

**REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE I GENOTIPSKE
KARAKTERISTIKE *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES
ENTERICA SEROVAR MBANDAKA IZOLOVANIH OD ŽIVINE***
*RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AND GENOTYPE CHARACTERISTICS
OF *Salmonella enterica* SUBSPECIES enterica serovar Mbandaka
ISOLATED FROM POULTRY*

D. Vidanović, Z. Sabo, Nataša Kilibarda, Mira Živadinović, A. Žarković,
K. Matović**

Salmonele su jedan od vodećih patogenih mikroorganizama koji se sa životinja mogu preneti i na ljude, a njihovi rezervoari su živina, goveda i svinje. Na ljude se prenose putem kontaminirane hrane životinjskog porekla. Posebnu opasnost predstavljaju multiplo rezistentni sojevi salmonela, koji mogu preneti gene rezistencije i na druge mikroorganizme. Kontrola salmoneloze primarno zavisi od dobrog sistema nadzora i poznavanja prisustva serovarijeteta sojeva na epizootiološkom području. Na pojedinim geografskim regionima obično samo nekoliko serovarijeteta salmonela ima epidemiološki i epizootiološki značaj. Zbog dominacije nekih serovarijeteta i fagotipova, kada je potrebno dodatno razdvajanje unutar serovara i fagotipa, koristi se DNK genotipizacija. U slučaju kada je potrebno da se uporede izolati koji su prouzrokovali trovanja ljudi sa izolatima iz hrane ili od životinja, koristi se metoda visoke mogućnosti razdvajanja, kao što je elektroforeza u pulsirajućem polju (pulsed field gel electrophoresis – PFGE). Zahvaljujući visokom stepenu pouzdanosti donose odluke u sprovođenju epizootioloških i epidemioloških programa rada. Cilj ovog rada je bio da se ispita rezistencija na antibiotike i utvrde genotipske karakteristike Salmonella en-

* Rad saopšten na simpozijumu "Bezbednost namirnica animalnog porekla", Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 16 i 17. oktobar 2008. godine

** Mr sci. med. vet. Dejan Vidanović, Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Kraljevo; Z. Sabo, dr vet. - spec, dr sci. med. vet. Nataša Kilibarda, Veterinarski specijalistički institut "Subotica", Subotica; Mira Živadinović, dr vet. - spec., Veterinarski specijalistički institut "Sombor" Sombor; mr sci. med. vet. Aleksandar Žarković, mr sci. med. vet. Kazimir Matović, Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Kraljevo

terica subsp. enterica serovar Mbandaka izolovanih od živine sa nekoliko lokaliteta u Republici Srbiji.

Ključne reči: Salmonella Mbandaka, rezistencija, antibiotici, PFGE profil

Uvod / Introduction

U većini zemalja u svetu salmonela je zoonotski patogeni mikroorganizam, čiji su primarni rezervoari živina, goveda i svinje. Salmonele se prenose na ljude kontaminiranom hranom životinjskog porekla. Međunarodna trgovina životinjama i hranom čini da su salmonele široko rasprostranjene i da se trovanja hranom čiji su uzrok salmonele pojavljuju redovno. Pod dejstvom selektivnog pritiska nametnutog velikom upotrebom antibiotika u odgoju životinja salmonele razvijaju ili stiču veliki broj gena, kompleksa gena ili mutacija koje izazivaju rezistenciju na antibiotike. Posebnu opasnost predstavljaju multirezistentni sojevi salmonela koji mogu preneti gene rezistencije na antibiotike i na druge vrste mikroorganizama.

Na pojedinim geografskim regionima obično samo nekoliko serovarijeta salmonela ima epidemiološki i epizootološki značaj. Dominantni serovarijete se menjaju tokom vremena i razlikuju u zavisnosti od zemlje i regije. Zbog toga je izuzetno važna identifikacija i karakterizacija dominantnih serovara salmonela kod životinja i ljudi, posebno onih koji nose gene rezistencije na određene antibiotike. Analizom salmonela izolovanih od ljudi i životinja može se utvrditi postojanje i širenje istih ili sličnih dominantnih klonova salmonela nosioca gena rezistencije. Međunarodno priznate metode za tipizaciju salmonela su serotipizacija i fagotipizacija, kao i ispitivanje rezistencije na antibiotike. U slučajevima kada je potrebno da se izvrši dodatna diskriminacija unutar serovarijeta i fagotipova kod izolata koji su izazvali trovanje kod pacijenata, koristi se metoda gelelektroforeze sa visokom moći razdvajanja u pulsirajućem polju (Pulse-Field Gel Electrophoresis – PFGE). U suštini PFGE se zasniva na razdvajanju fragmenata DNK nakon digestije restriktivnim enzimima. Pošto je bakterijska DNK kružni molekul nakon digestije restriktivnim enzimima se dobija 10–20 fragmenata linearne DNK različitih dužina. Ovi fragmenti su suviše veliki da bi se mogli razdvojiti klasičnom elektroforezom u agarozu pa se primenjuje tehnika pulsirajućeg električnog polja. U električnom polju koje menja pravac i dužinu trajanja, manji fragmenti se brže kreću kroz agarozu od većih. Tako, ako je nakon digestije i elektroforeze PFGE profil dve ili više bakterija identičan, one pripadaju istom klonu i obratno, ako se nakon digestije i elektroforeze PFGE profil dve ili više bakterija razlikuje, one ne pripadaju istom klonu. Pri tome se mora uzeti u obzir i to da neki serovarijete salmonela imaju ograničenu klonalnu raznolikost.

