως 30 κύκλοι από 30 sec στους 95°C, 30 sec στους 61°C και 1 min στους 72°C, και τελική επέκταση για 5 min στους 72°C.



**Πίνακας 8: Δομικά γονίδια στο πρωτόκολλο MLST του *E. coli***

Housekeeping gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>adk</i>	adkF	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583
	adkR	CCGTCAACTTTTCGCGTATTT	
<i>fumC</i>	fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806
	fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTC	
<i>gyrB</i>	gyrBF	TCGGCGACACGGATGACGGC	911
	gyrBR	ATCAGGCCTTCA CGCGCATC	
<i>icd</i>	icdF	ATGGAAAGTAAAGTAGTGTCCGGCACA	878
	icdR	GGACGCAGCAGGATCTGTT	
<i>mdh</i>	mdhF1	AGCGCGTCTGTCAAATGC	932
	mdhR1	CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT	
<i>purA</i>	purAF	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816
	purAR	CATACGGTAAGCCACGCAGA	
<i>recA</i>	recAF	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	780
	recAR	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	

Πηγή: <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>

### 2.14.3. Αλληλούχιση DNA

Τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν με κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη/οξικό νάτριο για την απομάκρυνση υπολειμμάτων εκκινητών, αλάτων  $Mg^{2+}$  και dNTPs και επαναιωρηματοποιήθηκαν σε 25μl ddH<sub>2</sub>O. Ακολούθως εξετάστηκαν για την παρουσία μη ειδικών προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% και οπτικοποιήθηκαν με έκθεση σε UV. Η παρουσία μονής ζώνης στο επιθυμητό μήκος βάσεων κάθε γονιδίου υποδήλωνε την απουσία μη ειδικών προϊόντων.

Ακολούθησε η αντίδραση αλληλούχισης των καθαρισμένων προϊόντων PCR. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν μέσα σε 96-well plates (MicroAmp<sup>®</sup> Optical) και ήταν συνολικού όγκου 10,5μl ως εξής: 1,75μl 5× BigDye<sup>®</sup> terminator sequencing buffer (Applied Biosystems), 0,6μl BigDye<sup>®</sup> terminator v3.1 (Applied Biosystems), 0,5μl εκκινητή (5mM), 1μl από τα πιο πάνω προϊόντα PCR (5-20 ng/μl) και 6,65 ddH<sub>2</sub>O 18μΩ. Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες

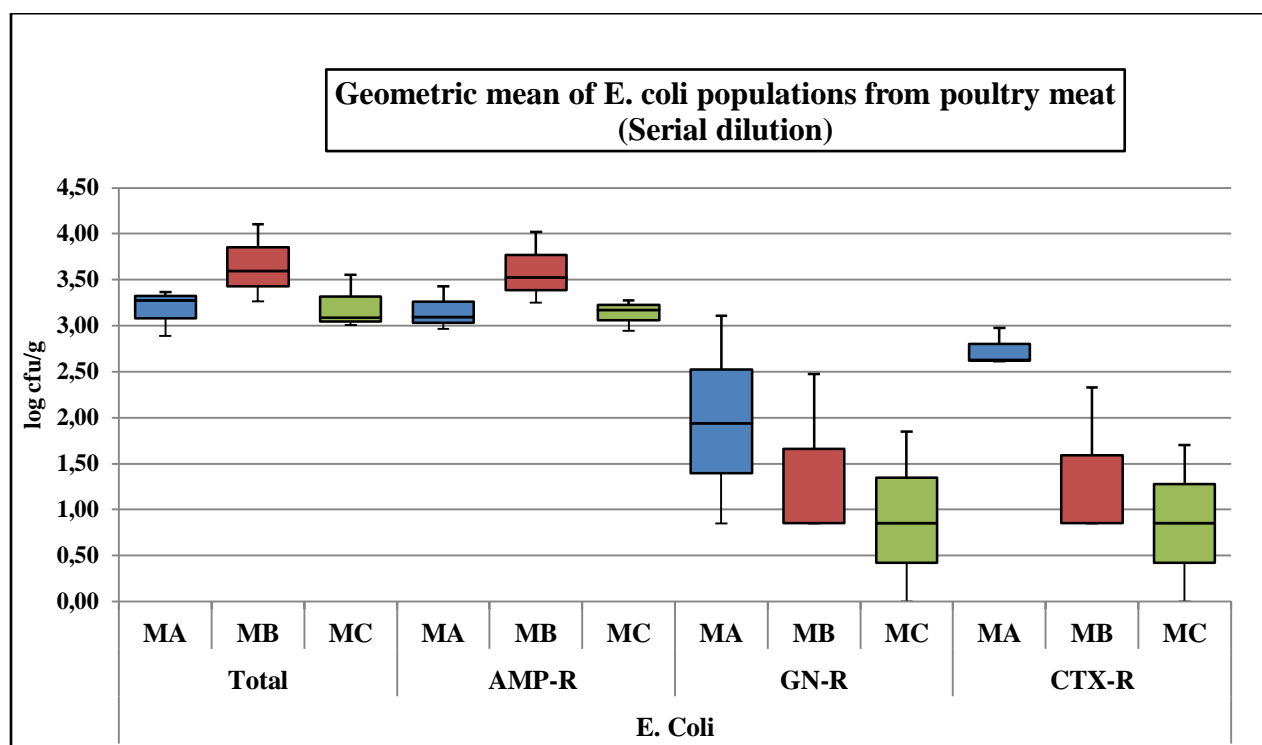
συνθήκες PCR: αρχική αποδιάταξη στους 92°C για 2 min κι έπειτα 30 κύκλοι από 15 sec στους 94°C, 15 sec στους 50°C και 4 min στους 60°C.

Στη συνέχεια τα προϊόντα επέκτασης της αντίδρασης αλληλούχισης καθαρίστηκαν για την απομάκρυνση υπολειμμάτων ddNTPs, αλάτων  $Mg^{2+}$  και εκκινητών, με τη μέθοδο κατακρήμνισης με αιθανόλη/EDTA και επαναιωρηματοποιήθηκαν σε 10 μl formamide. Τα δείγματα φορτώθηκαν στο γενετικό αναλυτή ABI 3130 (Applied Biosystems/Hitachi) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα αποτελέσματα διαβάστηκαν, ευθυγραμμίστηκαν και συγκρίθηκαν με τα πρότυπα σύνολα αλληλόμορφων με BLAST, και σε κάθε προφίλ MLST αποδόθηκε ένας τύπος αλληλουχίας (sequence type - ST). Η ομαδοποίηση (clustering) των STs έγινε με τον αλγόριθμο eBURST (Feil *et al.*, 2004) ο οποίος εφαρμόζεται στο λογισμικό PhyloViz (<http://goeburst.phyloViz.net>). Τα minimal spanning trees ( $MS_{TREE}$ ) που χρησιμοποιήθηκαν για την οπτικοποίηση της γενετικής δομής των πληθυσμών των *E. coli* και *E. faecium* με βάση τη γενετική τους απόσταση, κατασκευάστηκαν με το λογισμικό PhyloViz (Francisco *et al.*, 2012)

### 3. Αποτελέσματα: *Escherichia coli*

#### 3.1. Καταμέτρηση των πληθυσμών *E. coli* που απομονώθηκαν στο κρέας των πουλερικών

Οι αριθμοί των πληθυσμών των *E. coli* προσδιορίστηκαν με καλλιεργητικές μεθόδους όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.2. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των συνολικών πληθυσμών, που υπολογίστηκαν ως ο γεωμετρικός μέσος όρος των τριών δειγμάτων που λήφθηκαν από κάθε πτηνοτροφική μονάδα, αποδίδονται με Boxplot (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Πληθυσμοί των *E.coli* στο κρέας των πουλερικών ως ο γεωμετρικός μέσος όρος των τριών δειγμάτων που λήφθηκαν από κάθε φάρμα σε log cfu/g

Ο πληθυσμός των ολικών *E. coli* ήταν παραπλήσιος και στις τρεις φάρμες A, B και Γ (3,28, 3,60 και 3,09 log cfu/g αντίστοιχα). Οι ανθεκτικοί στην αμπικιλίνη πληθυσμοί κυμαίνονταν σχεδόν στα ίδια επίπεδα με τους αντίστοιχους ολικούς πληθυσμούς και στις τρεις φάρμες (3,10, 3,53 και 3,19 log cfu/g). Οι πληθυσμοί της κεφοταξίμης για τις φάρμες B και Γ υπολογίστηκαν κοντά στο όριο ανίχνευσης (0,85 log cfu/g) ενώ στη φάρμα A ήταν πολύ μεγαλύτερος (2,63 log cfu/g). Οι πληθυσμοί της γενταμυκίνης στις φάρμες B και Γ ήταν επίσης κοντά στο όριο

ανίχνευσης (0,85 log cfu/g) ενώ στη φάρμα Α υπολογίστηκε συγκριτικά μεγαλύτερος (1,94 log cfu/g).

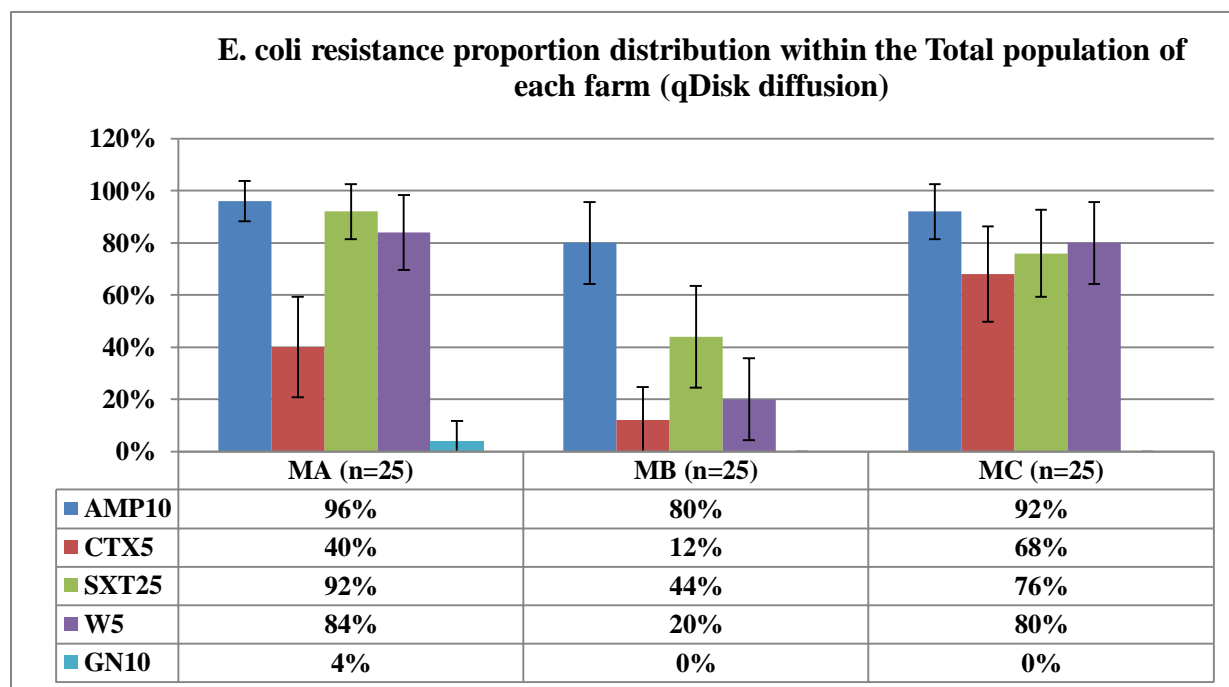
Στη φάρμα Α καταγράφηκαν τα εξής ποσοστά ανθεκτικότητας: 97% (+/- 20%) στην αμπικιλίνη, 36% (+/- 54%) στην κεφοταξίμη και 6% (+/- 27%) στη γενταμυκίνη. Στη φάρμα Β: 88% (+/- 37%) στην αμπικιλίνη, 0% (+/- 8%) στην κεφοταξίμη και 1% (+/- 8%) στη γενταμυκίνη. Στη φάρμα Γ: 82% (+/- 43%) στην αμπικιλίνη, 0% (+/- 7%) στην κεφοταξίμη και 0% (+/- 8%) στη γενταμυκίνη. Τα ποσοστά υπολογίστηκαν με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Τα μεγάλα διαστήματα σφάλματος οφείλονται στον μικρό αριθμό επαναλήψεων (μόνο τρεις ανά δειγματοληψία). Τα στενά χρονικά περιθώρια ολοκλήρωσης της παρούσας εργασίας και άλλοι λόγοι εργονομικότητας δυστυχώς δεν επέτρεψαν την πραγματοποίηση επιπλέον δειγματοληψιών.

### **3.2. Επιπολασμός της ανθεκτικότητας σε κάθε φάρμα**

Από τη φάρμα Α απομονώθηκαν 25 αποικίες *E. coli* από τον ολικό πληθυσμό, 25 από την αμπικιλίνη, 25 από την κεφοταξίμη και 25 από τη γενταμυκίνη. Από τη φάρμα Β απομονώθηκαν 25, 24, 9 και 12 αποικίες αντίστοιχα. Από τη φάρμα Γ απομονώθηκαν 25, 25, 3 και 4 αποικίες αντίστοιχα. Όλες εξετάστηκαν για την ευαισθησία τους με αντιβιοτικά δίσκια διάχυσης (υποκεφάλαιο 2.5.). Τα αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας (qDisk diffusion) φαίνονται στις εικόνες 5 και 6.

Από τους ολικούς πληθυσμούς (Total) παρατηρούμε ότι στις φάρμες Α και Γ καταγράφεται ένα προφίλ πολυανθεκτικότητας (εικόνα 5). Δηλαδή η πλειοψηφία των στελεχών που απομονώθηκαν στον ολικό πληθυσμό στις φάρμες Α και Γ, παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε περισσότερα από δύο αντιβιοτικά ταυτόχρονα. Συγκεκριμένα στη φάρμα Α από το σύνολο των 25 απομονώσεων, το 96% (+/- 8%) ήταν ανθεκτικές στην αμπικιλίνη, το 92% (+/- 11%) στην σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, το 84% (+/- 14%) στην τριμεθοπρίμη και το 40% (+/- 19%) στην κεφοταξίμη, ενώ μόλις το 4% (+/- 8%) ήταν ανθεκτικές στη γενταμυκίνη. Από τη φάρμα Γ σε σύνολο 25 απομονώσεων, το 92% (+/- 11%) ήταν ανθεκτικές στην αμπικιλίνη, το 80% (+/- 16%) στην τριμεθοπρίμη, το 76% (+/- 17%) στη σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη και το 68%

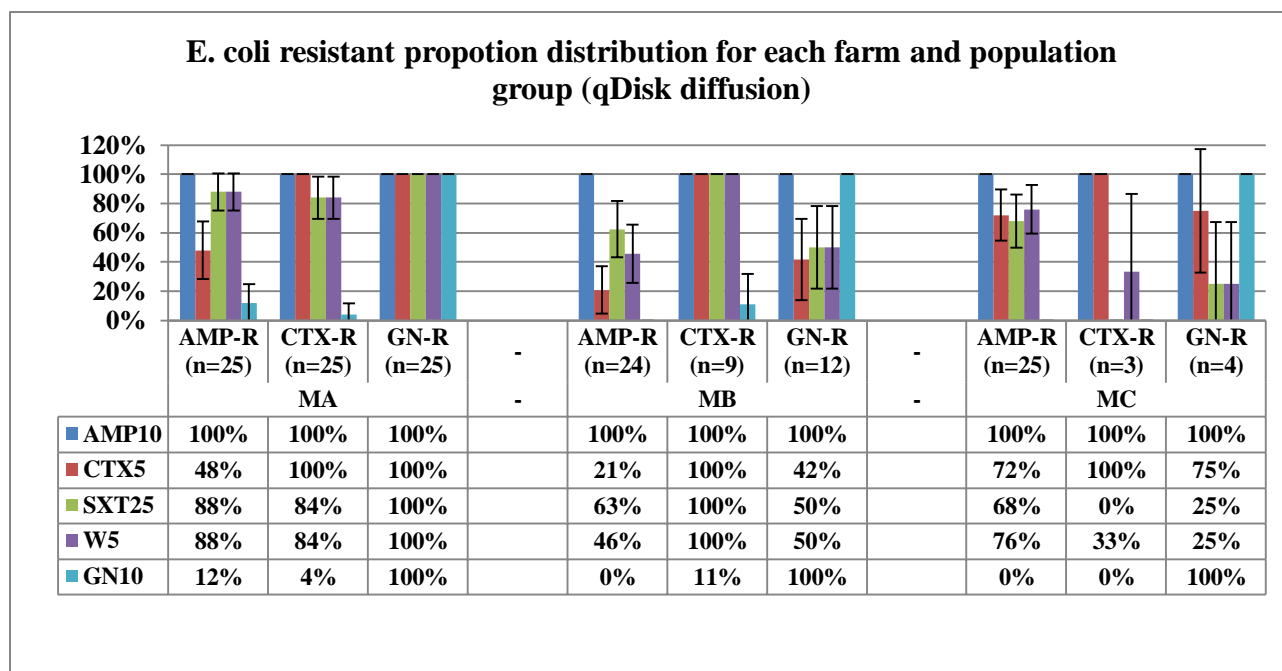
(+/- 18%) στην κεφοταξίμη. Στο σημείο αυτό παρατηρούμε μια αντίφαση: προηγουμένως αναφέρθηκε (υποκεφάλαιο 3.1.) ότι ο CTX-R πληθυσμός της φάρμας Γ ήταν κοντά στο όριο ανίχνευσης, ενώ από τα αποτελέσματα της δοκιμής ευαισθησίας φαίνεται να καταγράφεται σημαντική ανθεκτικότητα στην κεφοταξίμη ανάμεσα στον Total πληθυσμό της Γ (68%). Η αδυναμία ανάπτυξης αποικιών στα υποστρώματα με κεφοταξίμη στη φάρμα Γ, πιθανότατα να οφείλεται σε τεχνικό σφάλμα (προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας αντιβιοτικού κατά την παρασκευή του υποστρώματος ή μικρότερος όγκος ενοφθαλμισμού). Ο υψηλός επιπολασμός της ανθεκτικότητας στην κεφοταξίμη στη φάρμα Γ, φαίνεται και ανάμεσα στον AMP-R πληθυσμό της φάρμας Γ (72%) (εικόνα 6), γεγονός που επαληθεύει το αποτέλεσμα του Total πληθυσμού της Γ.



Εικόνα 5: Επιπολασμός της ανθεκτικότητας των *E. coli* στον ολικό πληθυσμό κάθε φάρμας με βάση τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης

Η φάρμα Β παρουσιάζει χαμηλότερο επιπολασμό της ανθεκτικότητας συγκριτικά με τις άλλες δύο, που περιορίζεται κυρίως στην αμικικιλίνη και τις σουλφοναμίδες. Συγκεκριμένα, από τις 25 απομονώσεις, το 80% (+/- 16%) ήταν ανθεκτικές στην αμικικιλίνη, το 44% (+/- 19%) στη σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, το 20% (+/- 16%) στην τριμεθοπρίμη και το 12% (+/- 10%) στην κεφοταξίμη. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι και στις τρεις φάρμες, ο επιπολασμός της

ανθεκτικότητας ανάμεσα στους AMP-R πληθυσμούς (εικόνα 6) και στους αντίστοιχους Total πληθυσμούς (εικόνα 5), κυμαίνεται στα ίδια σχεδόν επίπεδα. Άλλη σημαντική παρατήρηση είναι ότι ο GN-R πληθυσμός της φάρμας Α είναι εξολοκλήρου ανθεκτικός σε όλα τα αντιβιοτικά (εικόνα 6). Ωστόσο στον Total πληθυσμό της φάρμας Α, η ανθεκτικότητα στη γενταμυκίνη είναι πολύ μικρή (μόλις 4%).



