

Γονίδια *E. coli* που κωδικοποιούν την αντοχή  
στις ευρέως φάσματος β- λακταμάσες (ESBL  
ή/και AmpC) σε παραγωγικά ζώα & τρόφιμα

Νίκη Κ. Μουττωτού Κτηνίατρος - Επιδημιολόγος

# Η εμφάνιση της αντοχής στα αντιβιοτικά

- *“It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body.” Sir Alexander Fleming, 1945*
- *Το ζήτημα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αναγνωρίστηκε πολύ νωρίς «στην εποχή των αντιβιοτικών».*

*Απειλεί την ικανότητα μας για τον έλεγχο λοιμώξεων.*

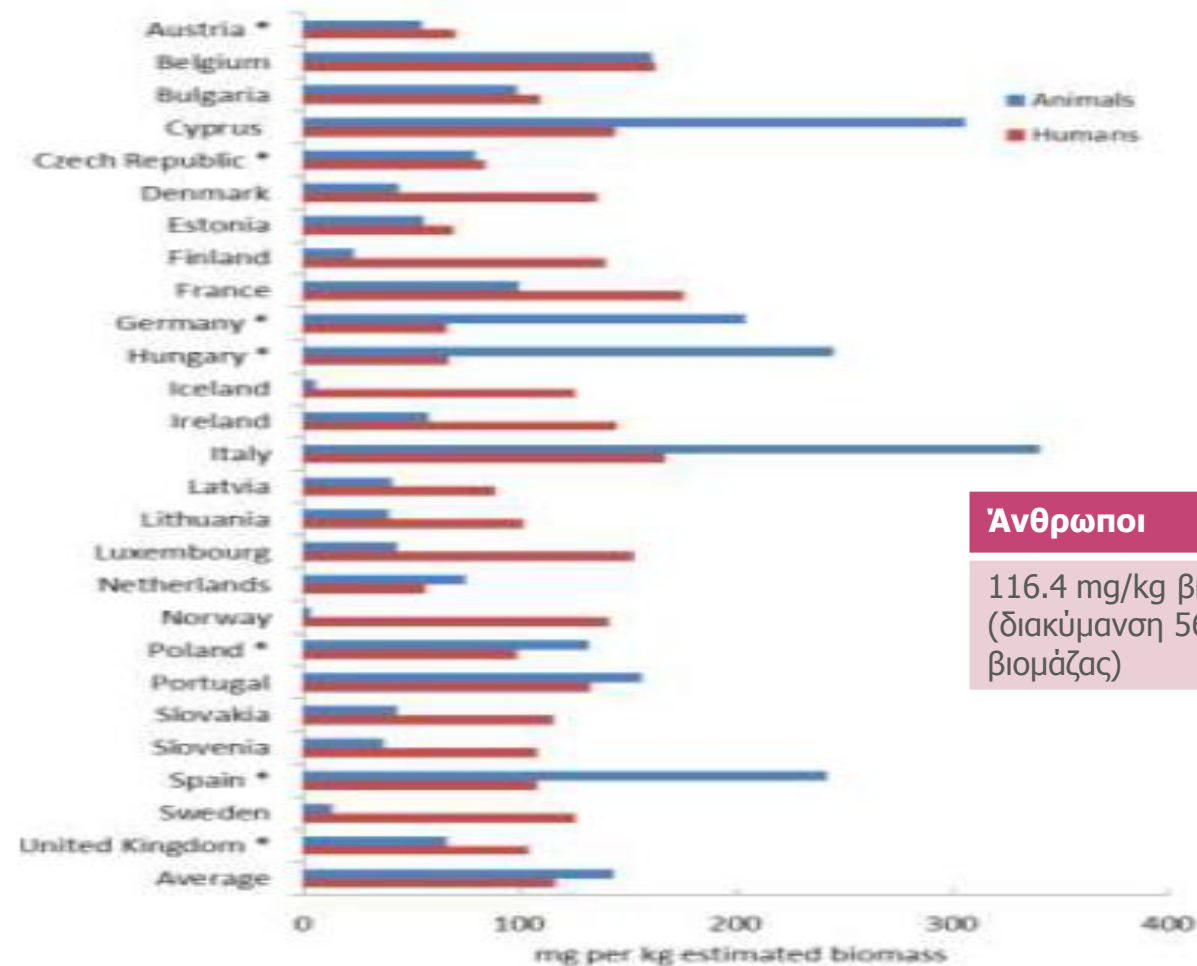
# Ποια είναι η τρέχουσα κατάσταση;;;

## Αυξανόμενοι ρυθμοί μικροβιακής αντοχής

- Μη σωστή (αλόγιστη, άσκοπη, μη συνετή!!!!) χρήση αντιμικροβιακών ουσιών
- Έλλειψη νέων αντιμικροβιακών ουσιών