U Republici Srbiji najčešće izolovani serovarijete kod ljudi su *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi B*, *S. Infantis* i *S. Senftenberg*. Poslednjih

godina servarijetet *Salmonella* Mbandaka se nalazi među 15 najčešće izolovanih serotipova salmonela kod ljudi, a vrlo često se izoluje i kod životinja, pre svega živine. Budući da u našoj zemlji do sada nisu vršena obimnija ispitivanja ovog serovarijeteta, cilj ovog rada je bio da se ispita rezistencija na antibiotike i utvrde genotipske karakteristike i pripadnost serovarijeteta *Salmonella* Mbandaka izolovanih iz živine na teritoriji Republike Srbije.

Materijal i metode / *Materials and methods*

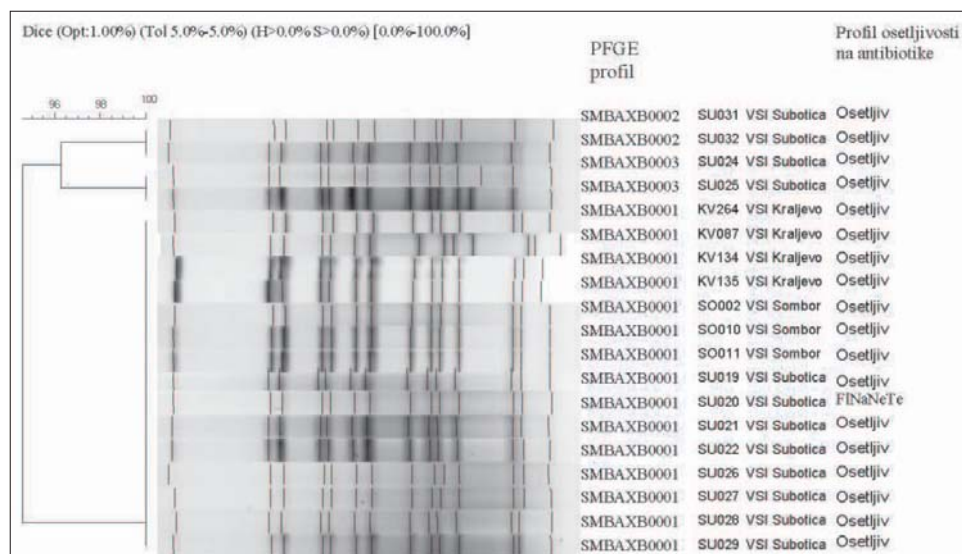
U ispitivanju je korišćeno 19 izolata *Salmonella* Mbandaka od kojih je 12 izolovano u laboratoriji VSI "Subotica", 4 u laboratoriji VSI "Kraljevo" i 3 u laboratoriji VSI "Sombor". Svi izolati su poticali od živine. Njihova biohemijska identifikacija je vršena primenom klasičnih i komercijalnih testova, a serološka tipizacija prema Kauffman i White šemi.