Εικόνα 6: Επιπολασμός της ανθεκτικότητας των *E. coli* στους πληθυσμούς των αντιβιοτικών με βάση τη δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης

### 3.3. Φαινότυποι ανθεκτικότητας: κατανομή στον ολικό πληθυσμό κάθε φάρμας

Για συντόμευση της καταγραφής των προφίλ ανθεκτικότητας θα χρησιμοποιούνται οι κωδικοί “R” για ανθεκτικό και “S” για ευαίσθητο. Η σειρά αναφοράς αντιστοιχεί στα αντιβιοτικά δισκία ως εξής: AMP10, CTX5, SXT25, W5, GN10.

Στη φάρμα Α το 80% των απομονώσεων (n=20/25) κατανέμεται σε 2 συγκεκριμένους φαινότυπους πολυανθεκτικότητας: ο συχνότερος φαινότυπος είναι ο RSRRS με ποσοστό 48%

(+/- 20%) και ακολουθεί ο RRRRS με συχνότητα 32% (18%). Μόλις το 4% (+/- 5%) των απομονώσεων χαρακτηρίστηκε ευαίσθητο (SSSSS).

Στη φάρμα Β το 50% των απομονώσεων κατανέμεται στους «ευαίσθητους» φαινότυπους ως εξής: το 28% (+/- 18%) χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα μόνο στην αμπικιλίνη (RSSSS) που αποτελεί και το συχνότερο φαινότυπο, ενώ το 20% (+/- 16%) των απομονώσεων είναι ευαίσθητο σε όλες τις ομάδες αντιβιοτικών (SSSSS). Ακολουθεί ο φαινότυπος RSRRS με συχνότητα 16% (+/- 14%). Ο πολυανθεκτικός φαινότυπος RRRRR απουσιάζει εντελώς ενώ μία μόνο απομόνωση φέρει ανθεκτικότητα στην κεφοταξίμη.

Στη φάρμα Γ ο συχνότερος φαινότυπος με ποσοστό 56% (+/- 19%) είναι ο RRRRS, ενώ ακολουθεί με 20% (+/- 16%) ο φαινότυπος RSRRS. Επομένως φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση να επικρατούν οι ίδιοι πολυανθεκτικοί φαινότυποι με την φάρμα Α αλλά με αντίθετη σειρά.

Μέσα στα αποτελέσματα μας καταγράφηκε και ο φαινότυπος RSRSS ο οποίος είναι λανθασμένος και δεν λήφθηκε υπόψη γιατί αφενός ανευρέθηκε σε μικρό αριθμό απομονώσεων (16/227 *E.coli*), και αφετέρου δεν επηρεάζει τη συνολική εικόνα των αποτελεσμάτων.

### **3.4. Γονότυποι ανθεκτικότητας: επιπολασμός σε κάθε φάρμα**

#### **3.4.1. Ολικός πληθυσμός (Total)**

Στη φάρμα Α συναντώνται οι εξής ομάδες β-λακταμασών: η ομάδα TEM στο 76% (n=19/25), η CTX-M-1 στο 16% (n=4/25) και η CIT στο 20% (n=5/25) των απομονώσεων. Στη φάρμα Β καταγράφηκαν οι ομάδες TEM στο 72% (n=18/25) και SHV στο 8% (n=2/25) των απομονώσεων. Η φάρμα Γ χαρακτηρίζεται από την παρουσία των ομάδων TEM στο 76% (n=19/25), SHV στο 44% (n=11/25) και CIT στο 12% (n=3/25) των απομονώσεων.

Παρατηρούμε ότι η ομάδα TEM βρίσκεται στα ίδια επίπεδα και στις τρεις φάρμες. Επίσης η φάρμα Β στερείται της παρουσίας β-λακταμασών ευρέος φάσματος (CTX-M, AmpC), σε αντίθεση με τις φάρμες Α και Γ όπου ανευρίσκονται οι συγκεκριμένοι γονότυποι ανθεκτικότητας.

### 3.4.2. Πληθυσμός αμπικιλίνης (AMP-R)

Στην Α φάρμα η ομάδα TEM ανευρέθηκε στο 100% (n=25/25) των απομονώσεων, η SHV στο 12% (n=3/25), η CTX-M-1 στο 16% (n=4/25), η CTX-M-9 στο 4% (n=1/25) και η CIT στο 16% (n=4/25) των απομονώσεων. Στη φάρμα Β συναντώνται οι ομάδες TEM με συχνότητα 88% (n=22/25) και SHV 16% (n=4/25). Η φάρμα Γ χαρακτηρίζεται από τις ομάδες TEM (88%, n=22/25), SHV (28%, n=7/25) και CIT (20%, n=5/25).

Ο πληθυσμός της αμπικιλίνης παρουσιάζει παρόμοια κατανομή με τον ολικό πληθυσμό ως προς τη συχνότητα των γονότυπων ανθεκτικότητας στις τρεις φάρμες. Ωστόσο, καταγράφεται μια ελαφρώς αυξημένη επικράτηση τους λόγω της επιλογής της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

### 3.4.3. Πληθυσμός κεφοταξίμης (CTX-R)

Στη φάρμα Α βρέθηκαν οι ομάδες TEM (84%, n=21/25), SHV (4%, n=1/25), CTX-M-1 (48%, n=12/25), CTX-M-9 (16%, n=4/25) και CIT (50%, n=13/25). Στη φάρμα Β βρέθηκαν οι ομάδες TEM (100%, n=9/9), SHV (11%, n=1/9), CTX-M-1 (22%, n=2/9), CTX-M-9 (11%, n=1/9) και CIT (56%, n=5/9). Στη φάρμα Γ βρέθηκε μόνο η ομάδα CIT (25%, n=1/4).

Παρατηρούμε ότι ανάμεσα στον πληθυσμό της κεφοταξίμης είναι μεγαλύτερα τα ποσοστά επικράτησης των β-λακταμασών ευρέως φάσματος (CTX-M-1, CTX-M-9 και CIT) σε σύγκριση με τον ολικό πληθυσμό και τον πληθυσμό της αμπικιλίνης. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο λόγω της επιλογής της ανθεκτικότητας στην κεφοταξίμη.

### 3.4.4. Πληθυσμός γενταμικίνης (GN-R)

Στη φάρμα Α βρέθηκαν οι γονότυποι TEM (88%, n=22/25), CTX-M-9 (8%, n=2/25) και CIT (76%, n=19/25). Στη φάρμα Β βρέθηκαν οι γονότυποι TEM (100%, n=12/12), SHV (17%, n=2/12), και CTX-M-9 (25%, n=3/12). Στη φάρμα Γ καταγράφηκαν οι γονότυποι TEM (25%, n=1/4), CTX-M-1 (75%, n=3/4) και CIT (25%, n=1/4).

Αξιοσημείωτο είναι το υψηλό ποσοστό επικράτησης του γονότυπου CIT στη φάρμα Α, ενώ στη φάρμα Β δεν ανευρέθηκε σε καμία απομόνωση. Ο πληθυσμός της γενταμικίνης (όπως και της κεφοταξίμης) πιθανότατα φέρει και άλλα πλασμίδια ανθεκτικότητας εκτός των ESBLs.



### 3.5. Συσχέτιση γονότυπων ανθεκτικότητας με φαινότυπους ανθεκτικότητας

Από τα 227 *E. coli* μόνο οι 8 απομονώσεις ήταν ευαίσθητες σε όλα τα αντιβιοτικά (SSSSS), ενώ οι υπόλοιπες 219 έφεραν ανθεκτικότητα σε ένα τουλάχιστον αντιβιοτικό, συμπεριλαμβανομένης πάντοτε της αμπικιλίνης. Από τις 219 απομονώσεις *E. coli* με φαινότυπο ανθεκτικότητας, οι 12 στερούνται γονότυπου. Η ανθεκτικότητα σε αυτές τις περιπτώσεις κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται σε άλλους μηχανισμούς αντιβιοαντοχής (π.χ. γονίδια που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες - KPCs) που δεν εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη για λόγους εργονομικότητας.

Ο φαινότυπος RRRRR χαρακτηρίζεται κατά 52% (n=17/33) από το γονότυπο ανθεκτικότητας TEM-CIT-CTX-M-9. Το υπόλοιπο 48% κατανέμεται διάσπαρτα σε διάφορους συνδυασμούς γονότυπων. Ο φαινότυπος RRRRS χαρακτηρίζεται σε ποσοστό 75% (n=53/71) από τρεις κυρίως γονότυπους: τον TEM-CTX-M-1 κατά 31% (n=22/71), τον TEM-CIT-CTX-M-9 κατά 27% (n=19/72) και τον TEM-SHV κατά 17% (n=12/71). Οι φαινότυποι RSRRS και RSSSS χαρακτηρίζονται σχεδόν αποκλειστικά από τη μοναδική παρουσία του γονότυπου TEM σε ποσοστά 95% (n=42/44) και 94% (n=15/16) αντίστοιχα.

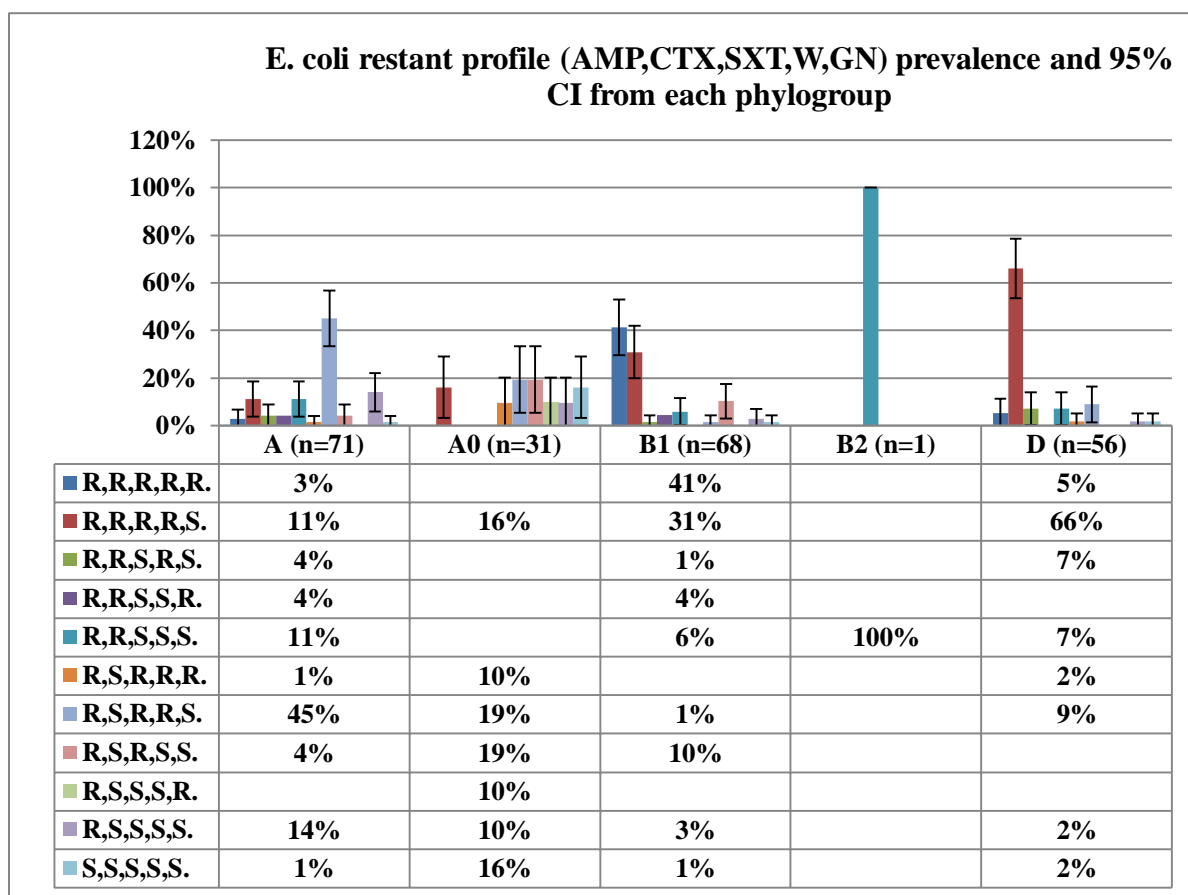
Οι ανθεκτικοί στην κεφοταξίμη φαινότυποι (RRRRR, RRRRS, RRSRS, RRSSR, RRSSS), συνοδεύονται σε ποσοστό 93% (n=126/135) από ένα τουλάχιστο γονότυπο ανθεκτικότητας, με τους επικρατέστερους να είναι οι TEM-CIT-CTX-M-9, TEM-CTX-M-1 και TEM-SHV, οι οποίοι καλύπτουν το 66% (n=83/126) των περιπτώσεων ανθεκτικότητας στην κεφοταξίμη. Η παρουσία των γονότυπων CTX-M-1, CTX-M-9 και CIT μόνων τους ή σε συνδυασμό με οποιοδήποτε άλλο γονότυπο, συνοδεύεται σε ποσοστό 98% (n=85/87) από φαινότυπο ανθεκτικό στην κεφοταξίμη. Ο γονότυπος CIT βρέθηκε στο 41% (n=55/135) των περιπτώσεων ανθεκτικότητας στην κεφοταξίμη και ο CTX-M στο 26% (n=35/135) των περιπτώσεων.

Οι γονότυποι OXA-1, CTX-M-2 και CTX-M-8/25 δεν ανευρέθηκαν σε καμία περίπτωση.

### 3.6. Φυλογενετικές ομάδες: συσχέτιση με φαινότυπο ανθεκτικότητας

Από το σύνολο των 227 *E.coli* το 31% ανήκουν στην ομάδα A, το 14% στην ομάδα A<sub>0</sub>, το 30% στην ομάδα B1, το 25% στην ομάδα D και το 0,4% στην ομάδα B2.

Το 99% (n=67/68) των *E.coli* της ομάδας B1 και το 96% (n=54/56) της ομάδας D, χαρακτηρίζονται από MDR φαινότυπους, ενώ το 81% (n=57/70) και 86% (n=48/56) εξ αυτών αντίστοιχα, φέρει ταυτόχρονη ανθεκτικότητα στην κεφοταξίμη. Το 79% (n=19/24) των *E.coli* που φέρουν τους “ευαίσθητους” φαινότυπους (SSSSS, RSSSS), ανήκουν στις ομάδες A και A<sub>0</sub>, ενώ το 86% (n=38/44) των *E.coli* που φέρουν τον φαινότυπο RSRRS ανήκει στις ομάδες A και A<sub>0</sub> (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας των *E. coli* σε κάθε φυλογενετική ομάδα

### 3.6.1. Ολικός πληθυσμός (Total)

Από τα 75 *E. coli* που απομονώθηκαν, το 44% ανήκει στην ομάδα A, το 13% στην ομάδα A<sub>0</sub>, το 19% στην ομάδα B1 και το 24% στην ομάδα D.

Στην A φάρμα το 60% (n=15/25) των απομονώσεων ανήκει στην ομάδα A, το 24% (n=6/25) στην ομάδα B1 και το 16% (n=4/25) στην ομάδα D. Η ομάδα A χαρακτηρίζεται κατά 80% (n=12/15) από το φαινότυπο RSRRS. Η ομάδα B1 φέρει τον MDR φαινότυπο RRRRS κατά 67% (n=4/6), ενώ η D χαρακτηρίζεται κατά 100% (n=4/4) από τον RRRRS.

Στη φάρμα B το 52% (n=13/25) του πληθυσμού ανήκει στην ομάδα A, το 28% (n=7/25) στην ομάδα B1, το 16% (n=4/25) στην ομάδα A<sub>0</sub> και μόλις το 4% (n=1/25) στην ομάδα D. Οι φαινότυποι RSSSS και RSRRS χαρακτηρίζουν το 62% (n=8/13) της ομάδας A και ο SSSSS το 75% (n=3/4) της ομάδας A<sub>0</sub>.

Στη φάρμα Γ το 52% του πληθυσμού ανήκει στην ομάδα D (n=13/25), το 24% (n=6/25) στην ομάδα A<sub>0</sub> και το 20% (n=5/25) στην ομάδα A, ενώ μόλις το 4% (n=1/25) ανήκει στη B1. Το 77% (n=10/13) της ομάδας D φέρει τον MDR φαινότυπο RRRRS. Το 67% (n=4/6) της ομάδας A<sub>0</sub> χαρακτηρίζεται από το φαινότυπο RSRRS και το υπόλοιπο 33% (n=2/6) από το φαινότυπο SSSSS.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το 92% (n=22/24) των απομονώσεων των ομάδων B1 και D στις φάρμες A και Γ, φέρουν MDR φαινότυπους με ταυτόχρονη ανθεκτικότητα στην κεφοταξίμη.

### 3.6.2. Πληθυσμός αμπικιλίνης (AMP-R)

Από τα 75 *E. coli* που απομονώθηκαν, το 38% ανήκει στην ομάδα A, το 17% στην ομάδα A<sub>0</sub>, το 22% στην ομάδα B1, το 22% στην ομάδα D και το 1% στην ομάδα B2.

Η κατανομή των φυλογενετικών ομάδων στις τρεις φάρμες είναι παρόμοια με αυτή του ολικού πληθυσμού. Στη φάρμα Γ, καταγράφηκε η μοναδική απομόνωση που ανήκει στην ομάδα B2 και φέρει φαινότυπο ανθεκτικό στην κεφοταξίμη (RRSSS).

### 3.6.3. Πληθυσμός κεφοταξίμης (CTX-R)

Από τα 37 *E.coli* που απομονώθηκαν, το 52% ανήκουν στην ομάδα D, το 32% στην ομάδα B1, το 11% στην ομάδα A και το 5% στην ομάδα A<sub>0</sub>.

Στη φάρμα Α το 84% (n=21/25) των απομονώσεων ανήκει στις ομάδες B1 (n=12/25) και D (n=9/25) και το υπόλοιπο 16% (n=4/25) στην ομάδα A. Στη φάρμα Β το 78% (n=7/9) των *E. coli* ανήκει στην ομάδα D και το υπόλοιπο 22% στην A<sub>0</sub>. Στη φάρμα Γ όλες οι απομονώσεις (n=3/3) ανήκουν στην ομάδα D. Ο επικρατέστερος φαινότυπος είναι ο RRRRS.

### 3.6.4. Πληθυσμός γενταμυκίνης (GN-R)

Από τα 41 *E.coli* που απομονώθηκαν, το 63% ανήκουν στην ομάδα B1, το 15% στην ομάδα A, το 15% στην ομάδα A<sub>0</sub> και το 7% στην ομάδα D.

Στη φάρμα Α το 92% (n=23/25) των απομονώσεων ανήκουν στην ομάδα B1 και όλες φέρουν τον MDR φαινότυπο RRRRR. Στη φάρμα Β παρατηρείται διάσπαρτη κατανομή ανάμεσα στις ομάδες A, 33% (n=4/12), A<sub>0</sub>, 42% (n=5/12) και D, 25% (n=3/12). Στη φάρμα Γ επικρατεί η ομάδα B1 με 75% (n=3/4) και φαινότυπο RRSSR. Η συντριπτική πλειοψηφία των *E.coli* του πληθυσμού GN-R στις φάρμες Α και Γ, ανήκουν στην ομάδα B1, σε αντίθεση με τη φάρμα Β όπου δεν απομονώθηκε κανένα B1.

