

ЕКСПЕРТНО СТАНОВИЩЕ

НА ТЕМА:

ЕВРОПЕЙСКА ПОЛИТИКА ЗА МОНИТОРИРАНЕ НА АНТИМИКРОБНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ ЖИВОТНИТЕ И НЕЙНОТО ЗНАЧЕНИЕ ЗА ОБЩЕСТВЕНОТО ЗДРАВЕ

Доц. д-р Валентина Урумова

Катедра “Ветеринарна микробиология, заразни и паразитни болести”

Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, 6000 Стара Загора

Резюме

Разпространението на бактериалната резистентност е описвана често, като едно от съвременните предизвикателства в медицината на човека и животните. Принципите отнасящи се до проучването, мониторинга и контрола на този процес са изложени от Европейската Комисия през ноември 2011г в т. нар. “Action plan against the rising threats from antimicrobial resistance”. В този план за действие са представени насоките в различни сектори, медицина, ветеринарна медицина, развъждане, агрономия, околна среда и търговия.

Сред 12-те ключови действия, които трябва да се предприемат своевременно, описани в плана за действие, е разработването на нови антимикробни средства, които успешно да заместят тези към които се наблюдава резистентност. Други важни предложения застъпени в плана са свързани с мерките за превенция на инфекциозните заболявания, мерките за разумна употреба на антимикробните средства във ветеринарната медицина и в медицината на човека. Едно от ключовите действия на плана се отнася до *мониторинга* касаещ употребата на химиотерапевтиците и разпространението на резистентността към тях, при човека и животните. В него се изтъква също необходимостта от *хармонизиране* на мониторинговите програми от гледна точка на полезността на оценката на риска и анализа на данните които се събират по време на проучванията.

В този аспект може би трябва да се подчертае, че ефективността и целенасочените действия по отношение на бактериалната резистентност трябва да се основават на познанието в настоящия момент и на тенденциите за развитие в бъдеще. Още повече, че данните които се събират по време на проучванията изискват не само квалифицирана

експертиза, но те са също така предпоставка за конкретни действия или иначе казано, те предпоставят необходимостта от изработването на национална стратегия в конкретни аспекти на резистентността.

Ключови думи: Антибактериална резистентност, зоонозни бактерии, индикаторни бактерии, механизми на предаване на антибактериалната резистентност;

Abstract

Not surprising emergence of antimicrobial resistance is often described as one of the greatest current global threats and challenges to man. Principles joint action on several levels are needed (study, monitoring and control) and there are exhibited by European Committee in “Action plan against rising threats from antimicrobial resistance” during 2011. The plan acknowledges a serious approach comprising actions in several different sectors such as medicine, veterinary medicine animal husbandry, agriculture, environment and trade.

Among the twelve needed key actions described in the plan is research and development of new antimicrobial to replace drugs that have become obsolete by emerging resistance. The plan goes further and proposes actions in several other fields. Among these are measures to prevent infectious diseases in man and animals and to promote and ascertain prudent use of antimicrobials in human and veterinary medicine. Surveillance of antimicrobial use and resistance in human as well as veterinary medicine are also among the key actions proposed. Also it is emphasized that harmonization of monitoring is very important because it is increases the usefulness for risk assessment and management of the data generated.

To be effective and relevant actions against resistance must be based on sound knowledge of the current situation and of trends over time. The data generated so far, and in the future, is needed of expert reports and guidance for necessity of elaboration a strategies with regard to antimicrobial resistance on a national level.

Key words: Antimicrobial resistance, zoonotic bacteria, indicator bacteria, mechanism of transmission;

Същност на проблема

Съществен фактор повлияващ развитието на бактериалната резистентност е селективния натиск който се осъществява при употребата на антимикуробните средства. WHO, FAO,

ОИЕ са единни в становището отнасящо се до антимикробната резистентност при зоонозните агенти, че тя може да се предава от животните на човека, и е следствие от употребата на химиотерапевтиците в животновъдството. От друга страна основен резервоар на зоонозните бактерии е гастроинтестиналният тракт на здравите стопански животни, птици, свине, говеда. Представители основно на двата рода *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, (нетифоидни) при имунодефицитни пациенти, причиняват инвазивни инфекции, бактеремии, менингити. Първи избор сред химиотерапевтиците за терапия на салмонелните инфекции са флуорираните хинолони и цефалоспорините от трета генерация, а за кампилобактерийните инфекции са макролидите или хинолоните. Наличието на резистентност при нетифоидните салмонелни серотипове и кампилобактериите рефлектира върху ефикасността на терапевтичния подход, повишава леталитета и носи съответните икономически загуби.

Освен салмонелите, кампилобактериите, резистентните към ванкомицин ентерококи, резистентните коли бактерии, резистентните към метицилин стафилококи, също могат да се предават от животните на човека, чрез директен контакт или чрез контаминираните храни. От друга страна коли бактериите например при човека причиняват есктраинтестинални инфекции, най-често уроинфекции, като при резистентните щамове терапията е съществено компроментирана. Нарастващото разпространение на такива щамове в различни географски региони е сериозно предизвикателство за медицината на човека.

Употреба на химиотерапевтиците във ветеринарната медицина

Химиотерапевтиците във ветеринарната медицина се прилагат за терапия и контрол на бактериални пневмонии, ентерити, мастити, перитонити, сепсиси, при продуктивните животни и домашните любимци. На популационно ниво химиотерапевтиците се прилагат най-често перорално, фактор който има съществено значение за възникването на резистентност сред зоонозните бактерии. Повечето от европейските страни предоставят данни за годишната употреба на химиотерапевтиците при животните, а някои страни като Франция, Холандия, Дания представят селектирани данни за отделни животински видове. В млечното говедовъдство индивидуалното третиране с химиотерапевтици се налага когато се касае за маститни инфекции, метрити, ставни инфекции, интердигитален дерматит. При телетата с пневмонии и ентерити се прилага терапия на популационно

равнище, в зависимост от броя на заболелите животни. При свинете, в групите на бозайниците и свинете за угодяване, с респираторни и чревни инфекции, химиотерапевтиците най-често се прилагат във водата за пиене и във фуражите. Индивидуалния подход за третиране се налага при мастит-метрит-агалаксия синдрома, и бактериалните артрити. В птицевъдството респираторните и чревните инфекции налагат терапевтичен подход на популационно ниво.