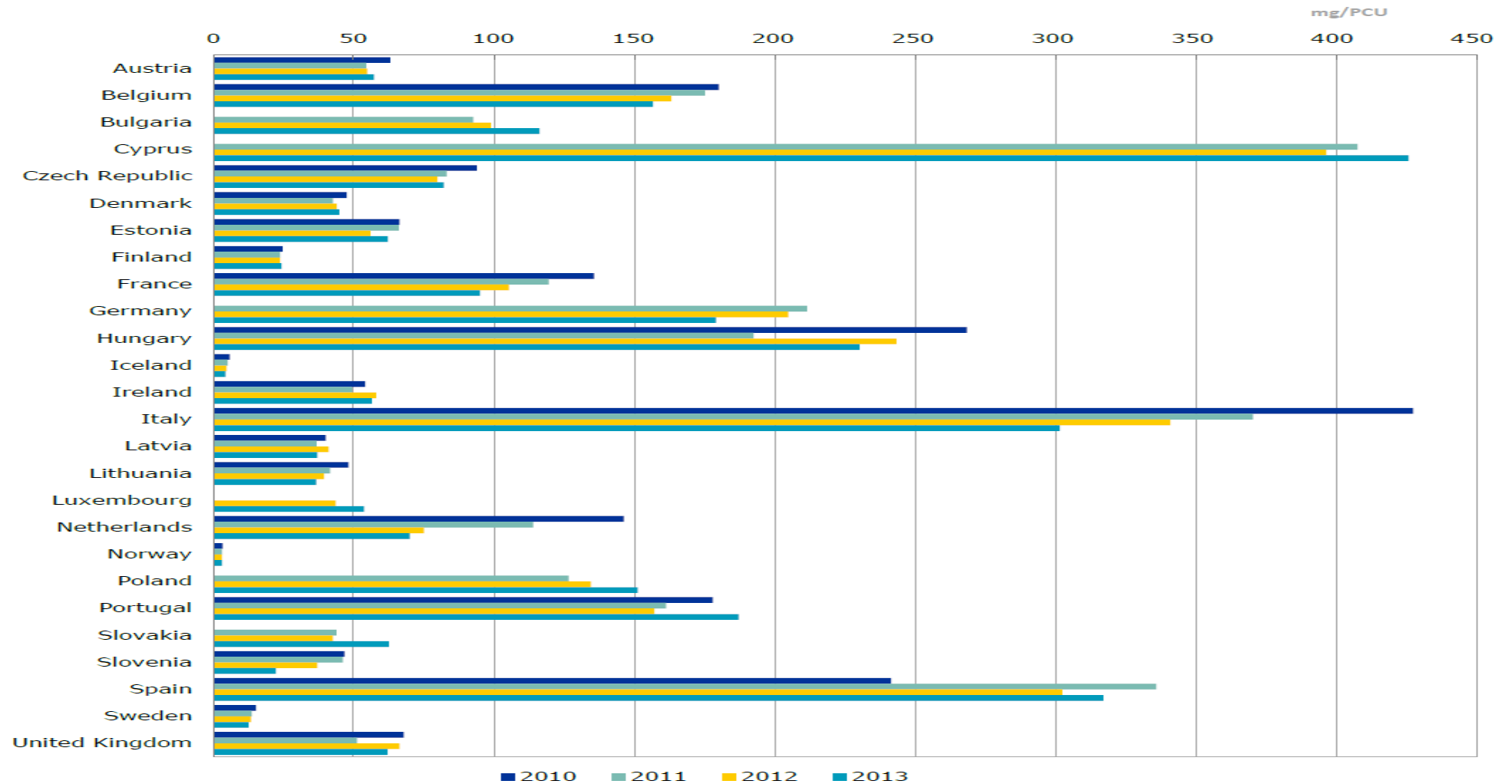
# Κατανάλωση αντιμικροβιακών ουσιών

**Figure 3.** Comparison of biomass-corrected consumption of antimicrobials (milligrams per estimated biomass) in humans and food-producing animals by country in 26 EU/EEA countries 2012<sup>18,19,20</sup>



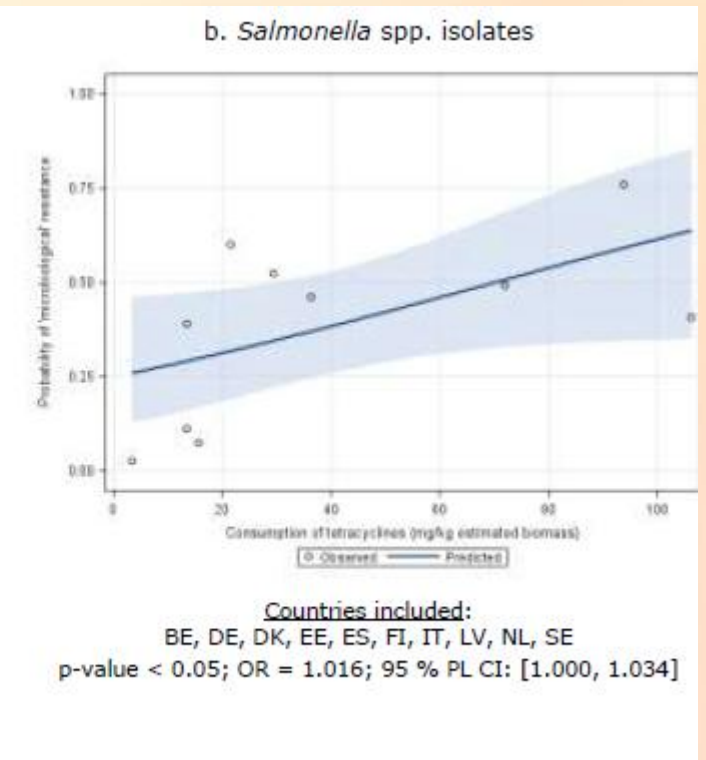
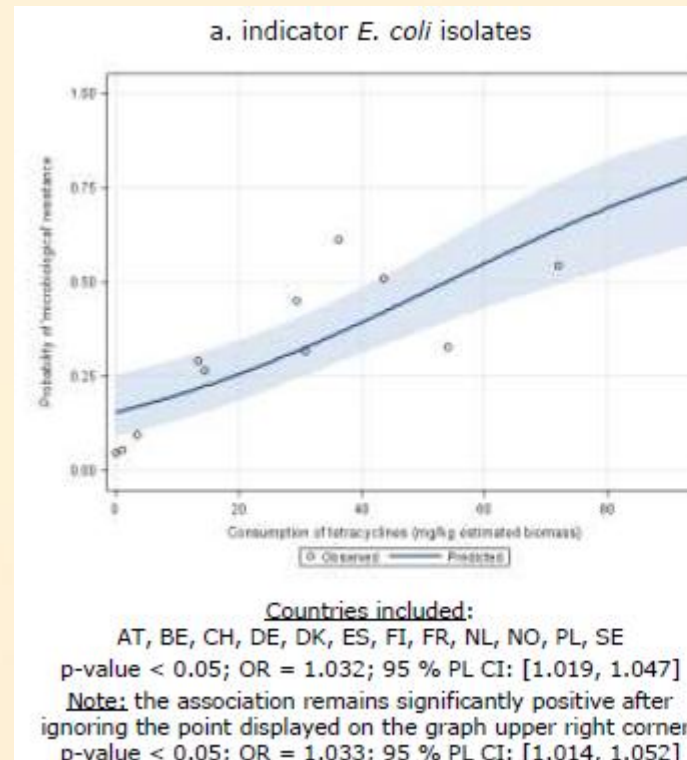
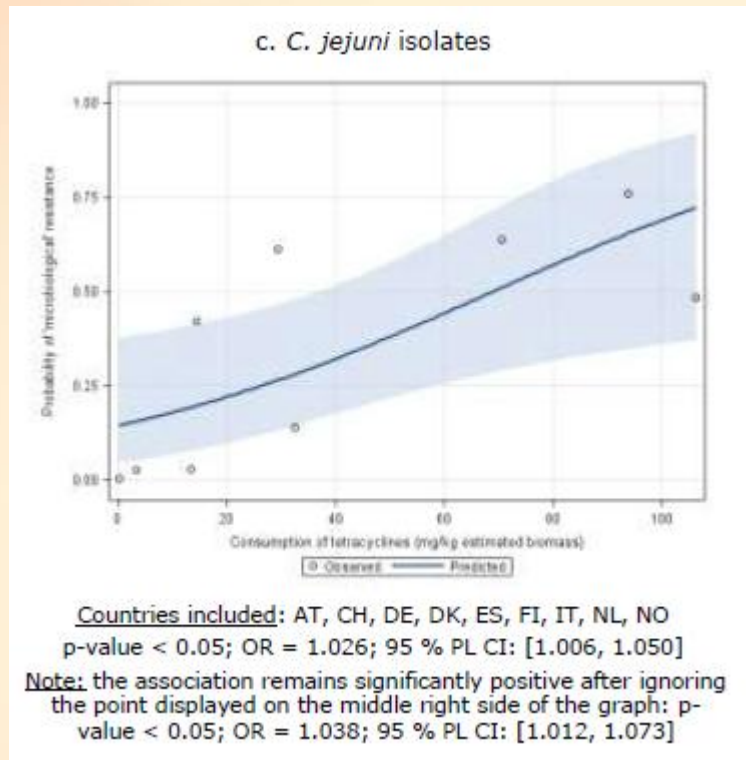
Άνθρωποι	Παραγωγικά ζώα
116.4 mg/kg βιομάζας (διακύμανση 56.7-175.8mg/kg βιομάζας)	144.0 mg/kg βιομάζας (διακύμανση 38-396.5 mg/ kg βιομάζας)