### 3.7. Multi-locus sequence typing

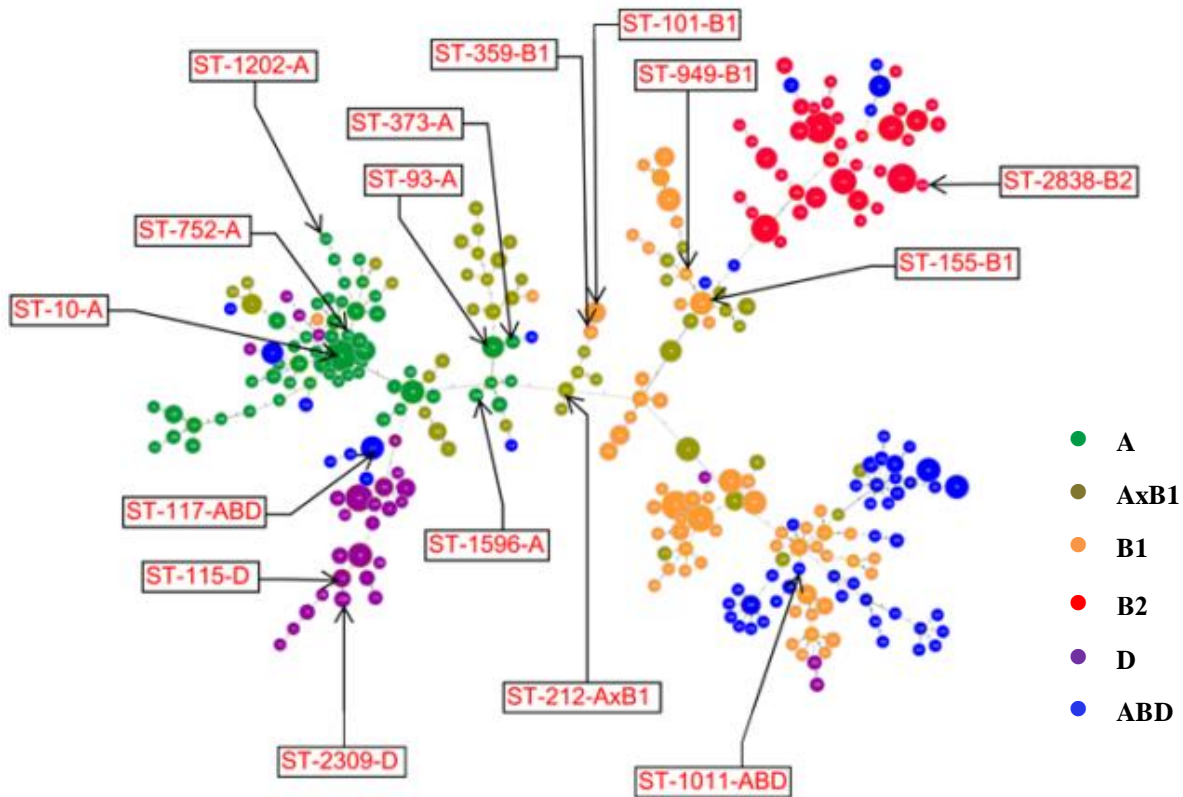
Από τα 37 στελέχη Ecom προέκυψαν 16 διαφορετικά STs: 10, 93, 101, 115, 117, 155, 212, 359, 373, 752, 949, 1011, 1202, 1596, 2309 και 2838. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του University College Cork (UCC) (<http://mlst.ucc.ie>), τα συγκεκριμένα STs έχουν απομονωθεί από κοτόπουλα και σε προηγούμενες μελέτες. Η απεικόνιση της γενετικής δομής του πληθυσμού των Ecom με βάση τα STs τους, φαίνεται στην εικόνα 8-10 (MS<sub>TREES</sub>:1-3). Στα MS<sub>TREES</sub>, οι αριθμοί πάνω στις διακλαδώσεις που συνδέουν τα STs, υποδηλώνουν τον αριθμό των αλληλόμορφων που διαφέρουν μεταξύ δύο παρακείμενων ST. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός αυτός, τόσο αυξάνεται η μεταξύ τους γενετική απόσταση.

Στο MS<sub>TREE1</sub> απεικονίζεται η κατανομή των 37 στελεχών Ecom με βάση τα STs τους, ανάμεσα σε 1584 στελέχη *E. coli* της βάσης δεδομένων MLST του UCC. Τα 1584 στελέχη UCC χαρακτηρίζονται από 291 διαφορετικά STs. Τα 291 STs των στελεχών UCC μαζί με τα 16 STs των στελεχών Ecom, αναλύθηκαν με τα προγράμματα Structure (version 2.3) (Evanno *et al.*, 2005) και BAPS (version 5.3) (Corander and Marttinen, 2006, Corander *et al.*, 2008) για την κατανομή τους στις φυλογενετικές ομάδες A, B1, B2, D καθώς και στις υβριδικές ομάδες AxB1 και ABD. Στην ομάδα A ανήκουν τα ST10, 93, 373, 752, 1202 και 1596. Στην ομάδα AxB1 ανήκει το ST212 και στην ομάδα B1 ανήκουν τα ST101, 155, 359 και 949. Η μοναδική απομόνωση της ομάδας B2 ανήκει στο ST2838, ενώ στην ομάδα D ανήκουν τα ST115 και 2309. Τέλος, στην ομάδα ABD ανήκουν τα ST117 και 1011. Με βάση τα αποτελέσματα μας, παρατηρούμε ότι τα στελέχη των *E. coli* από τα κοτόπουλα, κατανέμονται διάσπαρτα μέσα σε όλο τον πληθυσμό του είδους.

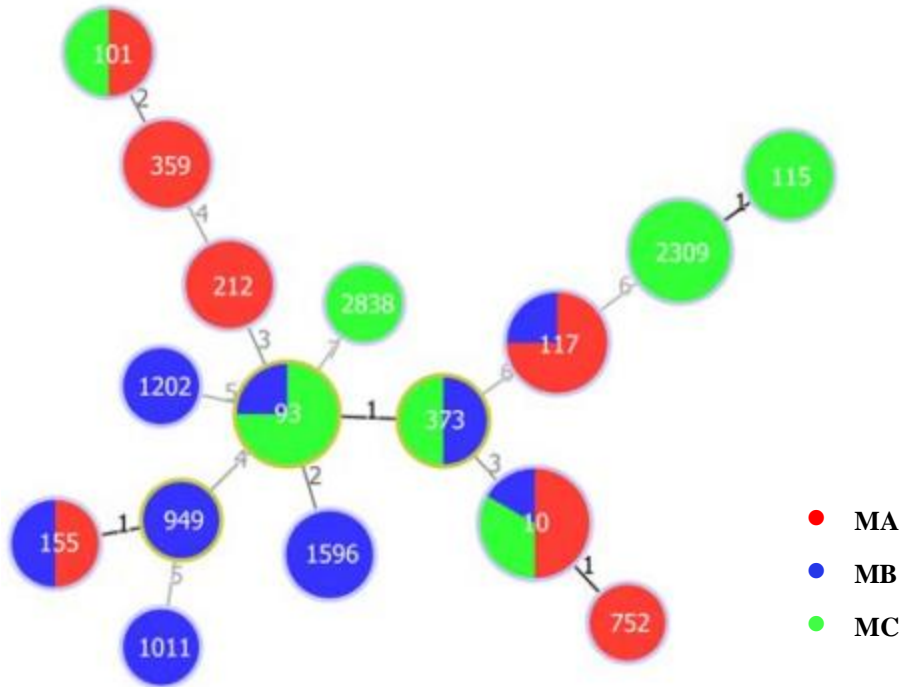
Στο MS<sub>TREE2</sub> φαίνεται η κατανομή των STs ανάμεσα στις τρεις φάρμες. Από το σύνολο των 16 STs, το ST-10 είναι το μοναδικό που ανευρέθηκε και στις τρεις φάρμες. Γενικά παρατηρούμε ότι κάθε φάρμα τείνει να χαρακτηρίζεται από διαφορετικά στελέχη *E. coli*, αφού από τα υπόλοιπα 15 STs, τα 10 έχουν μοναδική εντόπιση. Στη φάρμα A ταυτοποιήθηκαν τα ST10, 101, 117, 155, 212, 359, 752, στη φάρμα B τα ST10, 93, 117, 155, 373, 949, 1011, 1202, 1596 και στη φάρμα Γ τα ST10, 93, 101, 115, 373, 2309, 2838.

Στο MS<sub>TREE3</sub> απεικονίζεται η κατανομή των STs ανάμεσα στους φαινότυπους ανθεκτικότητας. Το ST10 της ομάδας A παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία, αφού περιλαμβάνει

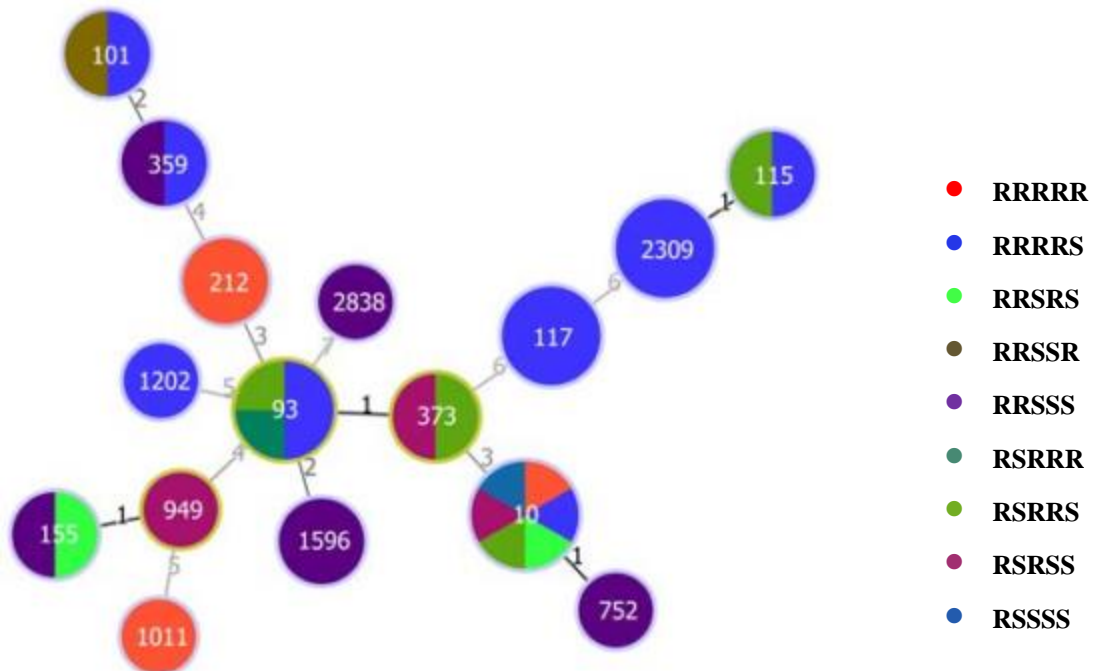
απομονώσεις με ανθεκτικότητα μόνο στην αμπικιλίνη, έως ανθεκτικές σε όλα τα αντιβιοτικά. Όλα τα STs των ομάδων D και ABD (115, 117, 1011, 2309) χαρακτηρίζονται από MDR φαινότυπους, ανθεκτικούς στην κεφοταξίμη. Τα STs της ομάδας B1 χαρακτηρίζονται επίσης από ανθεκτικότητα στην κεφοταξίμη, με εξαίρεση το ST949 που βρέθηκε στη φάρμα B, το οποίο ήταν το μοναδικό της ομάδας B1 με ευαίσθητο φαινότυπο στην κεφοταξίμη.



Εικόνα 8: MS<sub>TREE1</sub>: Γενετική δομή των 16 STs των 37 Ecom και κατανομή τους ανάμεσα στα 291 STs των 1584 *E. coli* της βάσης δεδομένων MLST του UCC



Εικόνα 9: MS<sub>TREE2</sub>: Γενετική δομή των 16 STs των 37 Ecom και κατανομή τους ανάμεσα στις τρεις φάρμες

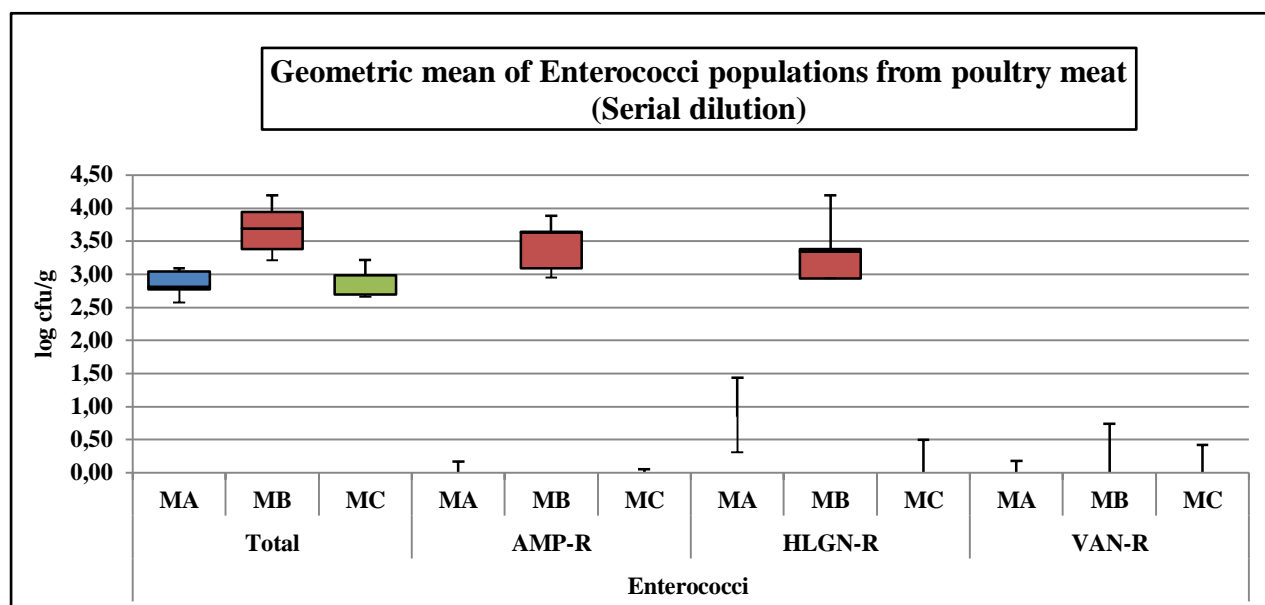


Εικόνα 10: MS<sub>TREE3</sub>: Γενετική δομή των 16 STs των 37 Ecom και κατανομή τους ανάμεσα στους φαινότυπους ανθεκτικότητας (AMP, CTX, SXT, W, GN)

## 4. Αποτελέσματα: *Enterococcus* spp

### 4.1. Καταμέτρηση των πληθυσμών *Enterococcus* spp που απομονώθηκαν στο κρέας των πουλερικών

Οι πληθυσμοί των enterococci προσδιορίστηκαν με καλλιεργητικές μεθόδους όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.2. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των συνολικών πληθυσμών, που υπολογίστηκαν ως ο γεωμετρικός μέσος όρος των τριών δειγμάτων που λήφθηκαν από κάθε πτηνοτροφική μονάδα, φαίνονται με μορφή Boxplot (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Πληθυσμοί των *Enterococcus* spp στο κρέας των πουλερικών ως ο γεωμετρικός μέσος όρος των τριών δειγμάτων που λήφθηκαν από κάθε φάρμα σε log cfu/g

Ο ολικός πληθυσμός στις φάρμες Α και Γ υπολογίστηκε σε παρόμοια επίπεδα (2,82 και 2,70 log cfu/g) ενώ στη φάρμα Β ήταν ελαφρώς υψηλότερος (3,69 log cfu/g). Οι AMP-R και HLG-N-R πληθυσμοί στις φάρμες Α και Γ ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, σε αντίθεση με τη φάρμα Β όπου υπολογίστηκαν AMP-R και HLG-N-R πληθυσμοί, παραπλήσιοι του ολικού (3,63 και 3,34 log cfu/g αντίστοιχα). Στα υποστρώματα με βανκομυκίνη δεν αναπτύχθηκαν ανθεκτικές αποικίες σε καμία φάρμα.



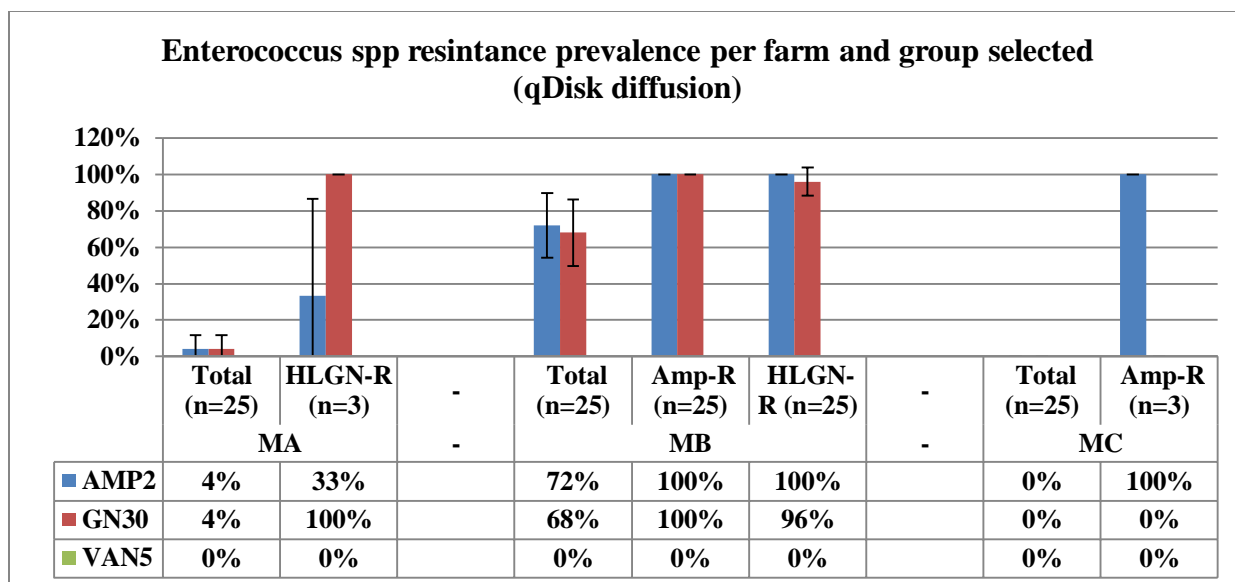
Τα ποσοστά ανθεκτικότητας στις τρεις φάρμες έχουν ως εξής: στη φάρμα Α 0% (+/- 4%) στην αμπικιλίνη και 1% (+/- 10%) στην HLGΝ, στη φάρμα Β 42% (+/- 56%) στην αμπικιλίνη και 28% (+/- 51%) στην HLGΝ και στη φάρμα Γ 0% (+/- 4%) στην αμπικιλίνη και 0% (+/- 4%) στην HLGΝ. Τα ποσοστά υπολογίστηκαν με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Όπως και στην περίπτωση των *E. coli*, τα μεγάλα διαστήματα σφάλματος οφείλονται στον μικρό αριθμό επαναλήψεων (μόνο τρεις ανά δειγματοληψία), που για τους λόγους που επεξηγήθηκαν προηγουμένως, δεν κατέστη δυνατό να βελτιωθούν.