Принципни аспекти в мониторинга на бактериалната резистентност при животните

WHO определя хинолоните, в това число флуорираните хинолони, цефалоспорините (трета и четвърта генерация) и макролидите с особено значение за медицината на човека.

Хинолоновата резистентност и тази към цефалоспорините от трета и четвърта генерация, при салмонелите, хинолоновата резистентност и тази към макролидите при кампилобактериите са едни от най-важните аспекти на мониторинговите проучвания свързани с разпространението на бактериалната резистентност.

Резистентност към хинолони

Тя може да бъде представена в два аспекта, *хромозомно* детерминирана и *плазмидно* детерминирана.

Хромозомната резистентност към хинолоните нараства спонтанно под въздействието на антибиотичната преса, което води до възникването на точкови мутации, аминокиселинни замествания, в топоизомеразите II и IV, засягащи *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, което от своя страна води до намалена експресия на външно-мембранните порини или до промяна в липополизахаридния комплекс и свръхекспресия на ефлуксните помпи определящи мултилекарствената резистентност. Мутациите засягащи областта за свързване на флуорираните хинолони в *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, променят топоизомеразите в структурно отношение, поради което флуорираните хинолони не успяват да се свържат с ДНК.

Плазмидната резистентност се определя от *gnr* гените, които детерминират продукцията на протеини протектиращи ДНК –гиразата от инхибицията на ципрофлоксацин. Клиничната значимост на този механизъм на резистентност при салмонелите се основава на нарастващите стойности на MIC. Намалената чувствителност към хинолоните, обикновено е резултат от хромозомно определена резистентност, което се отразява във фенотипните изяви на щамовете, показващи резистентност към всички представители на този клас. Плазмидната резистентност може да се проявява фенотипно към

енрофлоксацин, но не и към класическия представител каквато е налидиксовата киселина. Още повече, че при плазмидно определената хинолонова резистентност може да се наблюдават комбинации с резистентност към цефалоспорините, тъй като генитичните детерминанти са разположени върху общ плазмид. Механизма на свръхекспресия на ефлуксните помпи определящ резистентност към хинолоните може да съществува комплексно при отделните бактериални щамове с ефлукс на *полимиксини* и *фениколи*.

В редица европейски страни през последните 10 години се отбелязва нарастване на резистентността към *ципрофлоксацин* при *S. Enteritidis* изолати от птиче месо, и от кокошки.

Хинолоновата резистентност при кампилобактериите обикновено се дължи на точкова мутация в *gyrA* и рядко е свързана с топоизомераза IV (*parC*). Съществуват данни и за механизма на ефлуксните помпи, който е комбиниран с резистентност и към други химиотерапевтици. *SteABC* ефлуксните помпи имат отношение не само към хинолоновата и макролидната резистентност, но и към някои фактори на патогенитета. По отношение на *C. coli* щамове от *свине*, в европейските страни се отчита около 10% резистентност към хинолоните, а при *птичите изолати* принадлежащи и към двата вида *C. jejuni*, *C. coli* резистентността към *налидиксовата киселина* и *ципрофлоксацин* е от 0% до 3%.

Резистентност към цефалоспорини

Основен механизъм на резистентността към цефалоспорините е продукцията на *бета-лактамазни ензими*, които хидролизират бета-лактамния пръстен и инактивират бета-лактамните химиотерапевтици. Гените детерминиращи продукцията на бета-лактамази са различни и могат да бъдат придобити от салмонелите чрез хоризонтален пренос от други бактериални видове. По отношение продукцията на бета-лактамазите с разширен спектър на действие (ESBL) при салмонелите, се разглеждат основно представителите на клас А, типовете TEM, SHV, CTX-M (класификация на Ambler, основана на молекулните различия). Тези ензими се инхибират от клавулановата киселина и могат да хидролизират оксимино-цефалоспорините, но не и цефамицините. AmpC бета-лактамазите от клас С също хидролизират оксимино-цефалоспорините и цефамицините, но проявяват *резистентност* към клавулановата киселина. Освен това OXA ензимите (клас D) и карбапенемазите също притежават резистентност към цефалоспорините. Също така извън

продукцията на бета-лактамази, резистентността към цефалоспорините може да бъде определена от ефлуксни помпи, нарушен пермеабилитет на клетъчната стена, основаващ се на понижената поринова регулация. Гените детерминиращи продукцията на бета-лактамазните ензими, най-често са разположени в плазмиди свързани с резистентност към *аминогликозиди, хлорамфеникол, флорфеникол, сулфонамиди, тетрациклини и триметроприм.*

През последните години някои ESBL характерни за човешките изолати са описани и при животински изолати. Най-често срещаните типове сред щамовете от животни, принадлежат към CTX-ензимите, следвани от *bla*_{TEM52} *bla*_{SHV-12}. От CTX-M-ензимите асоциирани с животинските щамове се съобщава за CTX-M-1,-2,-3,-8,-9,-14,-15,-1718,-20,-32,-55, от TEM-ензимите за TEM-20,- 52,-106,-126, и от SHV-ензимите за SHV-2,-5,-12. По отношение на AmpC ензимите, се дискутират *bla*_{CMY-2}, но се смята, че те имат по-широко разпространение в САЩ, в сравнение с европейските страни. Тази теза се отнася както за човешките щамове продуциращи AmpC ензими, така и за щамовете от животни. От групата на бета-лактамазните ензими с широк спектър на действие продуцирани от щамове изолирани от животни и от храни, в страните членки на Европейския съюз, се съобщава за TEM-1, SHV-1, OXA-1. Важно е да се спомене и за факта, че *bla*_{OXA-1} гените, са често асоциирани с плазмид носещ *bla*_{CTX-M-15} гените, което води до резистентност към повечето бета-лактами при ентеробактериите. За щамове *S. Typhimurium*, продуциращи OXA-1like ензими и причиняващи хранителни инфекции, се съобщава в Португалия, Испания, Великобритания. Обикновено резистентността на салмонелните изолати от животни и животинска продукция, към цефалоспорините от 3-та и 4-та генерация се определя в ниски стойности. През 2000г се съобщава във Франция и Белгия, за резистентен *S. Virchow* клон (CTX-M-2) от птици, птичи продукти и от хора. Подобни данни за резистентността към оксимино-цефалоспорините, се представят в Белгия и Франция, и за *S. Infantis* от птици, и от хора. В Европа, съществуват оскъдни данни относно *Salmonella spp.*, *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Edwardsiella ictaluri* продуциращите ESBL, изолирани от риби.