**Figure 55.** Total sales of veterinary antimicrobial agents for food-producing species, including horses, in mg/PCU, during 2010 to 2013, for 26 EU/EEA countries<sup>1-6</sup>



PCU = technical unit or measurement to estimate sales corrected by the animal population in individual countries and across countries  
 1PCU = 1 kg of different categories of livestock and slaughtered animals

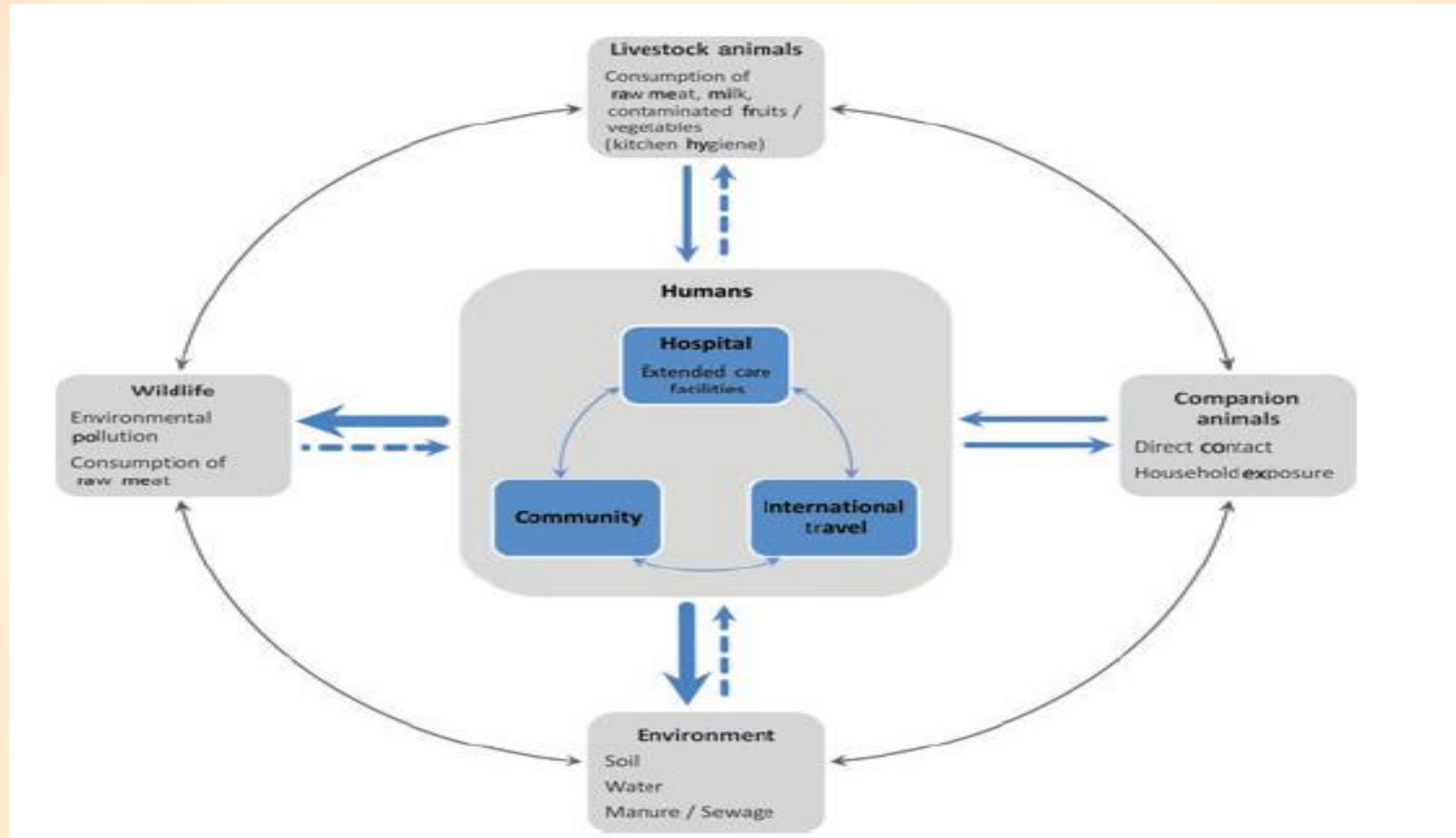
# Σχέση μεταξύ κατανάλωσης αντιμικροβιακών ουσιών και αντοχής στις αντιμικροβιακές ουσίες στα παραγωγικά ζώα



ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals

EFSA Journal 2015;13(1):4006 [114 pp.].doi: 10.2903/j.efsa.2015.4006

# Οδοί μετάδοσης της μικροβιακής αντοχής σε διάφορους φορείς



# EU Action Plan to compact the rising threads from Antimicrobial Resistance

## Political commitments in the EU

- Council Recommendation of 9 June 2009 on the prevention and control of health-care associated infections
  - Resolutions EP: 12 May 2011 on antibiotic resistance and 27 October 2011 on the public health threat of antimicrobial resistance
  - Council conclusions on the impact of antimicrobial resistance in the human health sector and in the veterinary sector – a "One Health" perspective – 22 June 2012 (DK)
  - EP Report on the Microbial Challenges – Rising Threats from AMR (2012/2041 (INI)) – 11 December 2012
  - Council Conclusions on Patient Safety, Healthcare associated infections and AMR – 1 December 2014
- Global Action Plan (GAP) on Antimicrobial Resistance – WHO – May 2015 by the 68<sup>th</sup> World Health Assembly
  - Declaration by the G7 on Antimicrobial Resistance and the decision to put antimicrobial resistance on the agenda of G20



# Αντοχή μικροβίων στα αντιβιοτικά

Τα μικρόβια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς να εξουδετερώνουν τη δράση των αντιμικροβιακών παραγόντων

- Φυσική ή ενδογενής (intrinsic) εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων και καθορίζεται γενετικά
- Επίκτητη (acquired) αναπτύσσεται σε αρχικά ευαίσθητα μικρόβια με διάφορους μηχανισμούς

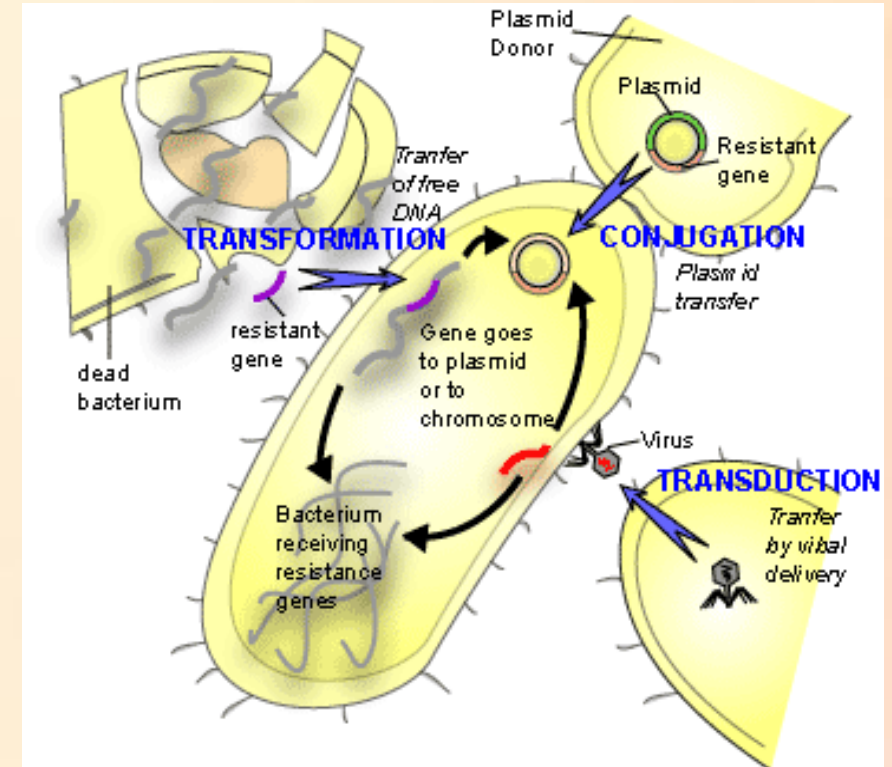
# Φυσική αντοχή Εντεροβακτηριοειδή

- Πενικιλίνη G
- Γλυκοπεπτίδια
- Φουσιδικό οξύ
- Μακρολίδες
- Κλινδαμυκίνη
- Λινεζολίδη
- Στρεπτογραμμίνες
- Μουπιροσίνη