## **4.2. Επιπολασμός της ανθεκτικότητας σε κάθε φάρμα**

Από την φάρμα Α απομονώθηκαν 25 αποικίες enterococci από τον ολικό πληθυσμό (Total) και 3 από τον πληθυσμό της γενταμυκίνης υψηλής συγκέντρωσης (HLGN-R). Από τη φάρμα Β απομονώθηκαν 25 αποικίες από τον ολικό πληθυσμό, 25 από τον πληθυσμό της αμπικιλίνης (AMP-R) και 25 από τον HLGΝ-R. Από τη φάρμα Γ απομονώθηκαν 24 αποικίες από τον ολικό πληθυσμό και 3 από τον AMP-R. Όλες εξετάστηκαν για την ευαισθησία τους με αντιβιοτικά δισκία διάχυσης (βλέπε 2.5.). Τα αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας φαίνονται στην εικόνα 12. Από τον ολικό πληθυσμό της φάρμας Α, μόνο το 8% ήταν ανθεκτικό στα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης (4% στην αμπικιλίνη και 4% στην HLGΝ), γεγονός που επαληθεύει τα προηγούμενα ευρήματα στα θρεπτικά υποστρώματα με τα αντιβιοτικά (οι πληθυσμοί των ανθεκτικών enterococci ήταν κατώτεροι του ορίου ανίχνευσης στη φάρμα Α).

Στη φάρμα Β, το 72% του ολικού πληθυσμού ήταν ανθεκτικό στην αμπικιλίνη και το 68% στην HLGΝ. Όλες οι απομονώσεις του πληθυσμού AMP-R φέρουν ταυτόχρονη ανθεκτικότητα στην HLGΝ, ενώ παράλληλα το 96% των απομονώσεων του πληθυσμού HLGΝ-R είναι ανθεκτικές και στην αμπικιλίνη.

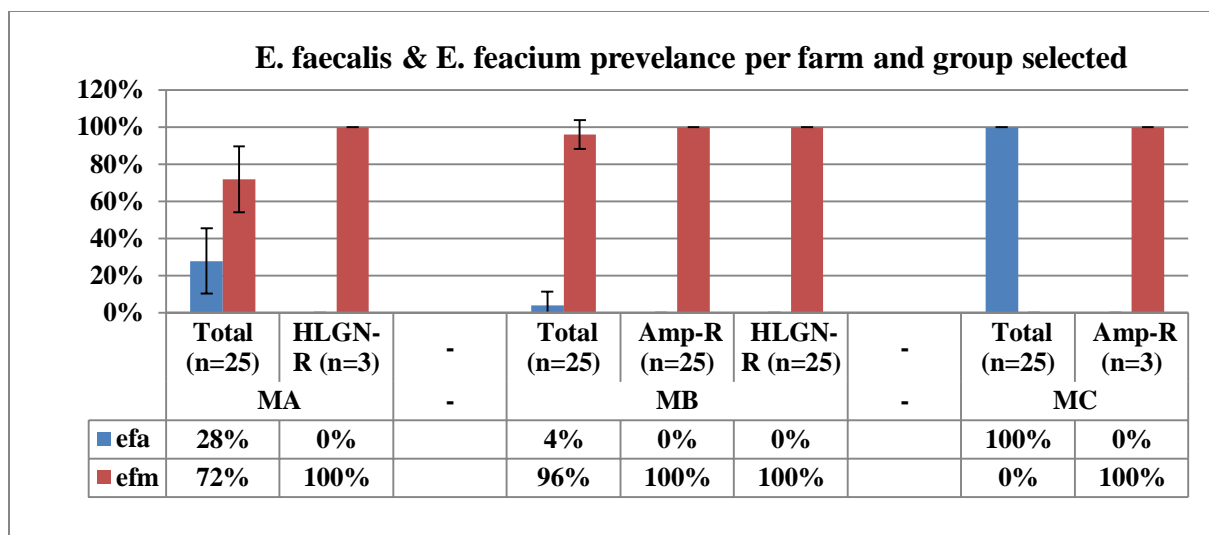
Στη φάρμα Γ ο ολικός πληθυσμός των enterococci παρουσιάζεται ευαίσθητος και στα δύο αντιβιοτικά κατά τον έλεγχο με τα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης, γεγονός που συνάδει και με τα προηγούμενα ευρήματα στα θρεπτικά υποστρώματα με τα αντιβιοτικά (οι πληθυσμοί των ανθεκτικών enterococci ήταν κατώτεροι του ορίου ανίχνευσης στη φάρμα Γ).



Εικόνα 12: Επιπολασμός της ανθεκτικότητας των *Enterococcus* spp σε κάθε φάρμα και πληθυσμιακή ομάδα με βάση τη δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης

### 4.3. Επιπολασμός των *E. faecalis* και *E. faecium* σε κάθε φάρμα

Απομονώθηκαν συνολικά 98 αποικίες *E. faecium* και 32 αποικίες *E. faecalis*. Η κατανομή τους σε κάθε φάρμα φαίνεται στην εικόνα 13. Η φάρμα Α αποικείται κατά 72% από τον *E. faecium* και κατά 28% (n=7/25) από τον *E. faecalis*. Η φάρμα Β αποικείται κατά 96% από τον *E. faecium* (n=24/25) και κατά 4% από τον *E. faecalis* (n=1/25), ενώ από τη φάρμα Γ απομονώθηκαν μόνο *E. faecalis*. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες ανεξαιρέτως οι απομονώσεις από τους πληθυσμούς AMP-R και HLG-N-R, είναι στελέχη του *E. faecium*.

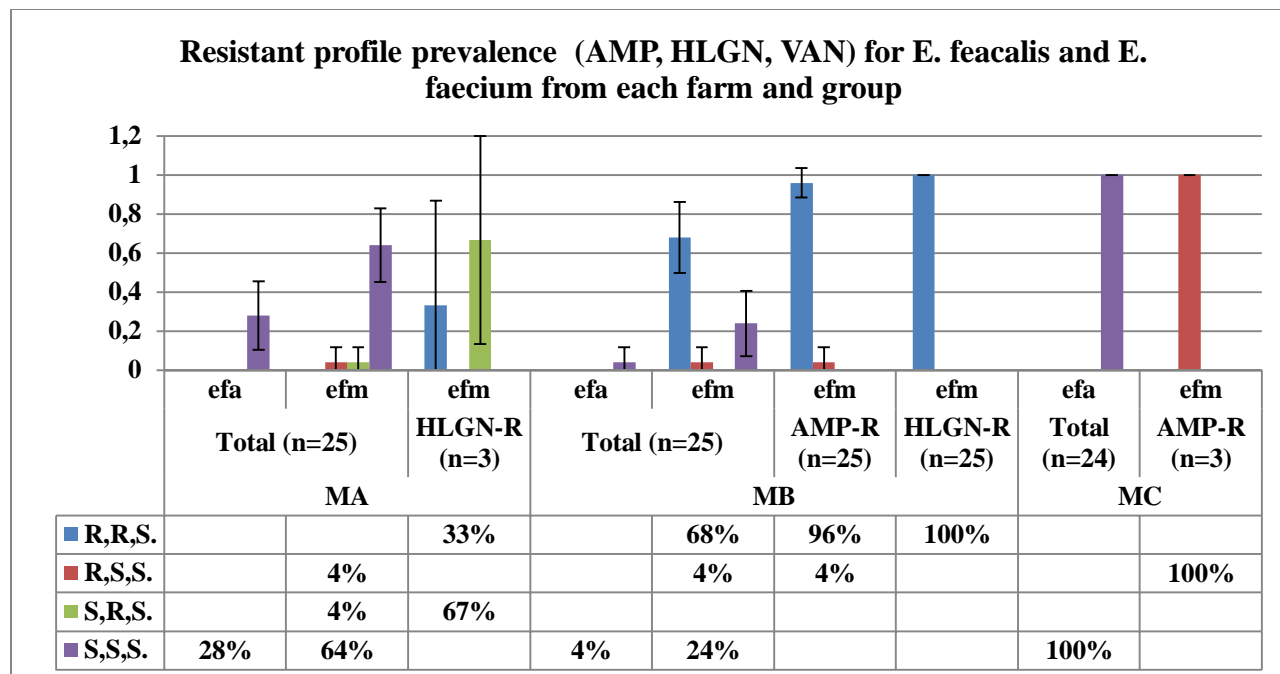


Εικόνα 13: Επιπολασμός των *E. faecalis* και *E. faecium* σε κάθε φάρμα και πληθυσμιακή ομάδα

#### 4.4. Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας ανάμεσα στους *E. faecalis* και *E. faecium*

Για συντόμευση της καταγραφής των προφίλ ανθεκτικότητας, χρησιμοποιούνται τα αρχικά “S” (ευαίσθητο) και “R” (ανθεκτικό), με σειρά αναφοράς στα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης ως εξής: AMP2, GN30, VAN5.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 14, όλες οι απομονώσεις με φαινότυπο ανθεκτικό στην αμπικιλίνη ή/και στην HLGN (RRS, RSS, SRS) ανήκουν στο είδος του *E. faecium*. Όλοι οι *E. faecalis* είναι ευαίσθητοι και στις τρεις φάρμες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στον ολικό πληθυσμό (total) της φάρμας A, οι απομονώσεις του *E. faecium* είναι κατά 89% (64/72) ευαίσθητες (SSS), σε αντίθεση με τη φάρμα B, όπου οι αντίστοιχες απομονώσεις του *E. faecium* είναι κατά 75% (72/96) ανθεκτικές στα αντιβιοτικά δισκία (RRS, RSS). Η σαφής αυτή φαινοτυπική αντίθεση, εγείρει υποψίες ότι η γενετική σύνθεση των πληθυσμών του *E. faecium* στις φάρμες A και B, διαφέρει σημαντικά.

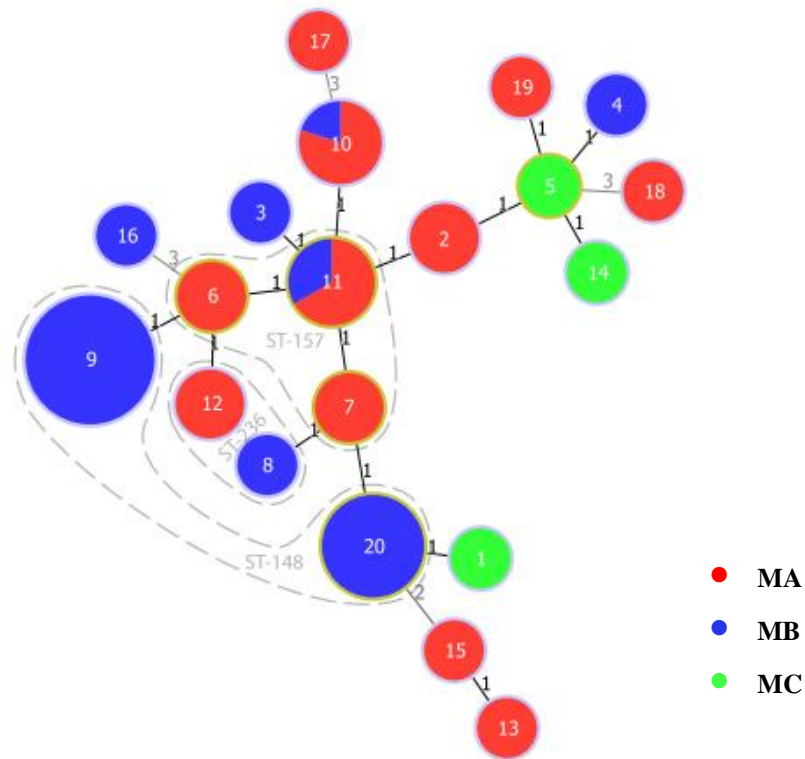


Εικόνα 14: Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας ανάμεσα στους *E. faecalis* και *E. faecium* σε κάθε φάρμα και πληθυσμιακή ομάδα

#### 4.5. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis

Η ανάλυση MLVA έξι γενετικών τόπων των 98 απομονώσεων *E. faecium* από τις τρεις φάρμες, αποκάλυψε 20 διαφορετικά προφίλ MLVA. Επειδή η πλειοψηφία των προφίλ που ανευρέθηκαν δεν έχουν υποβληθεί ποτέ προηγουμένως στη βάση δεδομένων του University Medical Center Utrecht (UMC/<http://www.umcutrecht.nl>), δεν υπήρχε ακριβής αντιστοιχία με τα διαθέσιμα MTs. Για το λόγο αυτό, σε κάθε προφίλ MLVA δόθηκε ένας κωδικός αριθμός MT από 1 έως 20. Σε κάθε κωδικό MT αντιστοιχεί ένα σύνολο από πιθανά MTs της βάσης δεδομένων, τα οποία επιλέχθηκαν με βάση την εγγύτερη γενετική απόσταση ως προς το προφίλ αλληλομόρφων (single, double και triple locus variant – βλέπε παράρτημα: πίνακας 15).

Το MT9 (54%, n=53/98) βρέθηκε ότι είναι ο συχνότερος γονότυπος και ακολουθεί το MT20 (14%, n=14/98). Όπως φαίνεται στο MS<sub>TREE</sub> της εικόνας 15, τα MT9 και 20 ανευρέθηκαν αποκλειστικά στη φάρμα Β και μαζί χαρακτηρίζουν το 91% (n=67/74) των *E. faecium* της φάρμας Β. Τα MT10 και 11 είναι τα μόνα που ανευρέθηκαν σε δύο φάρμες (Α και Β). Στη φάρμα Β κυριαρχούν ξεκάθαρα, συγκεκριμένα στελέχη *E. faecium* (MT9, MT20). Αντίθετα, στη φάρμα Α υπάρχει ποικιλομορφία ανάμεσα στον πληθυσμό του *E. faecium*, ενώ στη φάρμα Γ τα τρία μοναδικά στελέχη του *E. faecium* ανήκουν σε τρία διαφορετικά MTs (MT1, MT5, MT14).



Εικόνα 15: MS<sub>TREE4</sub>: Γενετική δομή του πληθυσμού των 98 *E. faecium* με βάση τα MT τους και κατανομή τους ανάμεσα στις τρεις φάρμες. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν ποια MTs περιλαμβάνονται στα κυριότερα STs.

#### 4.6. Multi-locus sequence typing

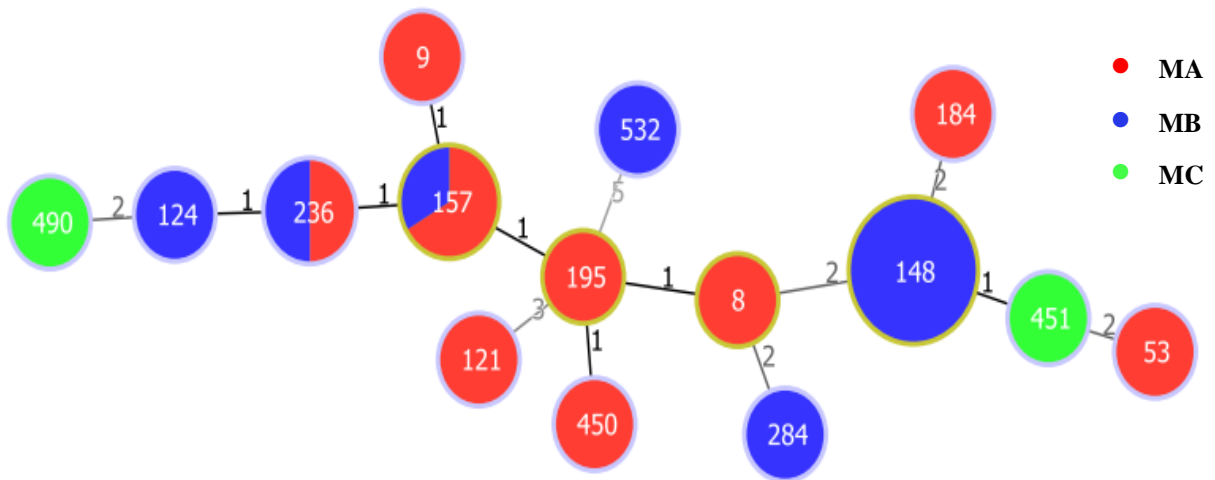
Για την επιβεβαίωση της γενετικής συσχέτισης των MTs που βρέθηκαν, επιλέχθηκαν 28 αντιπροσωπευτικά στελέχη *E. faecium* και αναλύθηκαν με MLST. Από την ανάλυση MLST προέκυψαν 15 διαφορετικά STs: 8, 9, 53, 121, 124, 148, 157, 184, 195, 236, 284, 450, 451, 490 και 532. Από το MT9 αναλύθηκαν οκτώ στελέχη και από το MT20 τρία στελέχη και βρέθηκε ότι όλα ανήκουν στον ίδιο τύπο αλληλουχίας ST148 (εικόνα 15). Για την αντιστοιχία των MTs με τα STs βλέπε παράρτημα πίνακας 16.

Στην εικόνα 16 φαίνεται η κατανομή των 28 *E. faecium* με βάση τα ST τους ανάμεσα στις τρεις φάρμες. Στη φάρμα Β ο πληθυσμός του *E. faecium* τείνει να γίνει ομοιογενής και χαρακτηρίζεται από τον αποικισμό συγκεκριμένου στελέχους, του ST148. Στη φάρμα Α ο

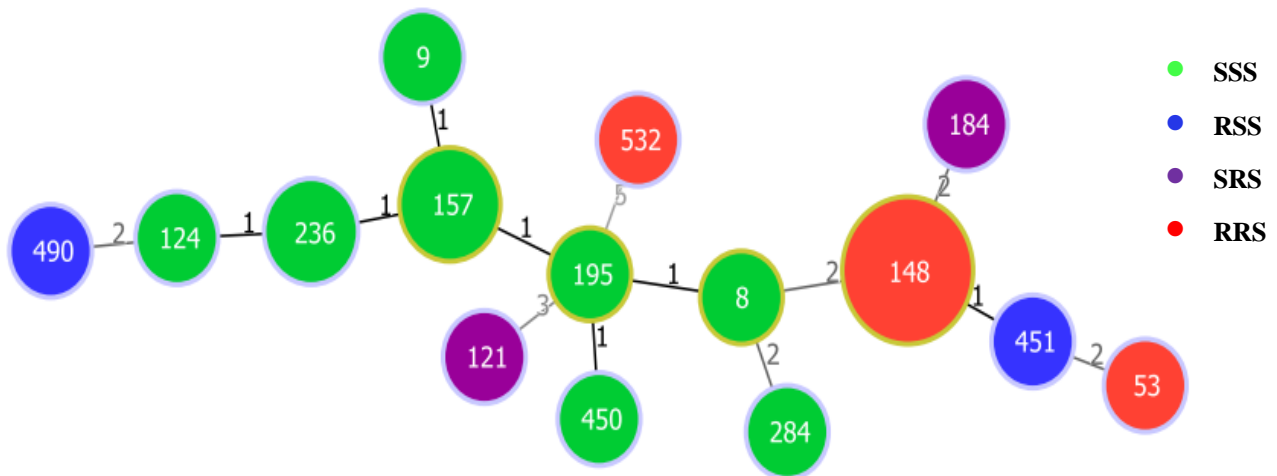
πληθυσμός του *E. faecium* παρουσιάζει ποικιλομορφία στη γενετική του σύνθεση, ενώ στη φάρμα Γ βρέθηκαν μόνο τα στελέχη ST490 και ST451.

Παρατηρούμε ότι η εικόνα της γενετικής δομής των πληθυσμών του *E. faecium* στις τρεις φάρμες με βάση τα ST τους, επαληθεύει την αντίστοιχη με βάση τα MT. Επομένως, η μέθοδος MLVA είναι χρήσιμη για την ταχεία και φτηνή ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, για την απόδοση μιας αξιόπιστης εικόνας της γενετικής σύνθεσης ενός άγνωστου πληθυσμού.