В европейските страни се представят данни отнасящи се до наличието и на специфични бактериални клонове сред коли бактериите и салмонелите, циркулиращи сред хората, които са свързани с продуктивните животни и храните произведени от тях. Така например

сред коли бактериите се споменава за *E. coli* O25:H4-ST131, *E. coli* O25a-ST-648, *E. coli* ST69, ST393. В различните европейски страни съществуват данни за разпространението на клоновете *E. coli* ST57, ST156, ST371, продуциращи ESBL, изолирани от пилета и пуйки.

Сред салмонелните сероварии *S. Agona* SGI-I, *S. Typhimurium* DT 104 с SGI-I продуцираща TEM-52, показват в най-висока степен полирезистентност, която обхваща, резистентността към *хлорамфеникол*, *флорфеникол*, *стрептомицин*, *спектиномицин*, *сулфонамиди*, *тетрациклин* и *триметроприм*.

Интегроните са мобилните генетични елементи, които изпълняват важна роля в придобиването и експресирането на резистентните гени. ESBL и AmpC гените произхождат от хромозомите на различни ентеробактерии. Мобилизирането на *bla* гените се осъществява от широко разпространените интегрази (клас I интегрази), транспозази (*ISEcpI*, *Is26*, *ISCR1*) и в по-слаба степен от свързаните с бактериофаги и повтарящите се елементи *ReA_v*. По нататъшното разпространение на ESBL и AmpC гените се осъществява чрез разнообразни механизми на латерален пренос, включващ инсерционни последователности, транспозони, интегрони от клас I, и плазмиди в които те са ситуирани. Проучванията върху тези механизми показват, че съществува *идентичност* между генетичните мобилни елементи при щамовете от хора и от животни. Плазмидите от групите IncF, IncI, IncN са убиквитерно разпространени сред коменсалната микрофлора на здравите животни и вероятно придобиват ESBL и AmpC гените, чрез съществуващия интензивен трансфер сред резидентната микрофлора. С висока честота на обмен се характеризират IncFII плазмидите носещи *bla*_{CTX-M-15} и IncI II носещи *bla*_{TEM-52}, сред *E. coli* щамовете от животни и хора.

Макролидна резистентност

Основният механизъм обуславящ резистентността към макролидите при кампилобактериите е модифицирането на рибозомите (23SrRNA). Мутациите в A2075G протеина, водят до високи нива на MIC \geq 128 μ g/mL към еритромицина, сред клинични изолати принадлежащи към видовете *C. jejuni*, *C. coli*. Мутационните изменения в протеините A2074C или A2074T също провокират високи MIC \geq 128 μ g/mL при клинични изолати *C. jejuni*. Мутации засягащи рибозомните протеини L2 и L22 също са свързани с резистентност към макролидите. Освен мутационните изменения макролидната

резистентност в комбинация с *хинолоновата резистентност* и тази към *бета-лактамните антибиотици* при кампилобактериите, може да се базира на *ефлуксните помпи SmeABC*. Erm- гените определят резистентността към макролидите, линкозамидите и В-стрептограмините (MLS_B). Данните касаещи резистентността към еритромицин, в европейските страни, показват по-високи нива при щамове *S. coli* от *птици и свине*. По отношение на *S. jejuni* изолатите от домашни любимци се съобщава за около 16% резистентност към еритромицин.

Резистентност на Staphylococcus aureus към метицилин (MRSA)

Стафилококите притежават няколко пеницилинсвързващи протеини, при *Staphylococcus aureus* те са 5, PCP1,2,3,3',4. Тези ензими участващи в синтезата на пептидогликана, биват транспептидази, ендопептидази, трансгликозилази и карбоскипептидази. Бета-лактамните антибиотици са инхибитори на съответните пеницилинсвързващи протеини, като по този начин подтискат синтезата на пептидогликана. Механизмът на резистентност към метицилина се основава на факта, че устойчивите стафилококи произвеждат допълнителен PCP2a. Той притежава нисък афинитет към метицилина и останалите бета-лактами. Кодиращият PCP2a ген, се обозначава като *mecA*-ген. Характерна черта на този тип резистентност е, че я не е експресирана във всички клетки на бактериалната популация, поради което се обозначава още като *хетерорезистентност*. При *Staphylococcus aureus* са установени и други механизми обуславящи резистентността към метицилин/оксацилин. При резистентните щамове с *гранична резистентност* е установено, че се касае за хиперпродуценти на нормалната стафилококова бета-лактамаза, поради което метицилинът и оксацилинът, макар, че са резистентни към хидролитичното действие на стафилококовата пеницилиназа, се разграждат от нея по-бавно, поради голямото и количество. Тези щамове са с резистентност към метицилин и оксацилин с гранични стойности: MIC от 2 до 4mg/l към метицилина и от 1 до 2mg/l към оксацилина. Такива щамове не притежават PCP2a и понижават няколко пъти MIC в присъствието на бета-лактамазните инхибитори. Хиперпродукцията на бета-лактамазата е плазмидно детерминиран процес. Още една възможност може да бъде описана във връзка с така нар. интермедиерни резистентни към метицилина щамове. Те показват слабо повишение на MIC 4mg/l към метицилина и 1-2mg/l към оксацилина. Те притежават нормални PCP, които имат понижен афинитет към бета-лактамите. Освен това продуцират

повишено количество РСР4. Метицилин-резистентните стафилококи, продуценти на РСР2а, са устойчиви клинично към всички бета-лактамни антибиотици, поради наличието на общ механизъм на резистентност. Такива щамове показват полирезистентност, включваща *флуорираните хинолони, аминогликозидите, макролидите, тетрациклините, хлорамфеникола*.