# Γενετικοί μηχανισμοί επίκτητης αντοχής

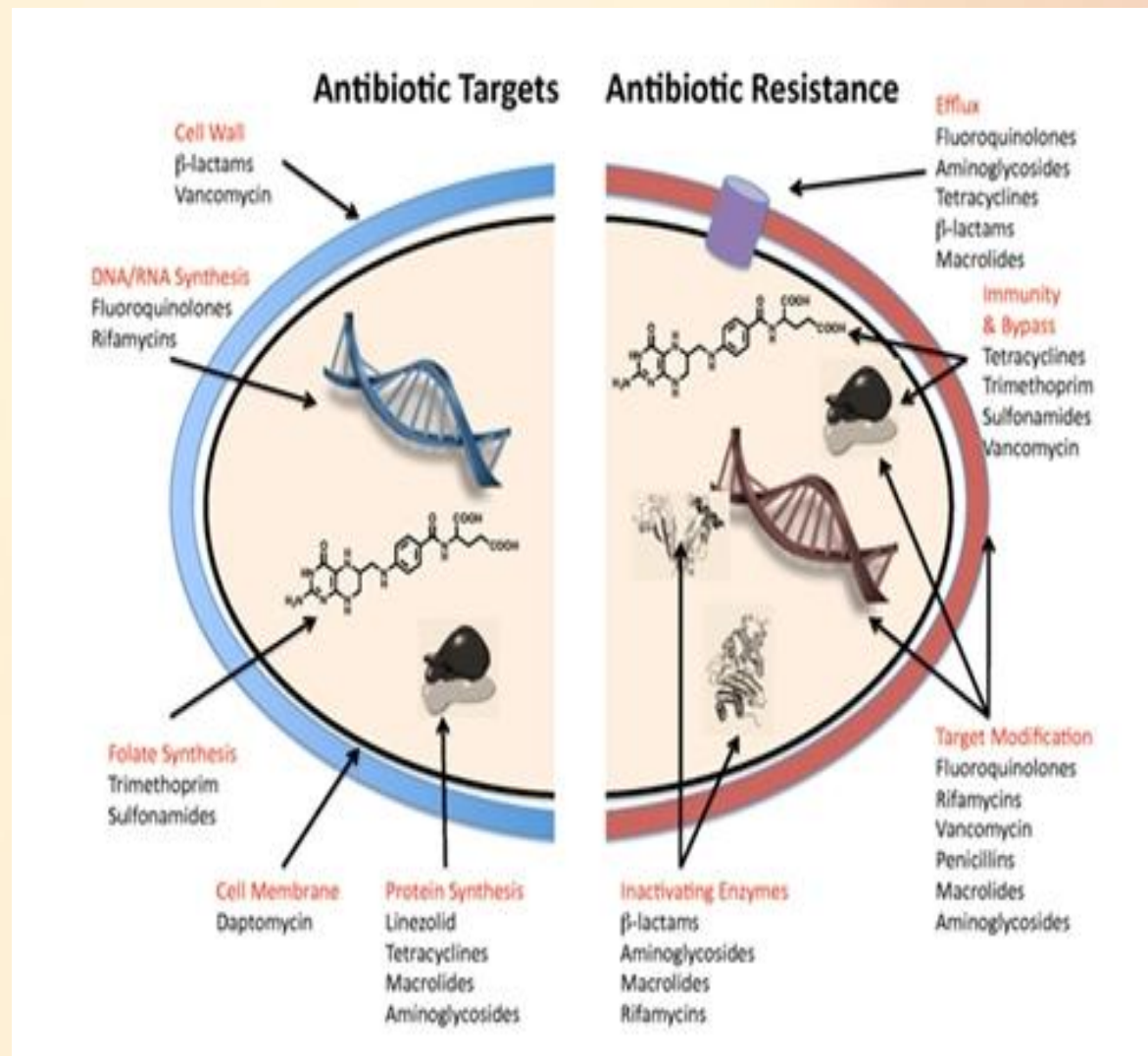
Η επίκτητη αντοχή οφείλεται σε:

- μεταλλαγές (mutations) στη δομή του χρωμοσωματικού DNA – μεταλλαγές αντοχής επιλέγονται μετά από ‘πίεση’ αντιβιοτικών
- απόκτηση γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια:
  - Μεταμόρφωση (genetic transformation)
  - Σύζευξη (bacterial conjugation)
  - Μεταγωγή (genetic transduction)



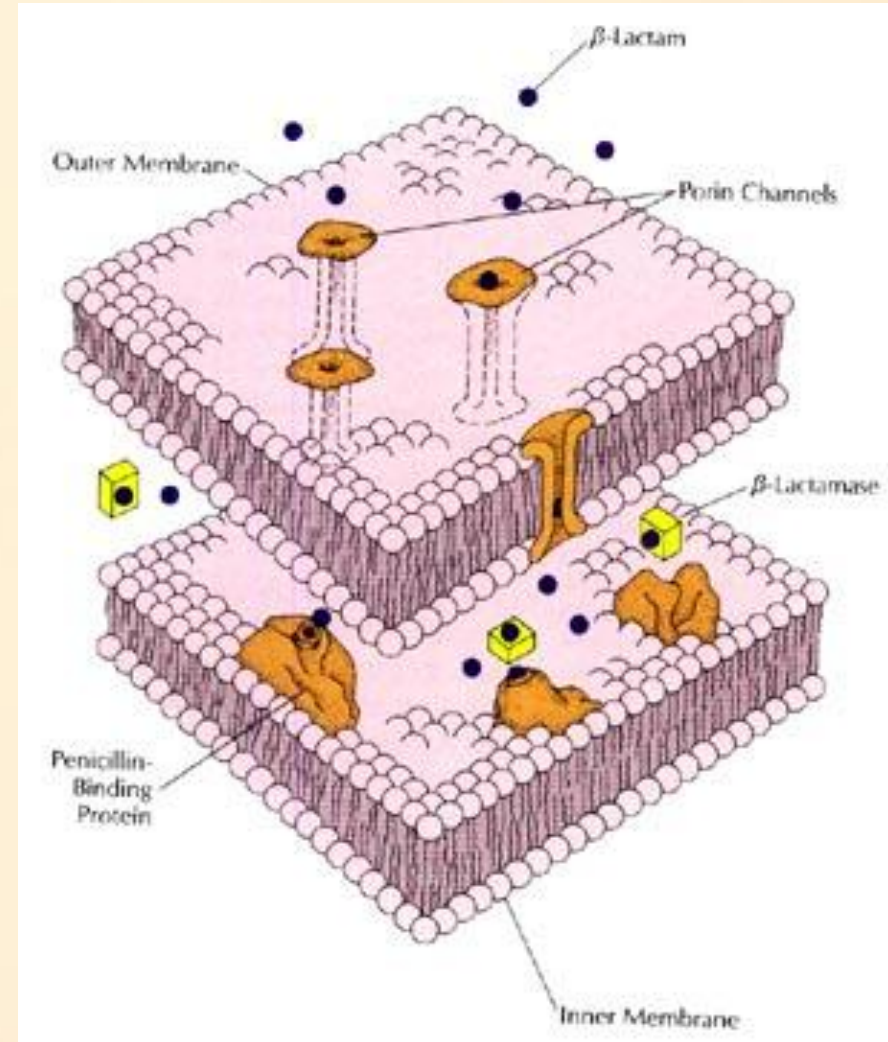
# Μηχανισμοί αντοχής

- 1) παρεμπόδιση του αντιμικροβιακού να φτάσει στο στόχο του, μειώνοντας την ικανότητα του να διεισδύει στο κύτταρο
- (2) αποβολή των αντιμικροβιακών παραγόντων από το κύτταρο μέσω γενικών ή ειδικών αντλιών εκροής
- (3) τροποποίηση του αντιμικροβιακού στόχου εντός των βακτηρίων
- (4) Αδρανοποίηση των αντιμικροβιακών παραγόντων μέσω τροποποίησης ή αποικοδόμησης