Η εικόνα 17 δείχνει τη γενετική δομή των 28 *E. faecium* με βάση τα ST τους, σε συνάρτηση με τα προφίλ ανθεκτικότητας. Για σύντομη καταγραφή των προφίλ ανθεκτικότητας θα χρησιμοποιούνται οι κωδικοί “S” για ευαίσθητο και “R” για ανθεκτικό. Η σειρά αναφοράς αντιστοιχεί στα αντιβιοτικά δισκία AMP2, GN30, VAN5. Τα στελέχη του ST148 που αποικίζουν αποκλειστικά τη φάρμα Β, είναι όλα ανθεκτικά στην αμπικιλίνη και στη γενταμυκίνη υψηλής συγκέντρωσης (κόκκινο προφίλ). Τα ST8, ST9, ST157, ST195, ST236 και ST450 που βρέθηκαν στη φάρμα Α, είναι ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά (πράσινο προφίλ). Τα ST53, ST121 και ST184 αντιπροσωπεύουν τα τρία μοναδικά ανθεκτικά στελέχη *E. faecium* που βρέθηκαν στη φάρμα Α. Τα ST451 και ST490 που βρέθηκαν στη φάρμα Γ, χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Παρατηρούμε ότι υπάρχει σαφής γενετικός και φαινοτυπικός διαχωρισμός των στελεχών του *E. faecium* από φάρμα σε φάρμα.



Εικόνα 16: MS<sub>TREE5</sub>: Γενετική δομή του πληθυσμού των 28 *E. faecium* με βάση τα ST τους και κατανομή τους ανάμεσα στις τρεις φάρμες



Εικόνα 17: MS<sub>TREE6</sub>: Γενετική δομή του πληθυσμού των 28 *E. faecium* με βάση τα ST τους και κατανομή τους ανάμεσα στα προφίλ ανθεκτικότητας



## 5. Συζήτηση

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να χαρακτηρίσει τους πληθυσμούς *E.coli* και *Enterococcus* spp που απομονώνονται στο κρέας των πουλερικών της Κύπρου. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε δύο επίπεδα: φαινοτυπικά και γονοτυπικά. Παράλληλα έγινε σύγκριση της σύνθεσης των πληθυσμών των δύο βακτηρίων στις τρεις διαφορετικές φάρμες.

### 5.1. *Escherichia coli*

Από την καταμέτρηση των ολικών πληθυσμών των *E. coli*, προκύπτει ότι το μικροβιακό φορτίο βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα και στις τρεις φάρμες. Οι πληθυσμοί της αμπικιλίνης είναι περίπου στα ίδια επίπεδα με τους ολικούς πληθυσμούς σε όλες τις φάρμες, γεγονός που αποδεικνύει την ευρύτητα διαδεδομένη ανθεκτικότητα των Gram-αρνητικών βακτηρίων στην αμπικιλίνη. Οι αμπικιλίνες και τα παράγωγα τους θεωρούνται πλέον «αχρηστευμένη» ομάδα αντιβιοτικών σε ότι αφορά τη δράση τους στα *Enterobacteriaceae* (Jiang *et al.*, 2011).

Στον έλεγχο με τα αντιβιοτικά δισκία αποδείχτηκε ότι η ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη είναι εδραιωμένη σε όλες τις φάρμες (96%, 80%, 92% αντίστοιχα). Οι φάρμες Α και Γ έχουν αυξημένα ποσοστά ανθεκτικότητας στην κεφοταξίμη (40% και 68% αντίστοιχα), σε αντίθεση με τη φάρμα Β όπου το πρόβλημα είναι μικρό (4%). Η ανθεκτικότητα στην τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη είναι παρούσα και στις τρεις φάρμες (92%, 44%, 76%), αλλά στις Α και Γ είναι σαφώς υψηλότερη συγκριτικά με τη Β. Στις φάρμες Α και Γ επικρατούν πολυανθεκτικοί φαινότυποι (80%, RRRRS και RSRRS), ενώ στη Β ευαίσθητοι φαινότυποι (50%, SSSSS και RSSSS). Ο φαινότυπος RSRRS που υποδηλώνει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη είναι σταθερό εύρημα και στις τρεις φάρμες.

Είναι αποδεδειγμένο ότι τα προφίλ ανθεκτικότητας καθορίζονται από την αντιμικροβιακή στρατηγική που εφαρμόζεται (Obeng *et al.*, 2012, Gyles, 2008). Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, πιστεύουμε ότι ο φαινότυπος ανθεκτικότητας RSRRS είναι ο πλέον συνήθης ανάμεσα στα κοτόπουλα, λόγω της ευρείας χρήσης των σουλφοναμιδών στην πτηνοτροφία ως κοκκιδιοστατικά. Επίσης, αν θεωρήσουμε δεδομένο ότι τηρείται η εθνική νομοθεσία που απαγορεύει τη χρήση των κεφαλοσπορινών στα κοτόπουλα, τότε η αυξημένη ανθεκτικότητα στην κεφοταξίμη που παρατηρείται στις φάρμες Α και Γ, αποδίδεται στη χρήση

φλουροκινολόνων στις συγκεκριμένες φάρμες, και εξηγείται από το φαινόμενο της συν-ανθεκτικότητας. Είναι δηλαδή πιθανή η ύπαρξη μηχανισμών PMQR ανάμεσα στους πληθυσμούς των *E. coli* στις φάρμες Α και Γ. Η παρουσία πλασμιδίων τα οποία μεταφέρουν γονίδια *qnr*, μαζί με *bla*<sub>CTX-M</sub>, *ampC* και γονίδια ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες, τις σουλφοναμίδες και την τριμεθοπρίμη πάνω σε ενιαίες γονιδιακές κασέττες, εξηγεί την επικράτηση των πολυανθεκτικών φαινότυπων στις φάρμες Α και Γ. Γονίδια *qnr* έχουν περιγραφεί σε απομονώσεις *E. coli* από κοτόπουλα στην Κίνα (Yue *et al.*, 2011), από χοίρους στην Ουγγαρία (Szmolka *et al.*, 2011) και από άλογα στην Ιταλία (Dolejska *et al.*, 2011). Αντίθετα στη φάρμα Β, όπου επικρατούν ευαίσθητοι φαινότυποι και η ανθεκτικότητα στην κεφοταξίμη είναι χαμηλή, θεωρούμε ότι δεν γίνεται χρήση κινολόνων.

Οι β-λακταμάσες στενού φάσματος, TEM και SHV, ανευρέθηκαν σε όλες τις φάρμες, ενώ ο γονότυπος TEM ανευρέθηκε στα ίδια υψηλά επίπεδα και στις τρεις φάρμες. Η ευρεία διάδοση του γονότυπου TEM (85%, n=185/227) εξηγεί και την διαδεδομένη ανθεκτικότητα των *E. coli* έναντι στην αμπικιλίνη (96%, n=219/227). Οι β-λακταμάσες ευρέως φάσματος, CTX-M και AmpC, ανευρέθηκαν μόνο στις φάρμες Α και Γ ενώ απουσιάζουν πλήρως από τα στελέχη της φάρμας Β. Το γεγονός αυτό, επαληθεύει την αυξημένη ανθεκτικότητα που καταγράφηκε στις φάρμες Α και Γ έναντι στην κεφοταξίμη. Επιπρόσθετα, ενισχύει την υπόθεση ότι εφόσον η χρήση κεφαλοσπορινών στα κοτόπουλα απαγορεύεται, η παρουσία των ESBLs στις φάρμες Α και Γ, οφείλεται στην συν-επιλογή της ανθεκτικότητας από φλουροκινολόνες.

Η επικράτηση των CTX-M ενζύμων διαφέρει γεωγραφικά. Ο CTX-M-1 είναι ο επικρατέστερος τύπος στο κρέας πουλερικών στην Μ. Βρετανία (Randall *et al.*, 2010), στη Γαλλία (Girlich *et al.*, 2007) και στην Ολλανδία (Overdevest *et al.*, 2010) ενώ στην Ισπανία επικρατεί ο τύπος CTX-M-9 (Cortés *et al.*, 2010). Στην Άπω Ανατολή επικρατούν οι τύποι CTX-M-14/-15 (Hasan *et al.*, 2012), ενώ στη Ν. Αμερική ο τύπος CTX-M-2 (Bonnet, 2004). Τα αποτελέσματα μας είναι συμβατά με την υπόλοιπη Ευρώπη αφού ο επικρατέστερος τύπος ήταν ο CTX-M-1 (11%, n=25/227) και ακολουθεί ο CTX-M-9 (5%, n=11/227). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται δραματική αύξηση του επιπολασμού των ESBLs σε απομονώσεις των *E. coli* από κλινικά δείγματα σε ανθρώπους, γεγονός που συμβαδίζει με την αυξημένη παρουσία των ESBLs στο κρέας των πουλερικών στην Ευρώπη (Overdevest *et al.*, 2010, Johnson *et al.*, 2012). Η συν-

επιλογή της ανθεκτικότητας ιδιαίτερα στις φλουροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες και σουλφοναμίδες συνέβαλε στην διάδοση του προβλήματος (Coque *et al.*, 2008).

Από τα 227 στελέχη *E. coli* το 45% (n=102) ανήκει στην ομάδα A (η ομάδα A<sub>0</sub> συνυπολογίστηκε ως A), το 30% (n=68) στην ομάδα B1 και το 25% (n=56) στην ομάδα D. Μια μόνο απομόνωση ανήκει στην ομάδα B2. Τα υψηλότερα ποσοστά των ομάδων A και B1 εξηγούνται από το γεγονός ότι τα στελέχη προέρχονται από υγιή κοτόπουλα τα οποία επιθεωρήθηκαν πριν τη σφαγή. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες στις οποίες οι φυλογενετικές ομάδες A και B1 είναι οι επικρατέστερες ανάμεσα στα πουλερικά (Obeng *et al.*, 2012, Unno *et al.*, 2009).

Το 70% (n=71/101), 97% (n=67/69) και 96% (n=54/56) των στελεχών των φυλογενετικών ομάδων A, B1 και D αντίστοιχα, ήταν ανθεκτικά σε τρία τουλάχιστον αντιβιοτικά ταυτόχρονα, ενώ το 29% (n=29/101), 83% (n=57/69) και 86% (n=48/56) εξ αυτών ήταν ανθεκτικά στην κεφοταξίμη. Το 79% (n=19/24) των στελεχών που ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά ή ανθεκτικά μόνο στην αμπικιλίνη, ανήκουν στην ομάδα A. Το 86% (n=38/44) των στελεχών που ήταν ανθεκτικά μόνο στην αμπικιλίνη και στη τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη (RSRRS), ανήκουν επίσης στην ομάδα A. Το 78% (n=105/134) των στελεχών που ήταν ανθεκτικά στην κεφοταξίμη, ανήκουν στις ομάδες B1 και D. Τα αποτελέσματα του φυλογενετικού χαρακτηρισμού, δείχνουν ότι στην ομάδα A συγκεντρώνονται τα ευαίσθητα στελέχη, και τα στελέχη που φέρουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και στην τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη, ενώ η ανθεκτικότητα στην κεφοταξίμη είναι λιγότερο συχνή. Αντίθετα στις ομάδες B1 και D συγκεντρώνονται τα στελέχη που φέρουν ανθεκτικότητα στην κεφοταξίμη.

Στη φάρμα A, το 100% των στελεχών του ολικού πληθυσμού των ομάδων B1 και D, ήταν ανθεκτικά στην κεφοταξίμη. Στη φάρμα Γ, το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 86%, ενώ στη φάρμα B μόλις 12%. Τα στελέχη της ομάδας D, ήταν πολυανθεκτικά ανεξάρτητα από το ποια φάρμα και ποιο πληθυσμό προήλθαν. Αντίθετα, τα στελέχη της ομάδας B1, φαίνεται να αποκτούν χαρακτηριστικά ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Έτσι στις φάρμες A και Γ που υποθέτουμε ότι υπάρχει πίεση από φλουροκινολόνες, τα στελέχη της ομάδας B1 ήταν πολυανθεκτικά, ενώ στη φάρμα B όπου θεωρούμε ότι δεν γίνεται χρήση της συγκεκριμένης ομάδας αντιβιοτικών, τα στελέχη της ομάδας B1 ήταν στην πλειοψηφία τους ευαίσθητα.

Επιπλέον, από τους πληθυσμούς της κεφοταξίμης και της γενταμυκίνης της φάρμας Β, δεν απομονώθηκε κανένα στέλεχος που να ανήκει στην ομάδα Β1. Το γεγονός αυτό ενισχύει την πεποίθηση ότι η απόκτηση της ανθεκτικότητας ανάμεσα στην ομάδα Β1, διαμορφώνεται από την πίεση επιλογής των αντιβιοτικών.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με MLST επιβεβαιώνουν την φυλογενετική ομαδοποίηση των 227 απομονώσεων *E. coli* στις τέσσερις κύριες ομάδες Α, Β1, Β2 και D καθώς και στις υβριδικές ομάδες ΑxB1 και ABD. Τα συχνότερα STs που βρέθηκαν είναι το ST10-A, ST93-A, ST117-ABD και ST2309-D. Τα τέσσερα αυτά STs χαρακτηρίζουν το 54% των 37 απομονώσεων *E. coli* που αναλύθηκαν με MLST.

Το ST10 είναι ο ιδρυτής (founder) του μεγαλύτερου κλωνικού συγκροτήματος (clonal complex) του είδους των *E. coli*, γνωστό και ως συγκρότημα ST10 (ST10 complex) (Gordon *et al.*, 2008). Η πλειοψηφία των στελεχών που κατατάσσονται στη φυλογενετική ομάδα Α, ανήκουν στο κλωνικό συγκρότημα ST10, το οποίο περιλαμβάνει απομονώσεις *E. coli* από πολύ διαφορετικούς ξενιστές (Trobos *et al.*, 2009). Παρόλο που η φυλογενετική ομάδα Α τυπικά σχετίζεται με συμβιωτικά *E. coli*, βρέθηκαν πολυανθεκτικά στελέχη ST10 στις φάρμες Α (n=3) και Γ (n=2), που φέρουν τους γονότυπους CTX-M-9, AmpC και TEM. Στη φάρμα Β βρέθηκε επίσης το ST10 με ανθεκτικότητα μόνο στην αμπικιλίνη και γονότυπο TEM. Οι Moreno *et al.* 2006 και Ewers *et al.* 2007, παρουσίασαν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι απομονώσεις της φυλογενετικής ομάδας Α, μπορεί να είναι υπεύθυνες για εξω-εντερικές λοιμώξεις (extraintestinal infections). Τα ST10 και ST117 έχουν αναφερθεί ως οι συχνότεροι γονότυποι σε απομονώσεις από κοτόπουλα σε πτηνοσφαγεία στην Ισπανία (Bergeon *et al.*, 2012). Η ίδια έρευνα κατέδειξε γενετικές ομοιότητες μεταξύ των συγκεκριμένων στελεχών, με ExPEC στελέχη που προκαλούν λοιμώξεις του ουροποιητικού στον άνθρωπο.

Τα στελέχη ST117-ABD βρέθηκαν στις φάρμες Α (n=3) και Β (n=1) με προφίλ ανθεκτικότητας RRRRS. Τα ST117 της φάρμας Α φέρουν τους γονότυπους CTX-M-1, AmpC και TEM-SHV, ενώ το στέλεχος της φάρμας Β δεν φέρει κανένα γονότυπο ανθεκτικότητας από αυτούς που εξετάστηκαν. Έχουν αναφερθεί πρόσφατα απομονώσεις του ST117 από πτηνά, με ανθεκτικότητα στις κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> γενιάς και στις φλουοροκινολόνες (Giufre *et al.*, 2012). Μια έρευνα στον Καναδά έδειξε ότι στελέχη του ST117 από κοτόπουλα, ανήκουν στο ίδιο

κλωνικό συγκρότημα με ExPEC κλινικά στελέχη του ανθρώπου (Manges and Johnson, 2012). Οι Mora *et al.* 2012, κατέγραψαν αύξηση του επιπολασμού ενός συγκεκριμένου ορότυπου του ST117 ανάμεσα στα APEC κλινικά στελέχη των πτηνών, με υψηλό αριθμό λοιμογόνων γονιδίων και δυναμική πρόκλησης επιδημιών. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και ιδιαίτερα τα κοτόπουλα, αποτελούν δεξαμενή μετάδοσης ExPEC στελεχών στον άνθρωπο και ότι το ST117 είναι ανάμεσα στα στελέχη υψηλού κινδύνου.

Τα στελέχη ST2309-D, βρέθηκαν στη φάρμα Γ με προφίλ ανθεκτικότητας RRRRS και φέρουν τους γονότυπους TEM-SHV και CIT. Τα στελέχη ST93-A απομονώθηκαν από τις φάρμες Β (n=1) και Γ (n=3) με MDR φαινότυπους (RRRRS, RSRRR, RSRRS) και φέρουν τους γονότυπους CTX-M-1, CIT και TEM. Τα δύο αυτά στελέχη (ST2309-D και ST93-A) που κωδικεύουν ESBL/AmpC γονίδια, έχουν απομονωθεί πρόσφατα από πτηνοτρόφους στην Ολλανδία, ενώ τα ίδια στελέχη ήταν παρόντα και σε δείγματα από τα πτηνά τους (Dierikx *et al.*, 2012). Τα αποτελέσματα αυτά εγείρουν ανησυχίες για τους κινδύνους που προκύπτουν για τους επαγγελματίες της ζωικής παραγωγής.

Από τα υπόλοιπα STs, το ST115-D που απομονώθηκε από τη φάρμα Γ, διαφέρει σε ένα αλληλόμορφο (single locus variant- SLV) με το ST2309-D το οποίο βρέθηκε στην ίδια φάρμα. Το ST373-A το οποίο είναι SLV του ST93-A, βρέθηκε στις ίδιες φάρμες με αυτό (Β και Γ). Το ST212-AxB1 με φαινότυπο RRRRR και γονότυπο TEM/SHV και CIT που απομονώθηκε από τη φάρμα Α, πιστεύουμε ότι χαρακτηρίζει όλες τις απομονώσεις της συγκεκριμένης φάρμας με το προφίλ ανθεκτικότητας RRRRR. Μια πρόσφατη έρευνα στη Σουηδία κατέδειξε ότι το 44% των φιλέτων κοτόπουλου που αναλύθηκαν, φέρει *E. coli* που παράγουν ESBLs και μεταξύ άλλων απομονώθηκαν τα ST393 και ST212 (Börjesson *et al.*, 2013). Τα ST155-B1 και ST1011-D που απομονώσαμε, έχουν απομονωθεί προηγουμένως από πουλερικά στην Ιταλία (Giufre *et al.*, 2012).

Το μοναδικό στέλεχος της φυλογενετικής ομάδας Β2 που απομονώσαμε, ανήκει στο ST2838, το οποίο αποτελεί SLV του ST131. Τα στελέχη ST131 είναι η κύρια αιτία σοβαρών εξω-εντερικών λοιμώξεων του ανθρώπου, με MDR *E. coli* σε πολλές χώρες του κόσμου (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008, Johnson *et al.*, 2010). Επιπλέον, το ST131 έχει ταυτοποιηθεί πρόσφατα ως αιτία κλινικών λοιμώξεων σε πουλερικά και κατοικίδια ζώα, αλλά έχει απομονωθεί και από κόπρανα υγιών ζώων καθώς και από κρέας πουλερικών (Mora *et al.*, 2010, Vincent *et al.*, 2010, Ewers *et*

*al.*, 2010). Ανάμεσα στις εξηγήσεις που δίνονται για την ταχεία διάδοση και παγκόσμια κατανομή του ST131, περιλαμβάνονται και η μετάδοση μέσω επαφής με ζώα φορείς ή/και η κατανάλωση επιμολυσμένου κρέατος πουλερικών (Platell *et al.*, 2011).