До 90-те години на миналия век, стафилококовите инфекции с участието на MRSA се възприемат единствено като нозокомиални инфекции. След този период се появяват данни в САЩ, Великобритания, Канада, Австралия, Нова Зеландия, Финландия, Ирландия, Франция, Германия, Швейцария, Холандия и Япония, които показват нарастващото значение на извънболничните инфекции, с участието на MRSA .

През 2004-2005г., в Холандия, се дискутира наличието на нов клон MRSA ST398, който се разпространява сред хората, но е изолиран и *от свине*. Първото съобщение за наличие на колонизация при хора с този клон, е свързано с холандско фермерско семейство. При едно проучване през 2005г. в Холандия, се отбелязва наличието на клон MRSA ST398 при 23% от изследваните фермери. А през 2008г. 5.6% от работещите в кланниците работници в Холандия, са били определени като носители (в носната лигавица) на MRSA ST398. През същата година EFSA формулира своето становище, че MRSA ST398 е широко разпространен сред продуктивните животни, в повечето страни членки на Европейския съюз притежаващи интензивно развиващо се животновъдство. През 2008г. в предварително изследване обхващащо 4.500 свинеферми, в Европейския съюз, се установява съществуването на 26.9% носители на MRSA, а в 92% от случаите се е касаело за ST398. Независимо от различното представителство на носителите в отделните европейски страни, се отбелязва значителното присъствие на MRSA ST398, като в Германия се съобщава за 37.4%, в Белгия за 35.9% и в Испания за 50.2%. Интерес представлява факта, че споменатите европейски страни са вносители на свине от Холандия. През 2007г- 2008г. в Холандия се коментира съществуването на MRSA ST398 в 67% от развъдните ферми и в 71% от фермите за угояване. През 2009г за наличието на този клон се съобщава в Швейцария, а през 2010г. в Швеция.

Нещо повече съществуват данни за разпространението на MRSA ST398 и в други сектори на продуктивното животновъдство- птицевъдство, млечно говедовъдство, телета за угояване. За първи път за съществуването на MRSA ST398 при бройлерните птици се

съобщава в Холандия и Белгия. През 2006г. в Белгия, се съобщава за 12.8% носителство на MRSA ST398 при бройлерните птици. В Холандия през 2010г., в изследване обхващащо 40 ферми за бройлери и 6 птицекланници, се съобщава за наличието на MRSA ST398 в 35% от птицефермите и в 6.9% от изследваните птици, и за 5.6% при кланничните работници.

В Швейцария, Германия и Белгия, се изнасят данни за MRSA ST398 при млечните крави. При едно изследване на млечни говеда в Юго-Западна Германия, се установява наличието на MRSA ST398 в млякото при 5-17% от изследваните крави и 100% в млечните проби от млечните танкове. В допълнение се съобщава за носителство в носната лигавица при 47% от изследваните крави, 57% от телетата и 78% от фермерите. През 2007г-2008г в Холандия, при едно изследване обхващащо 102 говедовъдни ферми за угодяване, 88% от фермите и 26% от изследваните телета са били положителни за MRSA ST398. Сред фермерите е било установено 33 % носителство, а в техните семейства 8%. Което дава основание да бъде направено заключение, че колонизирането на хора с MRSA е свързано в изключителна степен с директния им контакт с животните. MRSA ST398 също е бил установен и сред популацията на черния плъх, обитаваща района на изследваните говедовъдни ферми.

Холандия се определя като една от страните с най-нисък процент на MRSA инфекции при хора. Но през 2007г. MRSA инфекции, възникнали в следствие от директния контакт на хората с животни, се определят около 20%, а през 2009г. при 30% от пациентите се установява MRSA ST398. Хората колонизирани с MRSA ST398 могат да ги предават на други хора чрез различни механизми- директен контакт, приготвяне на храна, контакт с контаминирано месо, по аерогенен път за работещите във фермите и техните семейства. Работещите във свинеферми и кланници, могат да бъдат рисков фактор за разпространението на MRSA ST398 и не само на този клон, сред човешката популация.

От гледна точка на патогенитета на MRSA ST398 се смята, че той е по-слабо патогенен в сравнение с други MRSA. Това вероятно се дължи на факта, че този клон не притежава гени детерминиращи продукцията на някои токсични фактори, които обичайно присъстват при човешките MRSA. Учени от Медицинския факултет към Университета в Утрехт, смятат, че този факт може да се промени, в резултат на латералния генетичен трансфер.

Във връзка с факта, че MRSA колонизират носната лигавица, кожата, тъканите, ректум/клоака, може да се предположи, че те успяват успешно да се трансферират в месото, по време на кланничния процес. През 2009г. Холандската Агенция по Безопасност на Храните съобщава за наличие на 11.9% MRSA сред 2200 изследвани месни проби, от които 35.3% при пуешко месо, 10.6% при говеждо месо, 15.2% при телешко месо, 16.0% при пилешко месо и 10.7% при свинско месо. Повечето от щамовете са принадлежали към MRSA ST398. Рискът за заразяване с MRSA чрез контаминирано месо, се отнася преди всичко до хората с намалена имунна защита (AIDS- позитивни, онкологично болни, туберкулозно болни), в това число и до определени възрастови категории, малки деца, възрастни хора. От друга страна хранителните инфекции причинявани от MRSA са рядкост, обикновено се касае за щамове продуциращи ентеротоксини. По данни на EFSA този проблем търпи бързо развитие и храните приготвени от животинска продукция си остават потенциален източник на MRSA. Според холандските учени и официалните холандски власти, широката употреба на химиотерапевтици в свиневъдството, като *тетрациклините* например, повишават риска от разпространението на MRSA сред животинската популация. През 2010г. се изразява становището, че употребата на цефалоспорини в свиневъдството също може да рефлектира върху разпространението на MRSA, във връзка с което се инициира 2 годишна възбрана на цефалоспорините в сектора. Смята се, че интензивните големи свинеферми крият повече рискове за разпространението на MRSA, в сравнение с малките стопанства. Връзката между приложението на химиотерапевтиците и възникването и разпространението на MRSA сред телетата за угояване също се застъпва като основна теза.

Резистентни към ванкомицин Enterococcus spp.