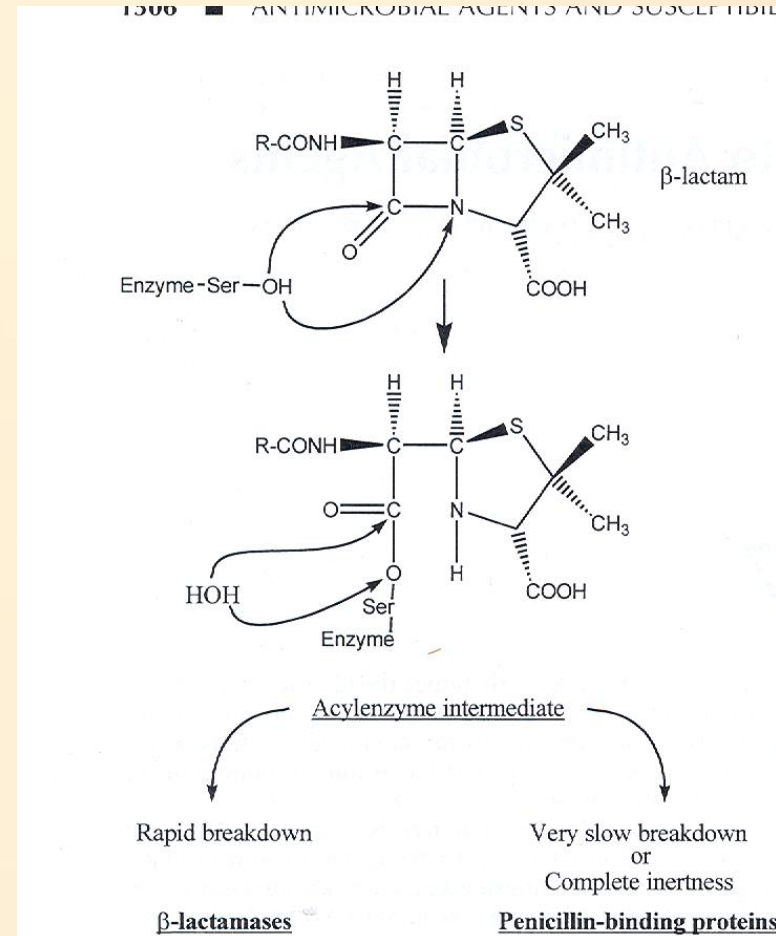
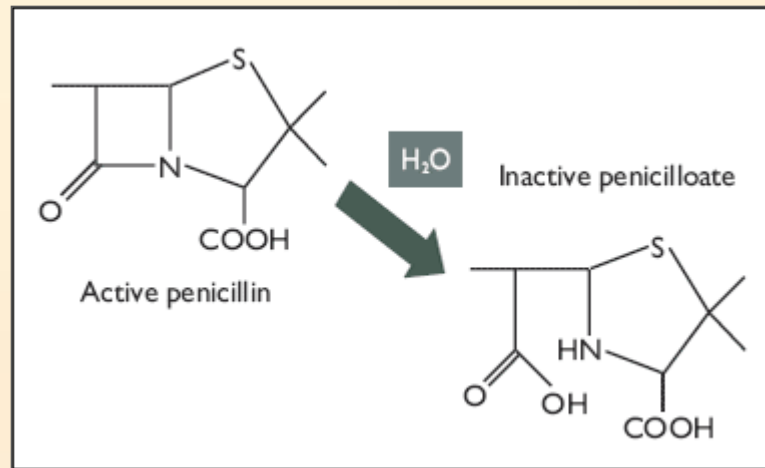
# β-λακταμάσες

- Βακτηριακά ένζυμα πρωτεϊνικής φύσης
- Εκκρίνονται στο περιβάλλον του μικροβιακού κυττάρου [Gram(+)βακτήρια] ή στον περιπλασμικό χώρο [Gram(-) βακτήρια]
- Κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια



# Μηχανισμός δράσης β-λακταμασών

Αδρανοποιούν τις β-λακτάμες, υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό  $O=C-N$  του β-λακταμικού δακτυλίου



## Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum Beta-Lactamases, **ESBLs**)

- Η πρώτη πλασμιδιακή (TEM-1) βρέθηκε στην Ελλάδα (1965)
- παγκόσμια διασπορά (~400 ένζυμα)
- Προέρχονται από τις αρχικές **TEM-1, -2** (>160 ένζυμα) και **SHV-1** (100 ένζυμα)
  - Πλασμιδιακές (*E. coli*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*)
  - Χρωμοσωματικές (SHV-1 *K. pneumoniae*)
- **1995**: Νεότερες ESBLs –τύπου **CTX-M** (>65 ένζυμα) – **Λοιμώξεις της Κοινότητας**
  
- Υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες
- Δεν υδρολύουν τις καρβαπενέμες (IMP, MEM, ERT)
- Αναστέλλονται από τους αναστολείς (CLAV)
- Κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται σε πλασμίδια, μαζί με άλλα γονίδια αντοχής, με συνέπεια την πολυαντοχή!
- **Θεραπεία Εκλογής: Καρβαπενέμες**

# AmpC β-λακταμάσες “Κεφαλοσπορινάσες”

- CIT-, ENT-, FOX-, MOX-, DHA-, ACC-
  - Χρωμοσωματικές
  - Πλασμιδιακές

(Η σύνθεση και παραγωγή τους ελέγχεται από ένα σύστημα γονιδίων ampC-ampG-ampD-ampR)

- Υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά, πλην κεφεπίμης (!) και καρβαπενεμών
- Δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς (CLAV)
- Όταν συνυπάρχει απώλεια πορινών προκαλείται αντοχή στις καρβαπενέμες