## **5.2. *Enterococcus spp***

Η καταμέτρηση των ολικών πληθυσμών των *enterococci*, έδειξε ότι το μικροβιακό φορτίο κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα και στις τρεις φάρμες. Ωστόσο, στη φάρμα Β καταμετρήθηκαν υψηλοί αριθμοί στους πληθυσμούς AMP-R και HLG-N-R, ενώ στις φάρμες Α και Γ ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Συνεπώς, ο πληθυσμός των *enterococci* της φάρμας Β, διαφοροποιείται σημαντικά ως προς την ανταπόκριση και επιβίωση του σε περιβάλλον με αμικικιλίνη και γενταμυκίνη υψηλής συγκέντρωσης.

Τα αποτελέσματα της δοκιμής ευαισθησίας στα αντιβιοτικά δισκία διάχυσης, επαλήθευσαν την εικόνα που έδωσαν τα θρεπτικά υποστρώματα με τα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα στις φάρμες Α και Γ η ανθεκτικότητα των *enterococci* στην AMP και HLG-N ήταν κάτω από 4%, ενώ στη φάρμα Β ήταν της τάξης του 70% και στα δύο αντιβιοτικά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στη φάρμα Β η ανθεκτικότητα στην AMP συνοδεύεται σχεδόν 100% και από ταυτόχρονη ανθεκτικότητα στην HLG-N. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν υψηλούς πληθυσμούς των *enterococci* στο κρέας των πουλερικών, οι οποίοι δείχνουν ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά ταυτόχρονα στον Καναδά (Aslam *et al.*, 2012), στις Η.Π.Α (Hayes *et al.*, 2003), στην Τυνησία (Klibi *et al.*, 2013), στην Τουρκία (Dogru *et al.*, 2010) και στην Ιταλία (Busani *et al.*, 2004).

Από το σύνολο των 130 *enterococci* που απομονώθηκαν και από τις τρεις φάρμες, κανένα στέλεχος δεν ήταν ανθεκτικό στη βανκομυκίνη. Το αποτέλεσμα αυτό είναι συμβατό με άλλες μελέτες οι οποίες σημειώνουν την απουσία VRE σε προϊόντα κρέατος (Klibi *et al.*, 2013, Dogru *et al.*, 2010). Την δεκαετία του 1990, πριν απαγορευτεί η χρήση της αβοπαρυκίνης ως αυξητικού παράγοντα στην κτηνοτροφία, η απομόνωση VRE στελεχών του *E. faecium* από πτηνοτροφικές μονάδες, ήταν συχνή στην Ευρώπη (Aarestrup, 1995, Klare *et al.*, 1995). Από το 1997 όταν η αβοπαρυκίνη απαγορεύτηκε, ο επιπολασμός των VRE στα κοτόπουλα μειώθηκε κατακόρυφα (Klare *et al.*, 1999, van den Bogaard *et al.*, 2000). Ωστόσο, πρόσφατη μελέτη στην Ελλάδα

αναφέρει την απομόνωση VRE από κοτόπουλα, σε ποσοστά της τάξης του 22%, δεκαπέντε χρόνια μετά την απαγόρευση της αβοπαρυκίνης (Tzavaras *et al.*, 2012). Παρόμοιες μελέτες σε Ισπανία (Lopez *et al.*, 2009), Πορτογαλία (Novais *et al.*, 2005) και Δανία (Garcia-Migura *et al.*, 2011) έχουν ανιχνεύσει VRE σε προϊόντα κρέατος. Μια εξήγηση που δίνεται για την επιμονή των VRE στα δείγματα από παραγωγικά ζώα, είναι η χρήση της τυλοζίνης (μακρολίδιο) στην κτηνοτροφία, η οποία θεωρείται ότι συν-επιλέγει την ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη (Aarestrup *et al.*, 2000).

Το επικρατέστερο είδος στις φάρμες Α και Β ήταν ο *E. faecium* (72% και 96% αντίστοιχα) ενώ στη φάρμα Γ ήταν ο *E. faecalis* (100%). Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι ο *E. faecium* ήταν το επικρατέστερο είδος σε δείγματα από κρέας ή κόπρανα πουλερικών στην Σκανδιναβία, Ισπανία και Ιταλία (de Jong *et al.*, 2009), στο Μαρόκο (Sanchez *et al.*, 2009), στην Ολλανδία (van den Bogaard *et al.*, 2002) και στις Η.Π.Α (Hayes *et al.*, 2003), ενώ άλλες μελέτες στην Πορτογαλία (Poeta *et al.*, 2006), το Βέλγιο (Butaye *et al.*, 2001), τον Καναδά (Aslam *et al.*, 2012) και τη Βραζιλία (Fracalanza *et al.*, 2007), αναφέρουν τον *E. faecalis* ως το επικρατέστερο είδος. Οι διαφορές αυτές αποδίδονται σε γεωγραφικές αποκλίσεις ή σε διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης (Jackson *et al.*, 2005). Όλες οι απομονώσεις του *E. faecalis* ήταν ευαίσθητες σε όλα τα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα στην AMP και HLGN ανάμεσα στα στελέχη του *E. faecium* της φάρμας Α ήταν μόλις 6%, ενώ στη φάρμα Β ήταν 71% στην AMP και 75% στην HLGN. Μέχρι στιγμής εξ όσων γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που αναφέρονται τόσο ψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στην HLGN, σε απομονώσεις *E. faecium* από προϊόντα κρέατος. Οι Koluman *et al.*, 2008 αναφέρουν ανθεκτικότητα 24% στην HLGN και μόλις 2% στην AMP σε απομονώσεις *Enterococcus* spp από διάφορα τρόφιμα. Μια έρευνα στη Νότιο Κορέα έδειξε 38% ανθεκτικότητα στην HLGN σε στελέχη *E. faecium* από κόπρανα πουλερικών (Han *et al.*, 2011). Τα υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας που καταγράφηκαν στη φάρμα Β, καθώς και η επικράτηση του *E. faecium* έναντι του *E. faecalis*, πιστεύουμε ότι είναι αποτέλεσμα της αντιμικροβιακής στρατηγικής που εφαρμόζεται στη συγκεκριμένη φάρμα. Ειδικότερα, η πίεση από β-λακταμικά αντιβιοτικά εξηγεί την επίκτητη ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη αλλά και την επικράτηση του *E. faecium* (Willems and Schaick, 2010). Η τριωδρική αμοξυκιλλίνη (β-λακταμικό αντιβιοτικό) είναι εγκεκριμένη ουσία σε εθνικό επίπεδο (όχι σε κοινοτικό), για χρήση στα κοτόπουλα κρεοπαραγωγής, και πιστεύουμε ότι στη φάρμα Β χρησιμοποιείται κατά κόρον.

Όσο για την υψηλή ανθεκτικότητα στην HLGN, πιθανόν να οφείλεται σε παράνομη χορήγηση αμινογλυκοσιδών στη συγκεκριμένη φάρμα.

Το γονίδιο *esp* που κωδικοποιεί μια εντεροκοκκική πρωτεΐνη επιφανείας που σχετίζεται με την ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ πάνω σε αβιοτικές επιφάνειες, δεν βρέθηκε σε καμία από τις 130 απομονώσεις *enterococci*. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού το συγκεκριμένο γονίδιο σχετίζεται με κλινικά στελέχη *E. faecium* υπεύθυνα για ενδο-νοσοκομειακές λοιμώξεις (Willems *et al.*, 2001).

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων MLVA και MLST, κατέταξαν τις απομονώσεις του *E. faecium* σε 20 MTs και 15 STs (βλέπε παράρτημα: πίνακας 16). Τα αποτελέσματα του MLVA κατεύθυναν την επιλογή μικρότερου αριθμού δειγμάτων για επαλήθευση με MLST. Πράγματι, η γενετική διαφοροποίηση των στελεχών του *E. faecium* ανάμεσα στις τρεις φάρμες, αποδόθηκε επιτυχώς και με τις δύο μεθόδους. Ωστόσο, η μέθοδος MLST φαίνεται να πλεονεκτεί στο γεγονός ότι ομαδοποιεί καλύτερα τα στελέχη του *E. faecium*, ενώ η μέθοδος MLVA πιθανό να αποδίδει γενετικές διαφορές εκεί που δεν υπάρχουν πραγματικά, περιπλέκοντας την εικόνα της γενετικής δομής του πληθυσμού. Συμπερασματικά, η μέθοδος MLVA είναι χρήσιμη για ένα γρήγορο και φθινό αρχικό σάρωμα μεγάλου αριθμού δειγμάτων, τα αποτελέσματα του οποίου είναι αξιόπιστα και μπορούν να καθοδηγήσουν την επιλογή στελεχών για ανάλυση με MLST, εκεί όπου κρίνεται επιθυμητό.

Τα συχνότερα MTs ήταν το MT9 και 20 που ανευρέθηκαν αποκλειστικά στη φάρμα Β και αποτελούν πάνω από το 90% των στελεχών του *E. faecium* της συγκεκριμένης φάρμας. Επιπλέον, όλα τα στελέχη MT9 και 20 που αναλύθηκαν με MLST, ανήκουν στον ίδιο τύπο αλληλουχίας (ST148). Συνεπώς αποδεικνύεται ότι η φάρμα Β είναι αποικισμένη με το ST148, το οποίο χαρακτηρίστηκε ανθεκτικό σε AMP και HLGN. Τα στελέχη του *E. faecium* της φάρμας Α, τα οποία ήταν στην πλειοψηφία τους ευαίσθητα, διαφοροποιούνται και γονοτυπικά από αυτά της φάρμας Β, διότι ανήκουν σε διαφορετικά MTs και STs. Συγκεκριμένα, τα περισσότερα στελέχη της φάρμας Α, είναι SLVs των ST157 και ST236.

Η δομή του πληθυσμού του *E. faecium*, περιλαμβάνει μια ποικιλία από STs, στην οποία υπάρχει υπερ-αντιπροσώπευση συγκεκριμένων κλωνικών συγκροτημάτων (CCs). Πρόκειται για το CC9 που σχετίζεται με τα πουλερικά, το CC5 που σχετίζεται με τους χοίρους, το CC1 που σχετίζεται



με τα μυρηκαστικά και τα CC17, CC22, CC94 που σχετίζονται με τους ανθρώπους (Homan *et al.*, 2002, Camargo *et al.*, 2006). Το CC17, που έχει σήμερα παγκόσμια διασπορά, θεωρείται κλωνικό συγκρότημα υψηλού κινδύνου, γιατί συγκεντρώνει στελέχη που απομονώνονται σχεδόν αποκλειστικά από νοσηλευόμενους ασθενείς (Leavis *et al.*, 2006). Ωστόσο έχει ανευρεθεί και σποραδικά σε υγιείς ανθρώπους, πουλερικά, χοίρους και σκύλους (Biavasco *et al.*, 2007, Damborg *et al.*, 2008, de Leener *et al.*, 2005).

Εννέα από τα 15 STs που ταυτοποιήσαμε, μεταξύ των οποίων και αυτά με τη μεγαλύτερη συχνότητα (ST148, ST157 και ST236), ανήκουν στο CC9 των πουλερικών. Το στέλεχος ST148 έχει απομονωθεί προηγουμένως από κόπρανα υγιών ανθρώπων και πουλερικών στην Ισπανία και έχει χαρακτηριστεί ως ευαίσθητο στην αμπικιλίνη (López *et al.*, 2010). Το ίδιο στέλεχος (ST148) έχει απομονωθεί από κοτόπουλα και υγιείς ανθρώπους στην Πορτογαλία, όπου χαρακτηρίστηκε ανθεκτικό σε πολλά αντιβιοτικά, περιλαμβανομένων της αμπικιλίνης και της HLGN (Freitas *et al.*, 2009). Οι διαφοροποιήσεις στο προφίλ ανθεκτικότητας ενός συγκεκριμένου στελέχους, δεν μπορούν παρά να αποδοθούν στην πίεση επιλογής από διαφορετικά αντιβιοτικά. Στη δική μας μελέτη, η κυρίαρχη παρουσία του ST148 στη φάρμα Β, σε συνδυασμό με 100% ανθεκτικότητα των στελεχών ST148 σε αμπικιλίνη και HLGN, υποστηρίζουν το συμπέρασμα της χρήσης αμοξυκιλίνης και πιθανόν παράνομα και αμινογλυκοσιδών στη συγκεκριμένη φάρμα. Το ST157 έχει αναφερθεί σε υγιείς σκύλους στην Αγγλία (Damborg *et al.*, 2009) και σε κοτόπουλα στο Βέλγιο (de Leener *et al.*, 2005). Στελέχη του ST236 έχουν ανευρεθεί σε κοτόπουλα στην Πορτογαλία (Freitas *et al.*, 2009), στη Ν. Κορέα (Cha *et al.*, 2012) και στις Η.Π.Α (Hayes *et al.*, 2001).

Ανάμεσα στα στελέχη του *E. faecium* που ταυτοποιήθηκαν στο κρέας των πουλερικών, αναφέρουμε και το ST121 που χαρακτηρίζει μια μοναδική απομόνωση της φάρμας Α. Η σημασία του ST121 έγκειται στο ότι αποτελεί SLV του ST78 (Freitas *et al.*, 2009). Το ST-78 είναι ένα αποκλειστικά ενδονοσοκομειακό στέλεχος του *E. faecium*, υπεύθυνο για πρόκληση επιδημιών με VRE, και θεωρείται ένας από τους κύριους ιδρυτές του CC17 (Willems *et al.*, 2012, Hsieh *et al.*, 2010).

## **6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aarestrup, F. M., 1995, 'Occurrence of glycopeptide resistance among *E. faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms', *Microbial Drug Resistance*, vol. 1, pp. 255-257

Aarestrup, F. M., 2000, 'Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, pp. 2774-2777

Aslam, M., Diarra, S. M., Checkley, S., Bohaychuk, V., Masson, L., 2012, 'Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp isolated from retail meats in Alberta, Canada', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 156, pp. 222-230

Baker, S., Hanage, P. W., Holt, E. K., 2010, 'Navigating the future of bacterial molecular epidemiology', *Current Opinion in Microbiology*, vol. 13, pp. 640-645

Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G., Cavadini, C., Sauthier, T., se, Anderson, R.E., Schiffrin, E.J., von, d.W., 2003, 'Supplementation of food with *Enterococcus Faecium* (SF 68) stimulates immune functions in young dogs', *Journal of Nutrition*, vol. 133, pp. 1158

Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G., Cavadini, C., Sauthier, T., se, Anderson, R. E., Schiffrin, E. J., von, d. W., 2003, 'Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs', *Journal of Nutrition*, vol. 133, pp. 1158

Bergeron, R. C., Prussing, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dutil, L., Reid-Smith, J. R., Zhanel, G. G., Manges, R. A., 2012, 'Chicken as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 18, no. 3, pp. 415-421

Bergthorsson, U., Ochman, H., 1998, 'Distribution of chromosomal length variation in natural isolates of *Escherichia coli*', *Molecular Biology Evolutions*, vol. 15, pp. 6-16

Biavasco, F., Foglia, G., Paoletti, C., Zandri, G., Magi, G., Guaglianone, E., Sundsfjord, A., et al., 2007, 'VanA-type enterococci from humans, animals and food: species distribution,

population structure, Tn1546 typing and location and virulence determinants', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, pp. 3307-3319

Bingen, E., Denamur, E., Elion, J., 1994, 'Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks', *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 7, pp. 311-317

Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, E., Navarro, F., Cortes, P., Llagostera, M., 2006, 'ESBL and plasmidic class C beta-lactamase producing *E.coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms', *Veterinary Microbiology*, vol. 118, pp. 299-304

Bonnet, R., 2004, 'Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, no. 1, pp. 1-14

Börjesson, S., Egervärn, M., Lindblad, M., Englund, S., 2013, 'High occurrence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and transferable AmpC beta-lactamase producing *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden', *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.03893-12

Boyd, E. F., Hartl, D. L., 1998, 'Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution', *Journal of Bacteriology*, vol. 180, pp. 1159-1165

Bradley, C. R., Fraise, A. P., 1996, 'Heat and chemical resistance of *enterococci*', *Journal of Hospital Infections*, vol. 34, pp. 191-196

Busani, L., Del Grosso, M., Paladini, C., Graziani, K., Pantosti, A., Biavasco, F., Caprioli, A., 2004, 'Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant *enterococci* isolated in Italy from raw meat products, farm animals and human infections', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 97, pp. 17-22

Butaye, P., Devriese, L. A., Haesebrouck, F., 2001, 'Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, pp. 1374-1378

- Camargo I. L., Gilmore, M. S., Darini, A. L., 2006, 'Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil', *Clinical Microbiology Infections*, vol. 12, pp. 1123-1130
- Canton, R., Coque, T. M., 2006, 'The CTX-M beta-lactamase pandemic', *Current Opinion in Microbiology*, vol. 9, pp. 466-475
- Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., et al., 2008, 'Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe', *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14 (Suppl 1): 144-53
- Castillo Neyra, R., Vegosen, L., Davies, M. F., Price, L., Silbergeld, K. E., 2012, 'Antimicrobial-resistant bacteria: An unrecognized work-related risk in food animal production', *Safety and Health at Work*, vol. 3, pp. 85-91
- Centers for Disease Control and Prevention, 2001, National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 – June 2001, issued August 2001, *American Journal of Infections Control*, vol. 29, pp. 404-421
- Cha, J. O., Jung, Y. H., Lee, H. R., Yoo, J. I., Lee, Y. S., 2012, 'Comparison of genetic epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from humans and poultry', *Journal of Medical Microbiology*, vol. 61, pp. 1121-1128
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000, 'Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 10, pp. 4555-4558
- Collignon, P., Powers, J. H., Chiller, T. M., Aidara-Kane, A., Aarestrup, F. M., 2009, 'World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 49, pp. 132-141
- Coque, T. M., Baquero, F., Canton, R., 2008, 'Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe', *Euro Surveillance*, vol. 13, pii 19044

- Coque, T. M., Baquero, F., Canton, R., 2008, 'Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe', *Eurosurveillance*, vol. 13, issue 47, pp. 1-11
- Corander, J., Marttinen, P., 2006, 'Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers', *Molecular Ecology*, vol. 15, pp. 2833-2843
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., Tang, J., 2008, 'Enhanced Bayesian modeling in BAPS software for learning genetic structures of populations', *BMC Bioinformatics*, vol. 9, pp. 539
- Cortés, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, M., López, C., Andreu, A., Navarro, F., Alonso, M. P., Bou, G., Blanco, J., Llagostera, M., 2010, 'Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 9., pp. 2799-2805
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., Wright, G. D., 2006, 'Sampling the antibiotic resistome', *Science*, vol. 311, pp. 374-377
- Dallene, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., Guillaume, A., 2010, 'Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, doi: 10.1093/jac/dkp498
- Damborg, P., Sorensen, A. H., Guardabassi, L., 2008, 'Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: first report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17', *Veterinary Microbiology*, vol. 132, pp. 190-196
- Damborg, P., Top, J., Hendrickx, A. P. A., Dawson, S., Willems, R. J. L., Guardabassi, L., 2009, 'Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections', *Applied Journal of Environmental Microbiology*, vol. 75, pp. 2360-2365
- Davies, J., Davies, D., 2010, 'Origins and evolution of antibiotic resistance', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, no. 3, pp. 417-433
- de Jong, A., Bywater, R., Butty, P., Deroover, E., Godinho, K., Klein, U., Marion, H., Simjee, S., Smets, K., Thomas, V., Valle, M., Wheadon, A., 2009, 'A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric

bacteria isolated from healthy food-producing animals', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 63, pp. 733-744

de Leener, E., Martel, A., de Graef, E., Top, J., Butaye, P., Haesebrouck, F., Willems, R., Decostere, A., 2005, 'Molecular analysis of human, porcine, and poultry *Enterococcus faecium* isolates and their *erm(B)* genes', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 5, pp. 2766-2770

Dierikx, C., van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Mevius, D., 2012, 'Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-and-AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 68, no. 1, pp. 60-67