Мониторингът на ентерококите по отношение на тяхната чувствителност към химиотерапевтици има няколко аспекта. На първо място те се определят като *индикаторни бактериални видове* за групата на *Грам- позитивните бактерии*. По подобие на коли бактериите са представители на *коменсалната чревна микофлора* при животните и човека. Сходни транспозони съдържащи резистентни гени са открити при свине и хора. Ентерококите могат да пренасят резистентни гени и към други бактериални видове. Така например е възможно пренасяне на ванкомицинова резистентност при *S. aureus*. На следващо място ентерококите са важни опортюнисти за човека, чиято резистентност

може да компроментира терапевтичния подход. Средно около 60% от ентерококовите инфекции са *нозокомиални инфекции*. Те се причиняват основно от вида *E. faecalis* (80-90%) и от *E. faecium* (5-10%). Ентерококите също така са природно резистентни към цефалоспорини, флуорирани хинолони, клиндамицин, триметроприм- сулфонамиди и към ниски дози аминоглюкозиди. *E. faecium* показва вариабилна чувствителност към бета-лактамите. От друга страна придобитата полирезистентност лимитира възможностите за терапия на тези опортюнистични инфекции.

Най-съществения момент в терапията на ентерококовите инфекции е тяхната резистентност към ванкомицин и quinupristin/dalfopristin (QD). Този факт е във връзка с обстоятелството, че стрептограмините се използват в терапията при ванкомицин-резистентните ентерококи. Ванкомициновата резистентност при ентерококите се определя от няколко гени. *vanA* е един от често срещаните гени на резистентността. Повечето от европейските страни съобщават за $\leq 10\%$ ванкомицинова резистентност при *E. faecium*. Гърция, Португалия и Ирландия съобщават за повече от 25% резистентност към ванкомицин при *E. faecium*.

При ентерококови изолати от птици и от свине, ванкомициновата резистентност се определя от *vanA* разположен върху Tn1546, която се открива и при човешките изолати (VRE). В европейските страни, VRE преобладават в птицевъдството и в свиневъдството преди забраната на авопарцин и останалите гликопептидни антибиотици използвани като фуражни адитиви. Така например в Дания през 1996г., една година след забраната на авопарцина, се коментира 43% резистентност към ванкомицин при *E. faecium*, изолати от птици и 21% при свине, докато през 2000г. тя спада до 6% и в двата сектора.

В Европа, за разлика от Северна Америка, VRE се определят като важен резервоар за извънболничните инфекции, от гледна точка на възможността за техния пренос от контаминирани храни при хората. Възможността храните да провокират инфекции при хората, остава все още неизяснена, тъй като твърде рядко, заболяване при човека може да се реализира с участието на животински ентерококови щамове. Тезата за екологичната връзка между VRE от свине, птици, и болели хора, все още се нуждае от сериозни проучвания. Така например данните за *E. faecium* изолатите събирани през последните години от хоспитализирани пациенти, и от извънболнични инфекции, от свине и птици, показват съществуването на клонални групи произхождащи от повече от един източник,

но в повечето случаи се касае за произход на клонални групи, произхождащи от един източник. Куриозно звучи и факта, че в настоящия момент след забраната на авопарцина в животновъдството, от редица учени се определя тезата, че авопарцина не може да компроментира терапията при *E.faecium* резистентните към ванкомицин щамове

През 1990г стрептограминовия препарат quinupristin /dalfopristin се въвежда в клиничната практика за терапия на мултирезистентни Грам-позитивни бактерии. В този спектър са включени и ванкомицин-резистентните *E.faecium* (*E. faecalis* е природно резистентен) и MRSA. След въвеждането на QD се наблюдава стрептограминова резистентност при *E.faecium*. В резултат на което възниква въпроса, възможно ли е съществуването на връзка между използвания в животновъдството вирджиниямицин, като фуражен адитив и възникването на стрептограминовата резистентност при ентерококовите изолати от хора. Употребата на вирджиниямицин селектира разпространението на *vat* (D) и *vat* (E) гените които са свързани с резистентността към dalfopristin. Тези гени не могат да провокират пълна резистентност към вирджиниямицин и QD, поради факта, че могат да атакуват стрептограмин А, но не и стрептограмин В. Но така или иначе стрептограмин В атакува същата рибозомна субединица, която се въздейства и от макролидите и линкозамидите, което е възможност за въздействие върху резистентността в съответните химиотерапевтични класове. Поради което е възможна тезата, че QD резистентността е възможно да е била селектирана от употребата на вирджиниямицин и макролиди в животновъдството. Преди въвеждането на QD, вирджиниямицина не е бил свързан с употребата на други химиотерапевтици в хуманната медицина. В Европейския съюз се възприема тезата за възможна селекция на QD резистентността и употребата на вирджиниямицина се забранява.

E.coli индикатори на бактериалната резистентност

Чрез контаминираните храни със *Salmonella spp.* (нетифоидни) и *Campylobacter spp.* може да се осъществява пренос на резистентни гени при хората. Фекалното контаминиране на месото по време на кланничния процес е един от механизмите за заразяване на хората, а също така и консумацията на контаминирани храни създава предпоставка при човека, за генетичен обмен между патогенната и коменсалната чревна микрофлора. Тъй като честота на преноса, с който се осъществява предаването на бактериите чрез контаминираните храни, остава цялостно неизяснена, редица изследователи смятат, че антимицробната

резистентност има значително по-голямо значение за коменсалната микрофлора в сравнение с резистентността при патогенните бактерии.

Фекалното контаминиране на храните основно се мониторира чрез присъствието на коли бактериите. Освен като *индикаторни бактерии* за контаминация на храни, коли бактериите се възприемат и като индикаторни бактерии за групата на *Грам-негативните бактерии* по отношение на *резистентността към химиотерапевтици*. Те се използват и в комплексни проучвания отнасящи се до резистентността при салмонелите, тъй като резистентните гени при салмонелите се откриват и при коли бактериите, благодарение на съществуващия интензивен обмен между видовете. Но така или иначе съществуват и различия касаещи експресирането и предаването на генетичните детерминанти. Като връзката между отделните коли серотипове и резистентността при коли изолатите от здрави животни обикновено се игнорира. Така например гените определящи резистентен фенотип ACSSuT при *S. Typhimurium* са хромозмно детерминирани, докато гените определящи същия фенотип при коли бактериите са типично разположени в плазмиди.