# Χαρακτηριστικά υδρόλυσης ESBL,AmpC

Β λακταμάσες	Προφίλ Υδρόλυσης				Αναστολή από κλαβουλανικό οξύ
	CAZ/CTX	FOX	FEP	IPM	
ESBL	+	-	+	-	√
AmpC	+	+	-	-	-
CAZ=ceftazitime, CTX=cefotaxime, FOX=cefoxotin, FEP-cefepime, IPM= imipenem					

# Στελέχη *E.coli*

- Συμβιωτικό της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας
- Παθογόνα στελέχη
  - παθότυποι ζωνογόνοι
  - εξωεντερικά (Extraintestinal pathogenic *E.coli* ExPEC)
    - (i) εντεροπαθογόνος - enteropathogenic -*E. coli* (EPEC) – διάρροια στα παιδιά & ζώα
    - (ii) εντεροαιμορραγική - enterohaemorrhagic -*E. coli* (EHEC) – αιμορραγική κολίτιδα & αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο
    - (iii) εντεροτοξινογόνος *E. coli* (ETEC) – διάρροια των ταξιδιωτών & διάρροια χοίρων & βοοειδών
    - (iv) εντεροσυναθροιστικό - enteroaggregative *E. coli* (EAEC) επίμονη διάρροια στους ανθρώπους
      - diffusely adherent *E. coli* (DAEC), a subclass of enteroaggregative *E. coli* – διάρροια στα παιδιά
    - (v) εντεροδιηθητική - enteroinvasive -*E. coli* (EIEC) – υδαρής διάρροια & δυσεντερία,
    - (vi) ουροπαθογόνος -uropathogenic- *E. coli* (UPEC) – λοιμώξεις ουρογεννητικού σε ανθρώπους & ζώα
    - (vii) Νεογνική - neonatal meningitis *E. coli* (NMEC) – μηνιγγίτιδα & σηψαιμία

# Βακτηριακή απομόνωση, screening ESBL/AmpC, Προσδιορισμός ανθεκτικών γονιδίων με mPCR

- Απευθείας απομόνωση σε χρωμογόνο υπόστρωμα (Tbx) εκλεκτική απομόνωση σε χρωμογόνο υπόστρωμα (MacConkey) με προσθήκη 1mg/lit cefotaxime
- MIC (MH broth) ερμηνεία αποτελεσμάτων EUCAST epidemiological cut-off values (ECOFFs)
- Επιβεβαίωση ESBL/AmpC

όλα τα απομονώματα ανθεκτικά στο Cefotaxime (FOT), Ceftazidime (TAZ), Meropenem (MER)

με τεστ συνέργειας (2<sup>η</sup> πλάκα MIC) => συνέργεια είναι η διαφορά 3 αραιώσεων μεταξύ 2 τιμών MIC)

- Όλα τα απομονώματα με φαινότυπο αντοχής ESBL ή/ & AmpC ελέχθηκαν με multiplex PCR

Οικογένειες γονιδίων που εξετάστηκαν

ESBL (TEM, CTX, SHV, OXA)

AmpC (MOX, CIT, DHA, FOX, EBC)

Target gene	Primer	Primer Sequence	Expected amplicon size (bp)	
CTX-M IV	CTX-M IV F	GACAAAGAGAGTGCAACGGATG	501	Kim et al, 2009
	CTX-M IV R	TCAGTGCGATCCAGACGAAA		
TEM	TEM F	AGTGCTGCCATAACCATGAGTG	431	
	TEM R	CTGACTCCCCGTCGTGTAGATA		
OXA	OXA F	ATTATCTACAGCAGCGCCAGTG	296	
	OXA R	TGCATCCACGTCTTTGGTG		
SHV	SHV F	GATGAACGCTTTCCCATGATG	214	
	SHV R	CGCTGTTATCGCTCATGGTAA		
MOX	MOXMF	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520	
(MOX-1, MOX-2, CMY-2, CMY-8, CMY-11)	MOXMR	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C		Perez-Perez et al., 2002)
CIT	CITMF	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462	
(LAT -, LAT-4, CMY-2, CMY-7, BIL-1)	CITMR	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC		
DHA	DHAMF	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405	
(DHA-1, DHA-2)	DHAMR	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC		
EBC	EBCMF	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302	
(MIR-1T, ACT-1)	EBCMR	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT		
FOX	FOXMF	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190	
(FOX-1, FOX 5-b)	FOXMR	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG		

# Αποτελέσματα

2014	Αριθμός στελεχών E. coli που απομονώθηκαν	Αριθμός στελεχών ESBL/ AmpC	Γονίδια αντοχής	Επιπολασμός ESBL E.coli –EU	Επιπολασμός γονιδίων αντοχής EU
Τυφλά έντερα υγιών ορνιθίων κρεοπαραγωγής*	172	5/168 (2.9%) 3/5 ESBL (60%) 2/5 AmpC (30%)	TEM, CTX-M IV CIT	0.8%-3.3%	CTX-M-14,SHV-12

\*4/172 (2.3%) στελέχη E. coli ευαίσθητα σε όλους τους εξεταζόμενους αντιμικροβιακούς παράγοντες (MIC)

# ESBL/ Ampc *E. coli*

	Glycylcyclines - Tigecycline	Cephalosporins - Cefotaxime	Cephalosporins - Cefotaxime	Carbapenems - Meropenem	Fluoroquinolones - Ciprofloxacin	Penicillins - Ampicillin	Tetracyclines - Tetracycline	Sulfonamides - Sulfamethoxazole	Polymyxins - Colistin	Trimethoprim	Quinolones - Nalidixic acid	Macrolides - Azithromycin	Aminoglycosides - Gentamicin	Amphenicols - Chloramphenicol	Φαινότυπος Αντοχής
	TGC	CAZ	FOT	MER	CIP	AMP	TET	SMX	COL	TMP	NAL	AZI	GEN	CHL	
cut-off value	1	0.5	0.25	0.125	0.064	8	8	64	2	2	16	16	2	16	
LOWER-UPPER	0.25-8	0.5-8	0.25-4	0.03-16	0.015-8	1-64	2-64	8-1024	1-16	0.25-32	4-128	2-64	0.5-32	8-128	
X 242	<=0.25	8	4	<=0.03	>8	>64	64	>1024	<=1	>32	16	8	>32	128	CAZ,FOT,AMP,SMX,TMP,GEN
X 267	<=0.25	1	>4	<=0.03	8	>64	64	>1024	<=1	>32	>128	8	>32	>128	CAZ,FOT,AMP,SMX,TMP,NAL,GEN,CHL
X 280	0.5	>8	>4	<=0.03	0.03	>64	>64	>1024	2	<=0.25	<=4	8	>32	128	CAZ,FOT,AMP,SMX,TMP,NAL
X 331	<=0.25	2	>4	<=0.03	2	>64	>64	>1024	<=1	>32	>128	16	1	>128	CAZ,FOT,AMP,SMX,TMX,NAL,CHL
I 15	<=0.25	1	>4	<=0.03	8	>64	<=2	>1024	<=1	>32	>128	4	>32	>128	CAZ,FOT,AMP,SMX,TMP,NAL,GEN,CHL