Dogru, A. K., Gencay, Y. E., Ayaz, N. D., 2010, 'Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of *vanA* and *vanB* resistance genes in *E. faecalis* and *E. faecium*', *Research in Veterinary Science*, vol. 89, pp. 153-158

Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., Maceckova, G., Kohoutova, L., Literak, I., Smola, J., Cizek, A., 2011, 'Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *gnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 66, pp. 757-764

DuPont, H. L., 2007, 'The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 45, pp. 1353-61

Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P., 1995, 'Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 33, no. 1, pp. 24-27

Eaton, T. J., Gasson, M. J., 2002, 'A variant enterococcal surface protein Espfm in *Enterococcus faecium*; Distribution among food, commensal, medical and environmental isolates', *FEMS Microbiology Letters*, vol. 16, pp. 269-275

Enright, C. M., Spratt, G. B., 1999, 'Multilocus Sequence Typing', *Trends in Microbiology*, vol. 7, pp. 482-487

- European Food Safety Authority (EFSA), 2010a, 'The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007', *EFSA Journal*, vol. 8, pp. 1309
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005, 'Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study', *Molecular Ecology*, vol. 14, pp. 2611-2620
- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P. A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L. H., Guenther, S., 2010, 'Emergence of human pandemic O:25H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, pp. 651-660
- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antao, E. M., Laturus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Bohnke, U., Steinruck H., Phillip, H. C., Wieler, L. H., 2007, 'Avian pathogenic, uropathogenic and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?', *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 297, pp. 163-176
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., Spratt, B. G., 2004, 'EBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data', *Journal of Bacteriology*, vol. 186, pp. 1518-1530
- Fisher, K., Phillips, C., 2009, 'The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*', *Microbiology*, vol. 155, pp. 1749-1757
- Florey, K., 1973, *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press, New York, vol. 2, pp. 1-61
- Fontana, R., Aldegheri, M., Ligozzi, M., Lopez, H., Sucari, A., Satta, G., 1994, 'Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 38, no. 9, pp. 1980-1983
- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006, 'The role and application of *enterococci* in food and health', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 106, pp. 1-24



- Fracalanza, S. A. P., Scheidegger, E. M., D., dos Santos, P. F., Leite, P. C., Teixeira, L. M., 2007, 'Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil', *Memorial Institute Oswaldo Cruz*, vol. 102, no. 7, pp. 853-859
- Francisco, A. P., Vaz, C., Monteiro, P. T., Melo-Cristino, J., Ramirez, M., Carrico, J. A., 2012, 'PHYLOVIZ: Phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods', *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, pp. 87
- Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., Holzappel, W. H., 2003, 'Enterococci in foods – a conundrum for food safety', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, pp. 105-122
- Franz, M. A. P. C., Huch, M., Abriouel, H., Holzappel, W., Galvez, A., 2011, 'Enterococci as probiotics and their implications in food safety', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 151, pp. 125-140
- Freitas, A. R., Novais, C., Ruiz-Garbajosa, P., Coque, T. M., Peixe, L., 2009, 'Dispersion of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to major clonal complexes in different Portuguese settings', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 14, pp. 4904-4908
- French, G. L., 1998, 'Enterococci and vancomycin resistance', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 27, pp. 75-83
- Gallelli, 1967, 'Stability studies of drugs used in intravenous solutions, part one', *American Journal of Hospital Pharmaceutics*, vol. 24, pp. 425-433
- Gambarotto, K., Plot, M. C., Dupron, F., Giangiobbe, M., Denis, F., 2001, 'Occurrence of vancomycin-resistant in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, pp. 2354-2355
- Garcia-Migura, L., Sanchez-Valenzuela, A. J., Jensen, L. B., 2011, 'Presence of glycopeptide-encoding plasmids in enterococcal isolates from food and humans in Denmark', *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 8, pp. 1191-1197

Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M. F., Bertini, A., Nordmann, P., 2007, 'Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 14, pp. 4681-4685

Giufre, M., Graziani, K., Accogli, M., Luzzi, I., Busani, L., Cerquetti, M., 2012, '*Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, doi:10.1093/jac/dkr565

Gniadkowski, M., 2001, 'Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) and ESBL-producing organisms', *Clinical Microbiology and Infection*, vol.7, pp. 597-608

Gordon, M. D., Clermont, O., Tolley, H., Denamur, E., 2008, 'Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method', *Environmental Microbiology*, vol. 10, no. 10, pp. 2484-2496

Greko, C., Badiola, J. I., Catry, B., van Duijkeren, E., Moreno, M. A., Matias Ferreira Pomba, M. C., et al., 2009, 'Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 32, pp. 515-533

Gyles, C. L., 2008, 'Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry', *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, vol. 9, pp. 149-158

Hammerum, A. M., Heuer, O. E., 2009, 'Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 48, pp. 916-921

Han, D., Unno, T., Jang, J., Lim, J., Lee, S. N., Ko, G., Sadowsky, M. J., Hur, H. G., 2011, 'The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals and birds in South Korea', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, pp. 387-392

Hasan, B., Sandegren, L., Melhus, A., Drobni, M., Hernandez, J., Waldenström, J., Alam, M., Olsen, B., 2012, 'Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 18, no. 12, pp. 2055-2058

- Hawkey, P. M., Jones A. M., 2009, 'The changing epidemiology of resistance', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 64 (Suppl 1): i3-10
- Hayes, J. R., English, L. L., Carter, P. J., Proescholdt, T., Lee, K. Y., Wagner, D. D., White, D. G., 2003, 'Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 12, pp. 7153-7160
- Hayes, J. R., McIntosh, A. C., Qaiyumi S., Johnson, J. A., English, L. L., Carr, E. L., Wagner, D. D., Joseph, S. W., 2001, 'High-frequency recovery of quinupristin-dalfopristin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from the poultry production environment', *Journal of clinical Microbiology*, vol. 39, no. 6, pp. 2298-2299
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M., Whittam, T. S., 1990, 'Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, vol. 172, pp. 6175-6181
- Homan, L. W., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., van Embden, D. A. J., Willems, J. L. R., 2002, 'Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*', *Journal of clinical Microbiology*, vol. 40, no. 6, pp. 1963-1971
- Hsieh, Y. C., Lee, W. S., Ou, T. Y., Hsueh, P. R., 2010, 'Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 29, pp. 25-30
- Iwen, P. C., Kelly, D. M., Linder, J., Hinrichs, S. H., Dominguez, E. A., Rupp, M. E., Patil, K. D., 1997, 'Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period', *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 41, pp. 494-495
- Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Jackson-Hall, M. C., Hiott, L. M., 2005, 'Effect of media, temperature and culture conditions on the species population and antibiotic resistance of enterococci from broiler chickens', *Letters in Applied Microbiology*, vol. 41, pp. 262-268
- Jacoby, G. A., Munoz-Price, L. S., 2005, 'The new beta-lactamases', *New England Journal of Medicine*, vol. 352, pp. 380-391

- Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X., Brisse, S., 2008, 'Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains', *BMC Genomics*, 9:560, doi: 10.1186/1471-2164-9-560
- Jiang, H. X., Lü, D. H., Chen, Z. L., Wang, X. M., Chen, J. R., Liu, Y. H., Liao, X. P., Liu, J. H., Zeng, Z. L., 2011, 'High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China', *Veterinary Journal*, vol. 187, no. 1, pp. 99-103
- Johnson, J. R., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M. A., Castanheira, M., 2010, '*Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 51, no. 3, pp. 286-294
- Johnson, T. J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele P., Johnson, S. J., Doetkott, C., Skyberg, J. A., Lynne A. L., Johnson J. R., Nolan, L. K., 2007, 'The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes', *Journal of Bacteriology*, vol. 189, pp. 3228-3236
- Johnson, T. J., Loque, M. C., Johnson, R. J., Kuskowski, A. M., Sherwood, S. J., Barnes, J. H., DebRoy, C., et al., 2012, 'Associations between multidrug resistance, plasmid content and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry', *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 9, no. 1, pp. 37-46
- Johnson, T. J., Nolan, L. K., 'Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 73, pp. 750-774
- Joseph, S. W., Hayes, J. R., English, L. L., Carr, L. E., Wagner, D. D., 2001, 'Implications of multiple antimicrobial-resistant *enterococci* associated with poultry environment', *Food Additives and Contaminants*, vol. 18, pp. 1118-1123
- Jung, W. K., Lim, J. Y., Kwon, N. H., Kim, J. M., Hong, S. K., Koo, H. C., Kim, S. H., Park, Y. H., 2007, 'Vancomycin-resistant *enterococci* from animal sources in Korea', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 113, pp. 102-107

Kaper, J. B., 2005, 'Pathogenic *Escherichia coli*', *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 295, pp. 355-356

Kazuki, H., Tetsuo, A., 2010, 'Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, pp. 1-12

Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J., Hugh-Jones, M. E., 2000, 'Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*', *Journal of Bacteriology*, vol. 182, pp. 2928-2936

Klare, I., Badstubner, D., Konstabel, C., Bohme, G., Claus, H., Witte, W., 1999, 'Decreased incidence of *vanA*-type vancomycin resistant enterococci from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry', *Microbial Drug Resistance*, vol. 5, pp. 45-62

Klare, I., Heier, H., Claus, H., Reissbrodt, R., Witte, W., 1995, '*VanA* mediated high-level glycopeptide resistance in *E. faecium* from animal husbandry', *FEMS Microbiology Letters*, vol. 125, pp. 165-171

Klare, I., Konstabel, C., Badstubner, D., Werner, G., Witte, W., 2003, 'Occurrence and spread of antibiotic resistance in *Enterococcus faecium*', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, pp. 269-290

Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., Witte, W., 2003, 'Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, pp. 269-290

Klibi, N., Said, L. B., Jouini, A., Slama, K. B., López, M., Sallem, R. B., Boudabous, A., Torres, C., 2013, 'Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia', *Meat Science*, vol. 93, no. 3, pp. 675-680

Koluman, A., Akan, S. L., Cakiroglu, P. F., 2008, 'Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods', *Food Control*, vol. 20, pp. 281-283

- Kümmerer, K., 2004, 'Resistance in the environment', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 54, pp. 311-320
- Leavis, H. L., Bonten, M. J., Willems, R. J., 2006, 'Identification of high risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance', *Current Opinion in Microbiology*, vol. 9, pp. 454-460
- Leavis, H. L., Willems, R. J. L., Top, J., Spalburg, E., Mascini, E. M., Fluit, A. C., Hoepelman, A., de Neeling, A. J., Bonten, M. J. M., 2003, 'Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 9, pp. 1108-1115
- Lester, C. H., Frimodt-Møller, N., Lund Sørensen, T., Monnet, D. L., Hammerum, A. M., 2006, 'In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *Enterococcus faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, pp. 596-599
- Lester, C. H., Moller, N. F., Sorensen, T. L., Monnet, D. L., Hammerum, A. M., 2006, 'In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. Faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers', *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 50, pp. 596-599
- Levy, S. B., Marshall, B., 2004, 'Antimicrobial resistance worldwide: causes, challenges and responses', *Nature Medicine*, vol. 10, pp. 122-129
- Li, X. Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., Adewoye, L., 2007, 'Beta-Lactame resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin', *Veterinary Microbiology*, vol. 121, pp. 197-214
- López, M., Saenz, Y., Alvarez-Martinez, M. J., Marco, F., Robredo, B., Rojo-Bezares, B., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Torres, C., 2010, 'Tn1546 structures and multilocus sequence typing of *vanA*-containing enterococci of animal, human and food origin', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, pp. 1570-1575
- Lopez, M., Saenz, Y., Rojo-Bezares, B., Martinez, S., Del Campo, R., Ruiz-Larrea, 2009, 'Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *E.*

*faecium* CC17 and the new singleton ST425', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 133, pp. 172-178

Lynn, B., 1981, 'The stability and administration of intravenous penicillins', *British Journal of Intravenous Therapy*, vol. 2, pp. 22

Machado, E., Coque, T. M., Canton, R., Sousa, J. C., Peixe, L., 'Antibiotic resistant integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 62, pp. 296-302

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 1997, *Brock Biology of Microorganisms*, Englewood Cliffs, NJ Prentice Hall

Maiden, M.C.J., 2006, 'Multi locus Sequence Typing of Bacteria', *Annual Reviews of Microbiology*, vol. 60, pp. 561-588

Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martinez-Martinez, L., Nordmann, P., 2005, 'Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no. 1, pp. 71-76

Manges, R. M., Johnson, R. J., 2012, 'Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 55, no. 5, pp. 712-719

Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Jacoby, G. A., 1998, 'Quinolone resistance from a transferable plasmid', *Lancet*, vol. 351, pp. 797-799

Mora, A., Herrera, A., Mamani, R., Lopez, C., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Blanco, M., Dahbi, G., Garcia-Garrote, F., Pita, J. M., Coira, A., Bernandez, M. I., Blanco, J., 2010, 'Recent emergence of clonal group O25:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates', *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, pp. 6991-6997

Mora, A., López, C., Herrera, A., Viso, S., Mamani, R., Dhabi, G., Alonso, M. A., Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., 2012, 'Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111:H4-D-ST2085 and O111:H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential', *Veterinary Microbiology*, vol. 156, pp. 347-352

- Moreno, E., Prats, G., Planells, I., Planes, A. M., Perez, T., Andreu, A., 2006, 'Characterization of *Escherichia coli* isolates derived from phylogenetic groups A and B1 causing extraintestinal infection', [in Spanish], *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 24, pp. 483-489
- Mulvey, M.R., Susky, E., McCracken, M., Morck, D. W., Read, R. R., 2008, 'Similar cefotixin-resistance plasmids circulating in *Escherichia coli* from human and animal sources', *Veterinary Microbiology*, vol. 134, pp. 279-287
- Mundy, L. M., Sahm, D. F., Gilmore, M., 2000, 'Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance', *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 13, pp. 513-522
- Murray, B. E., 1990, 'The life and times of Enterococcus', *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 3, pp. 46-65
- Murray, B. E., 1997, 'Antibiotic resistance', *Advances in Internal Medicine*, vol. 42, pp. 339-367
- Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, M., Alonso, P., Canica, M. M., Park, Y., J., Lavigne, J. P., Pitout, J., Johnson, J. R., 2008, 'Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 61, pp. 273-281
- Nilsson, O., 2012, 'Vancomycin resistant *enterococci* in farm animals – occurrence and importance', *Infection Ecology and Epidemiology*, vol. 2: 16959
- Novais, C., Coque, T. M., Costa, M. J., Sousa, J., Baquero, F., Peixe, L. V., 2005, 'High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 56, pp. 1139-1143
- Obeng, S. A., Rickard, H., Ndi, O., Sexton, M., 2012, 'Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry', *Veterinary Microbiology*, vol. 154, pp. 305-315
- Ochman, H., Selander, R. K., 1984, 'Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations', *Journal of Bacteriology*, vol. 157, pp. 690-693
- Overdevest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., et al., 2011, 'Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase genes of *Escherichia coli* in



chicken meat and humans, the Netherlands', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, no. 7, pp. 1216-22

Papich, G. M., 2011, *Saunders Handbook of Veterinary Drugs: Small and Large animal, Third Edition*, Elsevier Saunders, Missouri, USA

Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G. A., 2002, 'Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases', *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 46, pp. 1-11

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Wadell, J., 2004, 'Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 53, no. 1, pp. 28-52

Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., Denamur E., 1999, 'The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection', *Infectious Immunology*, vol. 67, pp. 546-553

Platell, J. L., Johnson, J. R., Cobbold, R. N., Trott, D., J., 2011, 'Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods', *Veterinary Microbiology*, vol. 153, pp. 99-108

Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J., Torres, C., 2006, 'Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in fecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal', *Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 27, pp. 131-137

Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P., 2012, 'Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies', *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, art. 24, pp. 1-7

Radu, S., Toosa, H., Rahim, R. A., Reezal, A., Ahmad, M., Hamid, A. N., Rusul, G., Nishibuchi, M., 2001, 'Occurrence of the *vanA* and *vanC2/C3* genes in *Enterococcus* species isolated from poultry sources in Malaysia', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 39, pp. 145-153

- Randall, L. P., Clouting, C. S., Wearing, H., Toszeghy, M. J., Horton, R., Coldham, N., Clifton-Hardley, F. A., Teale, C. J., Davies, R. H., 2010, 'Prevalence of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* in chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009', *20<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*
- Rice, L. B., Bonomo, R. A., 1996, 'Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents', *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams and Welkins, Baltimore, pp. 453-501
- Rizzoti, L., Simeoni, D., Coconcelli, P., Gazzola, S., Dellaglio, F., Torriani, S., 2005, 'Contribution of *enterococci* to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities', *Journal of Food Protection*, vol. 68, pp. 955-965
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., 2006, 'The worldwide emergence of plasmid mediated quinolone resistance', *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 6, pp. 629-640
- Rodriguez-Martinez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martinez-Martinez, L., Pascual, A., 2011, 'Plasmid-mediated quinolone resistance: an update', *Journal of Infectious Chemotherapy*, vol. 17, pp. 149-182
- Rodriquez, M. M., Power, P., Radice, M., Vay, C., Famiglietti, A., Galleni, M., Ayala, J. A., Gutkind, G., 2004, 'Chromosome-Encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, no. 12, pp. 4895-4897
- Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C., 2004, 'Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins', *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 48, no. 10, pp. 3996-4001
- Salyers, A. A., 2002, 'An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture', *Animal Biotechnology*, vol. 13, pp. 1-5
- Sanchez Valenzuela, A., Omar, N. B., Abriouel, H., Lopez, R. I., Ortega, E., Canamero, M. M., et al., 2008, 'Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of

antimicrobial resistance and incidence of virulence factors', *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, pp. 2648-2652

Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., Whittam, T. S., 1986, 'Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 51, pp. 873-884

Selander, R. K., Caugant, D. A., Whittam, T. S., 1987, 'Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*', *Cellular and Molecular Biology*, pp. 1625-1648. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology

Seza, A., Ayla, E., 2011, 'Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Escherichia coli* from retail meats', *Journal of Food Safety*, vol. 31, pp. 262-267

Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B., et al., 2008, 'Diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates on Belgian broiler farms', *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 52, pp. 1238-43

Smet, A., Rasschaert, G., Martel, D., Persoons, D., Dewulf, J., Butaye, P., Catry, B., Haesebrouck, F., Herman, L., Heyndrickx, M., 2010, 'In situ ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration', *Journal of Applied Microbiology*, vol. 110, pp. 541-549

Sparo, M., Urbizu, L., Solana, M. V., Pourcel, G., Delpech, G., Confalonieri, A., 2012, 'High-level resistance to gentamycin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota', *Letters in Applied Microbiology*, vol. 54, pp. 119-125

Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., Robicsek, A., 2009, 'Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat', *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, no. 4, pp. 664-689

Szmolka, A., Fortini, D., Villa, L., Carattoli, A., Anjum, M. F., Nagy, B., 2011, 'First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe', *Microbial Drug Resistance*, vol. 17, pp. 567-573

- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010, 'The population genetics of commensal *Escherichia coli*', *Nature Reviews of Microbiology*, vol. 8, pp. 207-217
- Thorsteinsdottir, R. T., Haraldsson, G., Fridriksdottir, V., Kristinsson, G., K., Gunnarsson, E., 2010, 'Broiler chickens as source of human fluoroquinilone-resistant *Escherichia coli*, Iceland', *Emerging Infectious Diseases*, vol.16, no. 1, pp. 133-135
- Top, J., Schouls, M. L., Bonten, J. M. M., Willems, J. L. R., 2004, 'Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, pp. 4503-4511
- Tran, J. H. and Jacoby, G. A., 2002, 'Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance', *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, vol. 99, pp. 5638-5642
- Trobos, M., Christensen, H., Sunde, M., Nordentoft, S., Agersø, Y., Simonsen, S. G., Hammerum, M. A., Olsen, E. J., 2009, 'Characterization of sulphonamide-resistant *Escherichia coli* using comparison of *sul2* gene sequences and multilocus sequence typing', *Microbiology*, vol. 155, pp. 831-836
- Tzavaras, I., Siarkou, V., Zdragas, A., Kotzamanidis, C., Vafeas, G., Bourtzi-Hatzopoulou, E., Pournaras, S., Sofianou, D., 2012, 'Diversity of *vanA*-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from broilers, poultry slaughterers and hospitalized humans in Greece', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, no. 8, pp. 1811-1818
- Unno, T., Han, D., Jang, J., Lee, S. N., Ko, G., Ha, Y. C., Joon, H. K., Sadowsky, M. J., Hur, H. G., 2009, 'Absence of *Escherichia coli* phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam Province, Republic of Korea', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, pp. 5659-5666
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., Verbrugh, H., 1998, 'Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol.62, pp. 275-293

van den Bogaard, A. E., Bruinsma, N., Stobberingh, E. E., 2000, 'The effect of banning avoparcin on VRE carriage in the Netherlands', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol.46, pp. 146-148

van den Bogaard, A. E., Bruinsma, N., Stobberingh, E. E., 2000, 'The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 46, pp. 146-148

van den Bogaard, A. E., Stobberingh, E. E., 2000, 'Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans', *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 14, pp. 327-335

van den Bogaard, A. E., Willems, R., London, N., Top, J., Stobberingh, E. E., 2002, 'Antibiotic resistance of fecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughteners', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 49, pp. 497-505

van der Steen, L. F., Bonten, M. J., van Kregten, E., Harssema-Poot, J. J., Willems, R., Gaillard, C. A., 2000, 'Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* outbreak in a nephrology ward', *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, vol. 144, pp. 2568-2572

Vincent, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dozois, C. M., Dutil, L., Galanakis, C., Reid-Smith, J. R., Tellier, P. P., Tellis, P. A., Ziebell, K., Manges, A. R., 2010, 'Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 16, pp. 88-95

Wassenaar, T. M., 2005, 'Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and implications for human health', *Critical Reviews of Microbiology*, vol. 31, no. 3, pp. 155-169

Werner, G., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A. et al., 2008, 'Emergence and spread of vancomycin resistance among *enterococci* in Europe', *Euro Surveillance*, vol. 13, pp. 47

Werner, G., Klare, I., Witte, W., 2007, 'The current MLVA scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types', *BMC Microbiology*, vol. 7, no. 28, doi: 10. 1186/1471-2180-7-28

Willems, J. L. R., Homan, W., Top, J., van Santen-Verheувel, M., Tribe, D., Manzioros, X., Gaillard, C., Vandenbroucke-Grauls, M. J. E. C., Mascini, M. E. et al., 2001, 'Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals', *The Lancet*, vol. 357, pp. 853-855

Willems, R. J. L., Top, J., Van Santen, M., Robinson, D. A., Coque, T. M., Baquero, F., Grundmann, H., Bonten, M. J. M., 2005, 'Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 11, pp. 821-828

Willems, R. J. L., van Schaick, W., 2010, 'Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen', *Future Microbiology*, vol. 4, pp. 1125-1135

Willems, R. J. L., Top, J., van Schaik, W., et al., 2012, 'Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*', *ASM Journals*, mBio 3(4):.doi:10.1128/mBio.00151-12

Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., et al., 2006, 'Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective', *Molecular Microbiology*, vol. 60, pp. 6175-6181

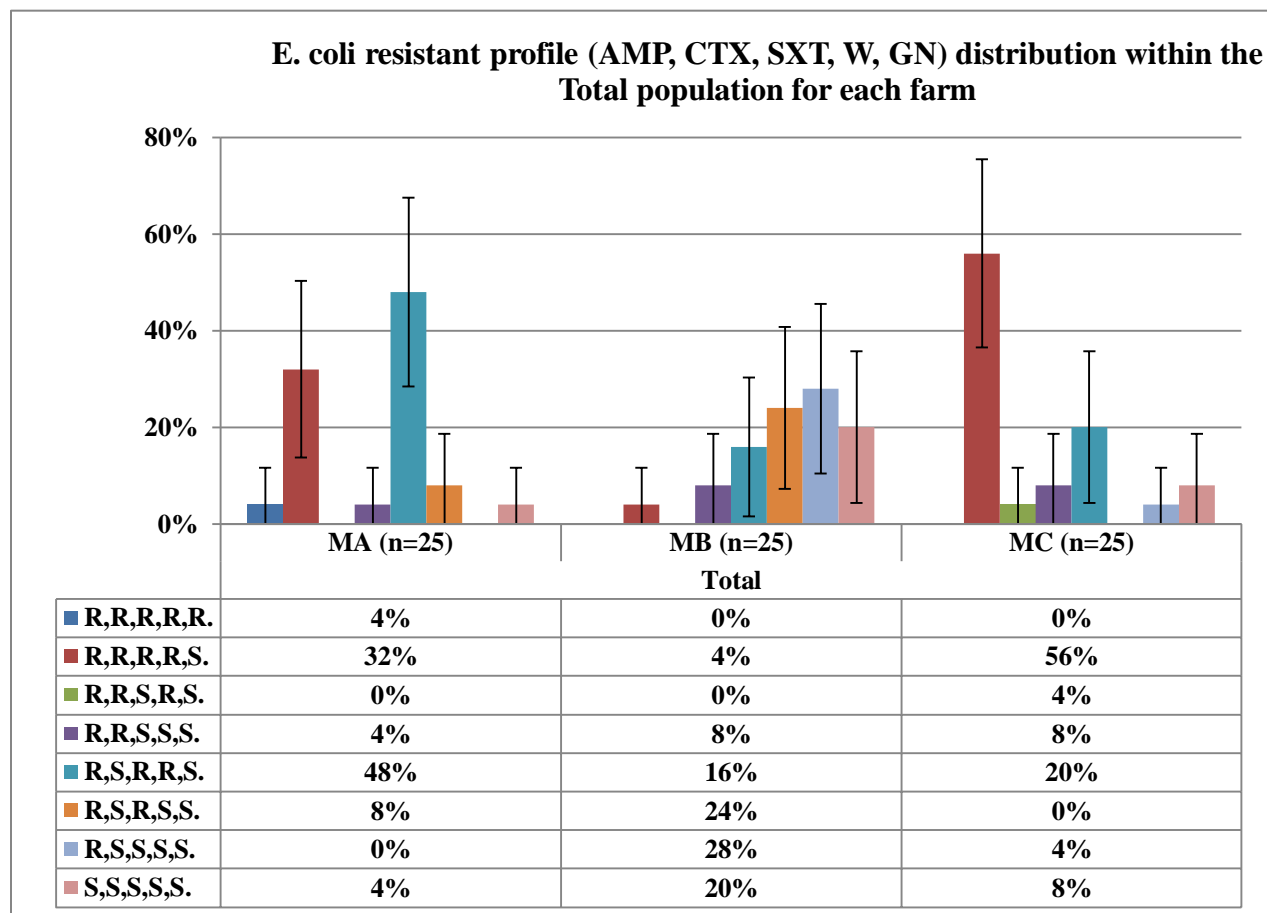
World Health Organization (WHO), 2007, *Food Safety and Food-Borne Illness, Fact sheet No. 237*, Geneva, Switzerland

Yue, L., Chen, X., Li, S., Liao, X., Zhuang, N., Liu, Y. H., 2011, 'First report of plasmid-mediated quinolone resistance *qnrA1* gene in *Klebsiella pneumonia* isolate of animal origin', *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 8, pp. 565-568

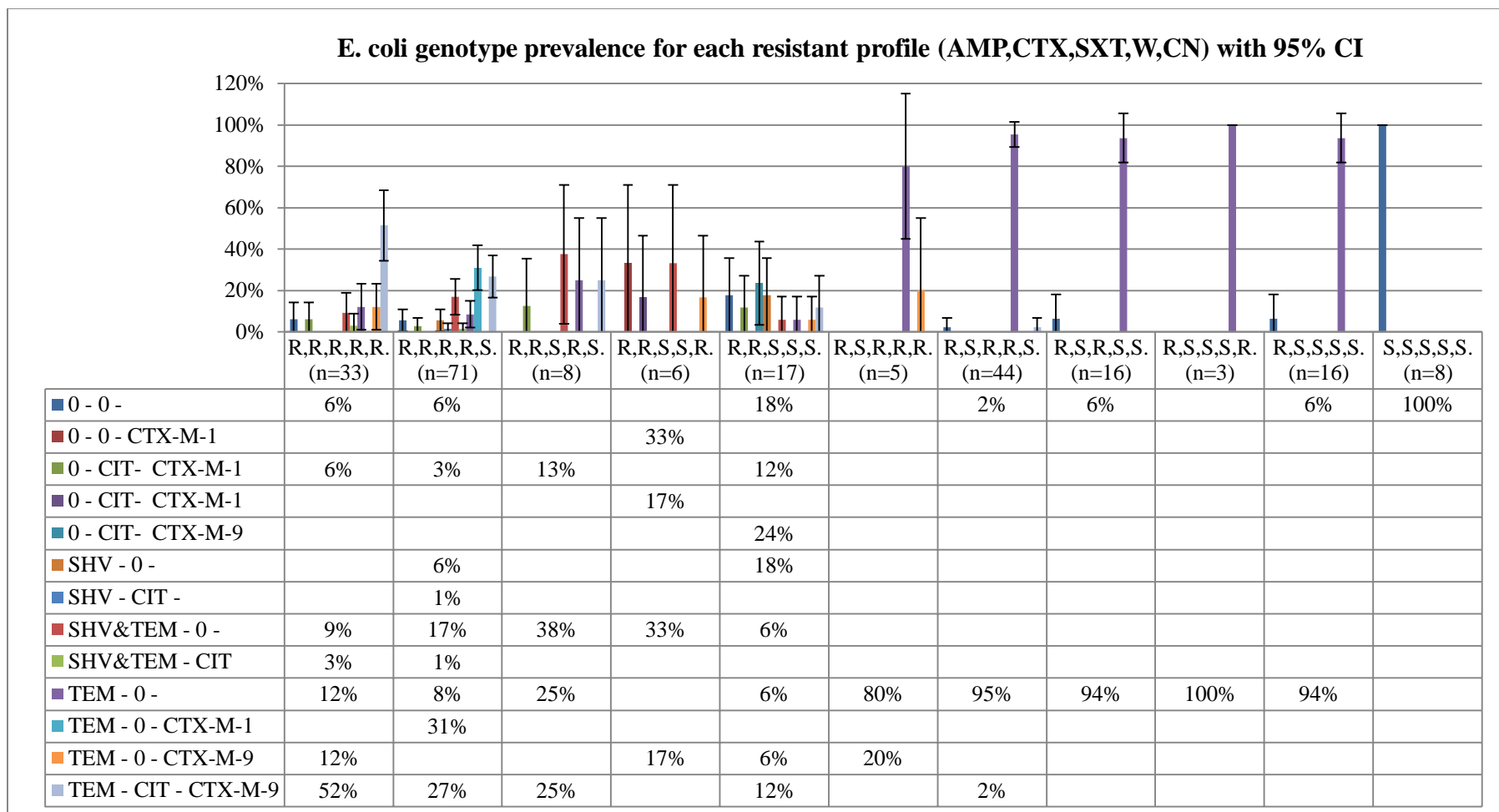
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 8.1. Συμπληρωματικά δεδομένα

Πίνακας 9: Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας των *E. coli* ανάμεσα στον ολικό πληθυσμό κάθε φάρμας

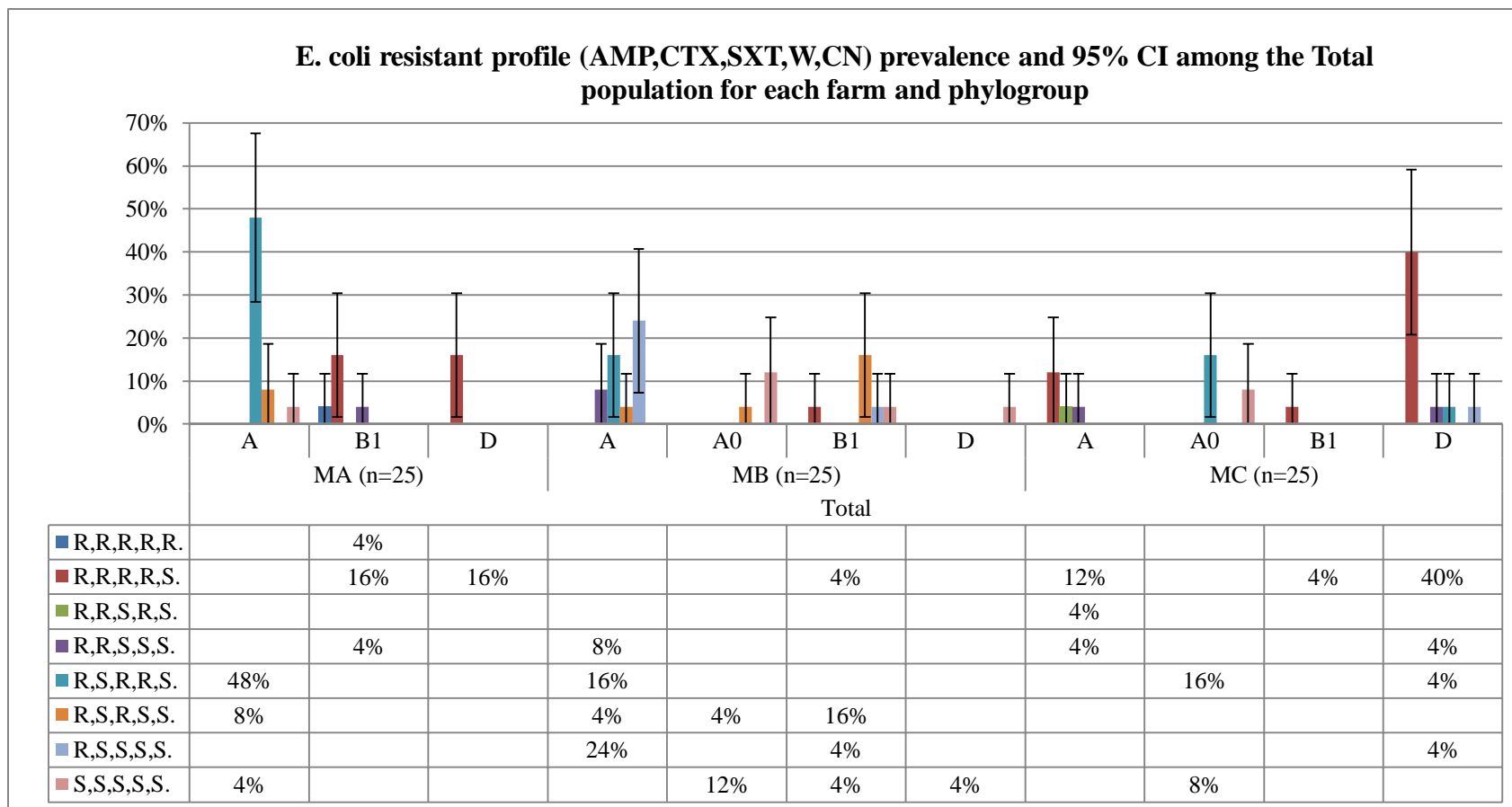


Πίνακας 10: Επιπολασμός γονότυπων ανθεκτικότητας των *E. coli* σε κάθε φαινότυπο ανθεκτικότητας

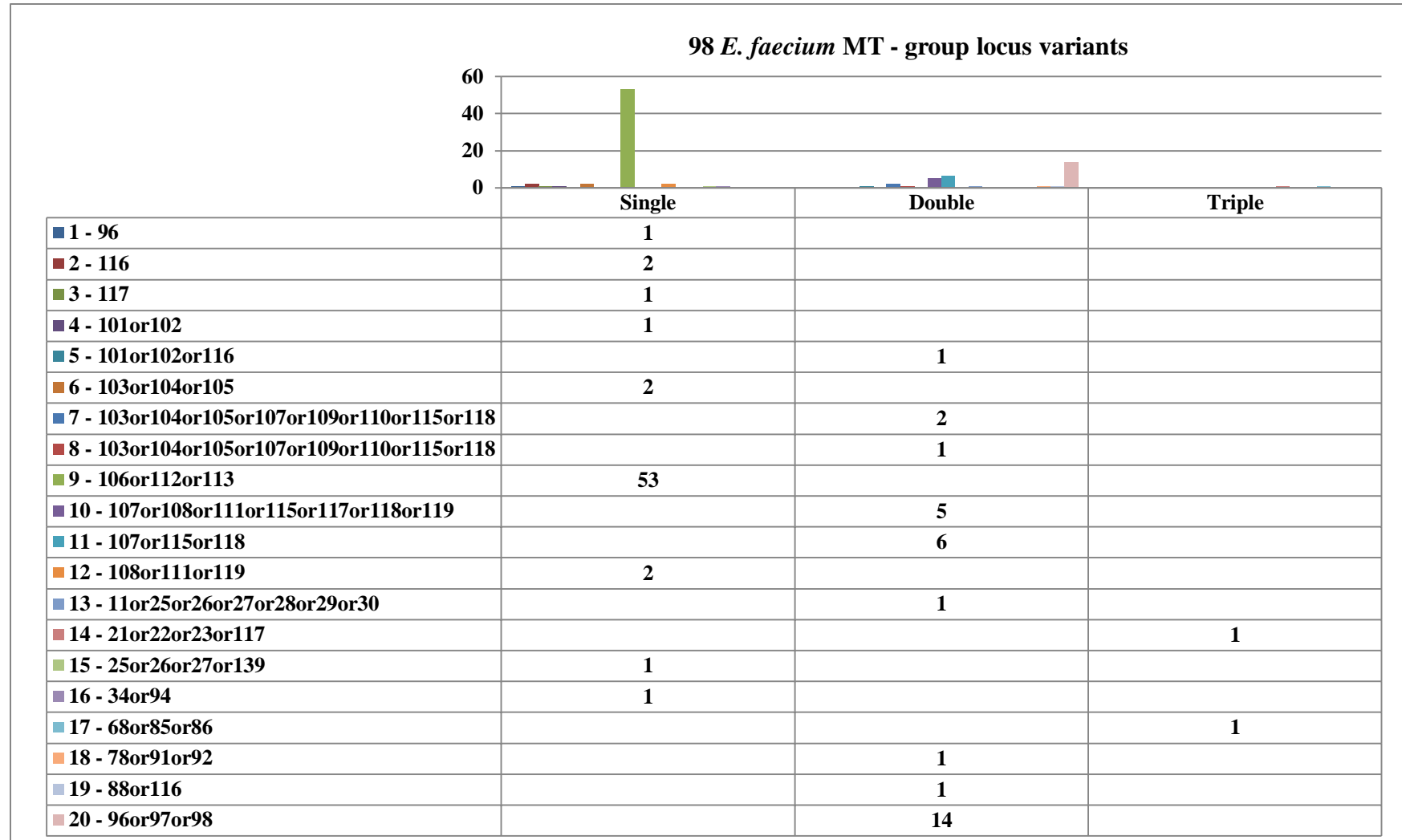




Πίνακας 11: Επιπολασμός των φαινότυπων ανθεκτικότητας των *E. coli* στον ολικό πληθυσμό κάθε φάρμας και φυλογενετικής ομάδας



Πίνακας 15: Πιθανά MTs της βάσης δεδομένων του UMC που αντιστοιχούν σε κάθε ομάδα MT-1-20. Η επιλογή έγινε με βάση το εγγύτερο προφίλ αλληλομόρφων VNTR (single, double και triple locus variants)



Πίνακας 16: Κατανομή των 98 απομονώσεων του *E. faecium* ανάμεσα σε 20 ομάδες MT και 15 ST