E.coli се използват като индикаторни бактерии за проучвания отнасящи се до *селективния натиск* върху Грам-негативните бактерии. Редица изследователи използват термина *огледален образ*, по отношение на резистентността при коли бактериите и селективния натиск който се оказва върху чревната микрофлора. Така, че проучванията върху резистентността при коли бактериите е изключително полезна от гледна точка на риска, свързан с употребата на антибиотици. Като индикаторни бактерии както при нетифоидните салмонели, така и при тях се отделя специално място на резистентността към *флуорираните хинолони и новите генерации цефалоспорини*. За разлика от ограничения брой на съобщенията свързани с плазмидно детерминираната резистентност към флуорираните хинолони при салмонелните щамове от животни, при коли бактериите има достатъчно данни за разпространението на плазмидната резистентност към флуорохинолоните. За оценяването на тази разлика, разбира се подпомага и факта, че сравнително бързо и икономично могат да се съберат репрезентативни данни за коли бактериите. Интегроните свързани с полирезистентността при коли бактериите от животни и от хора с урологични инфекции, притежават идентични генни касети, като конфигурациите на тези касети от различни региони на света, при секвенирането показват идентичност. В този ред на мисли, може да се предположи, че животинската популация е

основен резервоар на интегрони, отличаващи се с убиквитерно разпространение и възможности за пренос между видовете, принадлежащи към резидентната и патогенната микрофлора.

Препоръки на EFSA относно провеждането на мониторинговите проучвания и контрола на антибиотичната резистентност при животните

Водещо място сред препоръките на EFSA заема тезата за *унифициране на методите* отнасящи се до събирането на данни, представящи антибиотичната резистентност. Това от своя страна е изискване касаещо сензитивността, специфичността на използваните методи за *изолиране, идентифициране и определяне чувствителността* на бактериите към химиотерапевтите. От друга страна се обръща внимание на методологията изискваща генетичното определяне и субтипирание на подходящите бактериални видове и молекулярните секвенции на резистентните гени, представящи механизмите на резистентността. Сред препоръките е и идентифицирането и характеризирането на тези екологични характеристики, които се отнасят до генетичния трансфер между бактериите, като базова роля в тази насока се отделя на мониторинга при *индикаторните коли бактерии*. В частност това се отнася до разпространението на продуциращите ESBL *E.coli*. Приоритетите засягат и проучванията по отношение на антибактериалната резистентност при патогенните бактерии изолирани от животни и от хора. В тази насока, пример могат да бъдат проучванията свързани с изясняване връзката между нарастващото развитие на флуорохинолоновата резистентност при салмонелните изолати от хора и използването на флуорирани хинолони в животновъдството.

Определено място сред препоръките на EFSA отнасящи се до мониторирането на антибактериалната резистентност заемат проучванията включващи *биоцидите* и тяхното въздействие върху селектирането и разпространението на резистентността към химиотерапевтите и експресирането на вирулентните гени. Генотипирането на микроорганизмите показващи *полирезистентност*, включително и идентифицирането на потенциалните вирулентни маркери е препоръчителен подход, подпомагащ познанието за молекулярната основа на механизмите определящи резистентността при бактериите, и механизмите на разпространение на генетичните детерминанти сред зоонозните бактериални видове. Изясняване ролята на *бактериалния биофилм* в процеса на колонизиране и като източник за десиминирането на резистентни гени е възможност за

разширяване на информацията свързана с развитието на антибактериалната резистентност.

Полезността на проучванията свързани с изясняване ролята на животните и храните в процеса на разпространение на *специфичните бактериални клонове*, мобилните генетични елементи и някои вирулентни маркери, също е безспорна.

Препоръките на EFSA, ECDC, EMEA и SCENIHR са подробно детайлизирани относно контрола на основно мониторираните механизми на резистентност, като тези към флуорираните хинолони, към цефалоспорините от 3-та и 4-та генерация, към метицилина при стафилококите.

Препоръчва се на всички страни членки на Европейския съюз, относно употребата на химиотерапевтици в животновъдството, да се съблюдават международно възприетите Codex code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance CAC/RCP61-2005; OIE terrestrial code- chapter on antimicrobial resistance. Така например системната употреба или тази с превантивни цели на цефалоспорините от новите генерации, на флуорираните хинолони при животните се препоръчва да бъде строго лимитирана. Мониторинга както при индикаторните така и при патогенните бактерии също е препоръчителен, от гледна точка на аналитичните възможности (оценяването на риска) по отношение разпространението на хинолоновата и цефалоспориновата резистентност при животните. В страните членки, в които проблема вече е регистриран, по отношение на метицилиновата резистентност при *S. aureus*, се препоръчва провеждането на периодични мониторингови програми, отнасящи се до свинефермите отглеждащи родителските популации, но също така и до птицевъдните ферми и стопанствата отглеждащи телета за угояване. В европейските страни в които не е регистриран този механизъм на резистентност при стафилококите, се препоръчва мониторинга да се провежда на кланнично ниво (тампонни проби от назалната лигавица при свине и говеда). От друга страна, с оглед изясняване тенденциите за разпространение на този механизъм на резистентност, свързан с придобиването на зоонозни MRSA, се препоръчва мониторинг при животните и човека, във всички страни членки на Европейския съюз. Като обективна необходимост се определя хармонизирането на методите за събиране на данните включително и информацията относно рисковите фактори, анализа на репрезентативни данни касаещи полирезистентните изолати. Хармонизирането на методите за събиране на