# ESBL/ Ampc *E. coli*

	Penicillins - Temocillin	Cephalosporins - Cefoxitin	Cephalosporins - Ceftazidim	Cephalosporins - Cefotaxime	Cephalosporins - Cefepime	Carbapenems - Meropenem	Carbapenems - Imipenem	Cephalosporins + $\beta$ lactamase inhibitors - Ceftazidime + Clavulanic acid	Cephalosporins + $\beta$ lactamase inhibitors - Cefotaxime + Clavulanic acid	Carbapenems - Ertapenem	Φαινότυπος Αντοχής	SYNERGY TEST	ESBL/AmpC	Genes detected
	TEM	FOX	CAZ	FOT	FEP	MERO	IMI	CAZ+CLA	FOT+CLA	ERT				
cut-off value			8	0.5	0.25	0.125	0.125	0.5	0.25	0.06				
LOWER-UPPER	0.5-64	0.5-64	0.25-128	0.25-64	0.06-32	0.03-16	0.12-16	0.125-128	0.06-64	0.015-2				
242	8	64	8	8	0.5	<=0.03	<=0.12	128	4	0.03	FOX,TAZ,FOT		0AmpC	TEM, CIT
267	8	8	1	32	4	<=0.04	<=0.13	128	<=0.06	<=0.015	TAZ,FOT,FEP		1ESBL	TEM,CTX
280	16>64		16	8	0.25	<=0.05	<=0.14	128	8	0.03	TAZ,FOT, FEP		0PRES ESBL/AmpC	CIT
331	4	4	2	16	2	<=0.06	<=0.15	128	<=0.06	<=0.015	TAZ,FOT, FEP		1ESBL	TEM
I 15	8	8	1	32	4	<=0.07	<=0.16	128	<=0.06	<=0.015	TAZ,FOT, FEP		1ESBL	TEM, CTX

# Αποτελέσματα

2015	Αριθμός στελεχών E. coli που απομονώθηκαν	Αριθμός στελεχών ESBL/ AmpC	Γονίδια αντοχής	Επιπολασμός ESBL E.coli – EU	Επιπολασμός γονιδίων αντοχής EU
Τυφλά έντερα υγιών χοίρων πάχυνσης <i>Απευθείας απομόνωση</i> <i>Εκλεκτική απομόνωση</i>	116 116	6/116 (5.2%) ESBL 38/116 (32.7%) ESBL	TEM TEM	1.6% 0.2%-40%	CTX-M-14, SHV-14,
Βόειο κρέας 2015	69	3/69 (4.3%) 1/3 ESBL (33.3%) 2/3 AmpC (66.6%)	TEM MOX,CIT FOX,CIT	0.001%	CMY-2
Χοίρειο κρέας 2015	156	9/156 (5.7%) 8/9 ESBL (88.8%) 1/9 AmpC	TEM MOX	0-3.8%	CTX-M-14, CTX-M-32, SHV-14



## **Ο επιπολασμός των γονιδίων E. coli που κωδικοποιούν την αντοχή στις ευρέως φάσματος β- λακταμάσες (ESBL ή/και AmpC) σε παραγωγικά ζώα & τρόφιμα**

- Μελέτη της δυναμικής μετάδοσης μεταξύ ζωικών ειδών - ανθρώπου

τα απομονώματα από παραγωγικά ζώα φέρουν τα ίδια γονίδια με απομονώματα από κρέας ίδιων ειδών;;;

τα απομονώματα από διαφορετικά είδη ζώων διαφέρουν ως προς τη γονιδιακή τους σύνθεση;;;

**Στελέχη που απομονώθηκαν από πτηνά & χοίρους διαφέρουν ως προς τα παραγόμενα ένζυμα, τη φυλογενετική ομάδα, λοιμογόνο δύναμη & ορότυπο.**

τα απομονώματα από παραγωγικά ζώα φέρουν τα ίδια γονίδια με απομονώματα από ανθρώπινα κρούσματα;;;

τα γονίδια που κωδικοποιούν αντοχή στις β-λακταμάσες είναι γονιδιακής ή πλασμιδιακής προέλευσης;;;

σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης γονιδίων με αυτά που δηλώνονται σε άλλα κ-μ ΕΕ

- Μελέτη της δυναμικής μετάδοσης σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές

# Συμπερασματικά...

- Σημαντικό ρόλο η «πίεση» που ασκούν οι αντιμικροβιακοί παράγοντες σε βακτήρια τόσο στους ζωικούς όσο κ στον ανθρώπινο πληθυσμό => επιλογή ανθεκτικών συμβιωτικών βακτηρίων
- Αυξανόμενη αντοχή σε βακτήρια εδάφους .....ως αποτέλεσμα αλόγιστης χρήσης αντιμικροβιακών στην κτηνιατρική??? Κατάλοιπα τέτοιων ουσιών στα οικοσυστήματα!!!!
- Έρευνα υποστηρίζει ESBL *E.coli* μπορεί να συνδέεται με μεταφορά αντοχής
  - Τρόφιμα ζωικής προέλευσης → άνθρωπο (Lavilla et al, 2008)
  - Πτηνά → άνθρωπο (Leverstein et al, 2011)



...όμως θα πρέπει να υπάρξει και εξέλιξη της έρευνας!!!

Ευχαριστώ