данни, се отнася до получаването на проби от животни и от хора, диагностицирането на изолатите, и интерпретирането на резултатите относно възможностите за контаминиране на храни и присъствието на метицилин резистентните стафилококи в околната среда (прах, въздух). Оценяването на рисковите фактори, свързани с гостоприемниковата възприемчивост, присъствието в различни екологични ниши, механизмите на предаване, векторите на предаване, са важна част от анализа върху разпространението на метициленовата резистентност при стафилококите. В препоръките се коментира и необходимостта от *продължителни проучвания* свързани с разпространението на клон СС398 в животновъдството, с оглед правилното оценяване на контролните мерки които се предприемат за ограничаване на неговото разпространение. За да се обхванат всички възможни участващи елементи в разпространението на резистентността, се препоръчват проучвания при *домашните месоядни любимци и при конете*. На базата на съществуващите скринингови протоколи за нозокомиалните стафилококови инфекции, в някои от страните членки на Европейския съюз, се дискутира добавянето на изисквания, отнасящи се до заразяването на хората чрез контакта им с животните от големите интензивни стопанства. Относно оценяването на риска при разпространението на MRSA, в CVMP стратегията (EMEA/CVMP) за антибактериалните средства 2006г-2010г., по отношение на контрола, акцента е поставен върху употребата на антибактериалните средства на популационно равнище в интензивните животновъдни сектори, така и при конете и домашните месоядни любимци. Теоретични възможности относно контролирането на специфичния клон MRSA в животновъдството, се търсят и по отношение на производството на *ваксини за превенция*, като усилията са изцяло насочени в посока на лимитиране употребата на антибиотични средства за *деколонизиране на животните*. Специално внимание се отделя и на правилната употреба на антибактериалните средства в терапията на *раневите инфекции* при домашните месоядни любимци и при конете с участието на MRSA, в предвид тяхната полирезистентна природа. На следващо място във връзка с усилията за контролиране разпространението на антибактериалната резистентност се поставя акцент върху *контрола на храните*, от гледна точка на трансмисирането на резистентни гени сред човешката коменсална микрофлора. В предвид обстоятелството, че пилешкото месо, свинското и говеждо месо, се разглеждат като важни източници на резистентността към флуорираните хинолони и

цефалоспорините от новите генерации, за хората. За по-пълното анализиране на разпространението на антибактериалната резистентност чрез храните, се препоръчват като допълнителни нива в мониторинговите програми, изследването на рибите, рибните продукти и изследванията на водите. В предвид обстоятелството, че един от най-често срещаните механизми за разпространението на полирезистентните гени са плазмидите, присъстващи в различни екологични ниши, води, храни и околна среда.

Заклучение

Здравният риск от свръхупотребата на антибиотици в животновъдството има няколко аспекта, свързани с инфекциите причинявани от резистентни зоонозни бактерии чрез храните, възникването на нови полирезистентни бактериални клонове и разпространението на резистентните гени. Хоризонталния пренос на резистентни гени е *основната причина* за нарастващото разпространение на антибактериалната резистентност. Този процес се осъществява с участието на мобилни ДНК- сегменти, като транспозоните, плазмидите. Плазмидите притежават *разнообразен репертоар от резистентни гени*, определящи резистентност към различни химиотерапевтични класове. Разпространението на генетичните детерминанти определящи антибактериалната резистентност се осъществява *между различни бактериални видове*. Плазмидите носещи резистентни гени към един или повече антибиотик са открити при коли и салмонелни изолати от хора и от животни в различни региони на света. През 2009г. учени от School of Public Health, University of California, Berkeley, University of Pennsylvania, публикуват данни относно наличието на сходни мобилни генетични елементи при коли изолати от уротракта на хора с хеморагичен уремичен синдром и при нетифоидни салмонелни изолати от хора, с тези изолирани от животни. Което им дава основание да твърдят, че продуктивните животни са най-сериозния *источник на интегрони, носещи резистентни гени*. Тези мобилни генетични структури участват в разпространението на резистентността към антибактериалните средства, не само при коли и салмонелни щамове, но и сред други представители на ентеробактериите.

При човека резистентните гени, могат да се разпространяват при директен контакт с животните. Тази теза се отнася основно до работещите във *фермите и кланниците*. Проучвания в Холандия през 2001-2002г. показват, че фенотипните характеристики на

резистентните коли щамове от пуйки и от бройлерни птици са сходни с тези изолирани от фермерите и кланничните работници.

Друг механизъм за приемане на резистентни гени при човека, е консумирането на контаминирана храна със щамове притежаващи резистентни гени. Безпорни примери в тази насока са хранителните инфекции с участието на салмонели, кампилобактерии и коли бактерии. Контаминирането на месните храни се осъществява по време на кланничния процес. От контаминиранияте месни продукти, резистентните бактериални щамове могат да попаднат и в други хранителни продукти, приготвени при домашни условия или в заведенията за обществено хранене. През 2010г EFSA дискутира факта, че при колонизираните с кампилобактерии птици, вероятността от контаминация на пилешкото месо е 30 пъти по-висока в сравнение с неинфектираните бройлери.

Околната среда е фактор с помощта на който също може да се осъществява трансфер на резистентни щамове при хората. Резистентните бактерии попадат във водата, почвата и въздуха. В интензивните животновъдни сектори постелята е потенциален източник на антибиотици и на резистентни бактерии, които в последствие попадат в почвата и в подпочвените води. В САЩ гени определящи резистентност към тетрациклините са открити в подпочвените води, на 250 метра от хранилищата на оборски тор в свинефермите. Също така се установява факта, че интензивните животновъдни ферми са доминиращи източници на резистентни гени и за реките, което в допълнение подпомага хоризонталния им трансфер. В Холандия при 14 % от фермерите и техните семейства живеещи в пуйкофермите, в които е използван *авопарцин* като растежен фактор, е установена резистентност при ентерококовите изолати към ванкомицин.

Антибактериалната резистентност може да доведе до сериозни последици както за индивидуалното здраве на човека, така и за *икономическия ресурс* свързан с общественото здравеопазване. Могат да бъдат посочени конкретни примери, като неудачи свързани с първоначалния терапевтичен курс, ограничаване броя на подходящите за терапия антибактериални средства, по-тежка клинична изява, продължителна хоспитализация и повишаване леталитета при тежко протичащите инфекции, необходимост от използването на по-скъпи химиотерапевтици със някои странични действия. Особено значение, проблема с антибактериалната резистентност има по отношение на терапията при децата и имунокомпрометираните болни. По данни на Европейската Комисия, всяка година 25 000

пациенти умират от инфекциозни заболявания, причинени от резистентни микроорганизми, като загубите се оценяват на 1.5 билиона евро годишно. В САЩ около 2 милиона боледуват годишно от придобити бактериални инфекции в болничните заведения и от тях 90 000 умират. В 70% от случаите се касае за инфекции причинявани от резистентни бактерии поне към един химиотерапевтик, което означава, че 60 000 души умират в резултат на инфекции причинени от резистентни бактерии. От друга страна, учените коментират и факта, че инфекциите причинявани от резистентни бактерии при хората, най-често са свързани с консумацията на храни от животински произход. В някои случаи те протичат продължително и тежко, особено при хоспитализираните пациенти, какъвто е случая с бактеремиите.

В този аспект становището на Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) към European Medicines Agency (ЕМЕА) през 2009г. е, че информацията относно консумацията на антибактериални средства в животновъдството е *недостатъчна* за редица членки на Европейския съюз, макар, че се наблюдава известно подобрене в тази насока. През 2011г. ЕМЕА посочва, че най-важната задача, е събирането на данни отнасящи се до използването на антибактериалните средства при различните животински видове и различните технологични категории животни, като тази информация включва *използваните дози и продължителността на третирането* за всеки антибактериален препарат, но това все още е твърде далеч от настоящата ситуация.

В Европа широко се застъпва тезата за необходимостта от мониторинг върху употребата на антибиотици в животновъдството, даваща възможност за оценяване конкретно на всеки от прилаганите продукти, що се касае до типа, използваната доза, продължителност на терапията, животинския вид при който се прилага и аргументите за приложението. Това би могло да позволи да се направят обективни промени свързани с нивата на употреба на съответните антибактериални средства и съответно резистентността към тях при бактериите, т.е да се провежда *реалистична и ефективна стратегия* за редуциране употребата на антимикробните средства и съответно на резистентността към тях.

Възприети са два пътя за събиране на данни отнасящи се до употребата на антибактериални средства, продажбите в тонове на съответните активни субстанции в животновъдството и калкулиране броя на ефективните дози на антибиотиците, приемани от продуктивните животни. Данните за продажбите в тонове, на активните субстанции

има своите недостатъци, от гледна точка на това, че липсва информация за активните дози, при отделните животински видове. Така например по-широкия тонажен обем на продажбите при тетрациклиновите препарати не е еквивалентен на по-малкия обем при други антибиотици притежаващи по-висока активност. В тази връзка ЕМЕА дискутира факта, че типичната доза при животните за тетрациклините за целия терапевтичен период е 70 пъти по-висока (в mg/kg живо тегло) в сравнение с флуорираните хинолони, което означава, че данните даващи информация за продажбите в тонове на флуорираните хинолони биха могли да се отнасят до използването им при 70 пъти по-голям брой животни. От друга страна според UK's Veterinary Medicines Directorate няма как да се представят обективни данни относно употребата на антибактериалните средства от гледна точка на факта, че някои от тези които се използват за терапевтични цели се прилагат и с *превантивна цел*.

Някои от Европейските страни освен информация за продажбите съобщават и за средните използвани дози на антибактериалните средства. В Дания, DANMAP, и в Холандия събират данни за продажбите, но и за дневните дози/вид животно (ADD), метод който се използва от WHO по отношение на данните отнасящи се до употребата на антимикробни средства при хората.

Освен усилията в насока на намаляване употребата на антибактериалните средства, друга възможност за контрол на антибактериалната резистентност, са усилията свързани с *добрите производствени практики* в стопанствата. Свободното отглеждане на животинските популации и органичните системи могат да въздействат благоприятно върху благосъстоянието на животните при редуциране употреба на антимикробни средства в превантивен аспект. Последните проучвания във Великобритания, Норвегия и Швеция показват, че в органичните говедовъдни ферми, в които използването на антимикробни средства с превантивна цел по отношение на маститните заболявания е ограничено, се постигат сходни нива на контрол с тези ферми, в които традиционно се използват антимикробни средства за профилактика. Редуцирането на стресовите ситуации и смесването на различни групи животни, които повлияват имунния статус на животните, е мярка която би могла да подпомогне превенцията на инфекциозните заболявания в продуктивното животновъдство. По-късното отбиване на животните също би могло да подпомогне животинския организъм в имунологичен аспект и да редуцира стреса.

Спазването на зоохиgienите норми за населеност, ограничаване на транспортирането на животните, също са предпоставки за ограничаване възможностите за трансмисирание на патогенните бактерии и възникването на мутационни промени свързани с патогенитета на циркулиращите щамове. През 2004г EFSA's Scientific Panel on Animal Health and Welfare излиза със становище, че транспорта и продължителността на транспортирането при животните трябва да бъдат по възможност редуцирани. Развъдните практики в продуктивното животновъдство са съществена част от добрите фермерски практики, в разрез с практиките свързани с отглеждането на животните под метаболитен и физиологичен стрес. Реформирането на интензивните животновъдни сектори в Европейския съюз, е възможно най- добрия подход с оглед ограничаване употребата на антибактериални средства за профилактика на инфекциозните заболявания. Кое от своя страна е най-добрата превенция за разпространение на резистентността към антибактериалните средства.

Литература:

1. Тягуненко, Ю., П. Сотирова. 1997г. Клинична бактериология. Актуални проблеми. Издателство "Знание" ЕООД, 88-114.
2. Bengtsson, B., C. Greco, O. Nilsson and A. Landén. 2011. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden. www.sva.se, ISSN 1650-6332.
3. DANMAP. 2009. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. <http://www.danmap.org/pdf/Files/Danmap2009pdf>.
4. ECDC, EFSA, EMEA, SCENIHER. 2009. Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infection. *The EFSA Journal*; 7(11):1372.
5. EFSA, Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2011. Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *The EFSA Journal*: 9(8):2322.
6. EFSA, ECDC. 2013. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal/doc.2154>, pdf.

7. EFSA, Panel on Biological Hazards. 2009. Scientific opinion. Assessment on the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *The EFSA Journal* **993**, 1-73.
8. EFSA. 2010. Scientific Report. Analysis of baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs in EU, 2008. Part B factors associated with MRSA contamination on holdings. *The EFSA Journal*; **8(6)**:1597.
9. Phillips, I., M. Casawell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston and J. Waddell. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. of Antimicrobial Chemotherapy*, **53**, 28-52.
10. UK's Veterinary Medicines Directorate. 2011. Antibiotics in animal farming. Public health and animal welfare.