Za ispitivanje osetljivosti na antibiotike korišćena je disk difuziona metoda prema preporukama NCCLS, upotrebom komercijalnih diskova i Mueller-Hinton agara (Bio-rad, USA). Ispitivani izolati su prvo presejani na triptikaza soja agar (TSA) i inkubirani 24 h na temperturi od 37°C. Od izraslih kolonija pripremane su suspenzije salmonela u fiziološkom rastvoru koje su odgovarale gustini 0,5 McFarland standarda. Suspenzije salmonela su sterilnim brisevima nanošene na podloge Mueller-Hinton agara u petrijevim pločama, a zatim su na njih stavljani diskovi antibiotika. Nakon 18 sati inkubacije očitavane su zone inhibicije rasta, a rezultati interpretirani po preporukama NCCLS ili CLSI iz 2006: osetljiv, intermedijarno osetljiv i rezistentan. U ispitivanjima osetljivosti izolovanih serovarijeteta salmonela korišćeni su: amoksiciklin+klavulonska kiselina (10+20 µg), ampicilin (10 µg), ceftiofur (30 µg), hloramfenikol (30 µg), ciprofloksacin (5 µg), kolistin (50 µg), enrofloksacin (5 µg), flumekvin (30 µg), gentamicin (10 µg), kanamicin (30 µg), nalidiksinska kiselina (30 µg), neomicin (30 UI), streptomycin (10 µg), sulfametoksazol (1,25+23,75 µg), tetraciklin (30 µg) i trimetoprim (5 µg). Za ispitivanje genotipske pripadnosti izolati salmonela su presejavani na TSA i inkubirani 14-18 sati na temperaturi 37°C. Nakon inkubacije, kolonije salmonela su prenošene u sterilne epruvete sa puferom za suspenziju ćelija do gustine od 1,3 do 1,4 koja je određivanja primenom filtera od 610 nm talasne dužine na spektrofotometru. Od tako pripremljenih suspenzija po 200 µL je unošeno u sterilne Eppendorf epruvete, a zatim je dodavano po 10 µL (20 mg/ml) proteinaze K (Invitrogen, USA). Ova suspenzija je zatim mešana sa 200 µL otopljene i na temperaturi od 50°C ohlađene Megabase agaroze (Bio-Rad) i prenošena u kalupe za razlivanje i pripremu plagova. Nakon hlađenja stvrdnuti plagovi su istiskivani iz kalupa u epruvete sa puferom za liziranje ćelija. Liziranje sa proteinazom K je obavljano u vodenom kupatilu sa šejkerom na temperaturi od 54°C u trajanju od 16 sati. Nakon liziranja, plagovi su ispirani u dejonizovanoj vodi dva puta i u Tris-EDTA puferu 4 puta na temperaturi od 50°C. Plagovi su nakon liziranja podvrgnuti di-

gestiji restriktivnim enzimom *X*Bal na temperaturi od 37°C u termostatu uz dodatak H pufera u trajanju od 16 sati. Nakon digestije restriktivnim enzimom plagovi su podvrgavani elektroforezi u 1% Megabase agarozu. Elektroforeza je vršena na CHEF DRIII sistemu (Bio-Rad), a njeni parametri su bili početno vreme 2,2 sekunde, završno vreme 63,8 sekunde pri naponu struje od 200 volti. Dužina trajanja elektroforeze je iznosila 18 sati, a temperatura pufera 14°C. Vizuelizacija fragmenata DNK je vršena bojenjem etidijum bromidom (Bio-Rad), a zatim izlaganjem UV zracima. Snimanje je vršeno GelDoc sistemom, primarna analiza gela je vršena GelDoc softverom, a analiza fragmenata FPQuest softverom (Bio-Rad).

Rezultati ispitivanja / Results

Od ukupno 19 izolata *Salmonella* koji su bili obuhvaćeni ispitivanjem, 18 je bilo osetljivo na sve antibiotike. Kod jednog izolata označenog SU020 utvrđena je multipla rezistencija na flumekvin, nalidiksinsku kiselinu, neomicin i tetraciklin (FINaNeTe profil). Analizom podataka pomoću FPQest softvera dobijeni su PFGE profili koji su svrstani u tri grupe. Profilima su dodeljeni kodovi koji su se sastojali od prvog slova vrste bakterije, tri slova serovara, dva slova



Slika 1. Dendrogram iz FPQest softvera koji pokazuje koeficijent sličnosti (Dice koeficijent, UPGMA) između ispitivanih izolata *S. Mbandaka*, (Levo). Profili osetljivosti na antibiotike ispitivanih izolata (Desno). Antibiotici: Fl - flumekvin; Na - nalidiksinska kiselina; Ne - neomicin; Te - tetraciklin

Figure 1. Dendrogram from FPQest software showing similarity coefficient (Dice coefficient, UPGMA) between examined isolates of *S.Mbandaka*, (left). Profile of sensitivity to antibiotics of examined isolates (right). Antibiotics: Fl - flumequine; Na - nalidixic acid; Ne - neomycin; Te - tetracycline

korišćenog restriktivnog enzima i četvorocifrenog broja počev od 0001. Profil S. Mbandaka pod oznakom SMBAXB0001 je utvrđen kod 15 izolata, dok su profili pod oznakama SMBAXB0002 i SMBAXB0003 ustanovljeni u po 2 izolata. Iz dendograma, za čiju izradu je korišćen Dice koeficijent, može se videti da je koeficijent sličnosti između različitih PFGE profila veći od 96%. Dendogrami, koeficijenti sličnosti, PFGE i antimikrobni profili su prikazani na slici 1.

Diskusija / Discussion

Cilj epidemiološkog ispitivanja je da se prati širenje mikroorganizama i da se utvrdi da li su prikupljeni izolati iz različitih izvora u istom regionu epidemiološki povezani i da li pripadaju istom klonu (Tenover i sar., 1995). Tačna karakterizacija sojeva je odlučujuća u kontroli infekcija salmonelama, ali valjanost metoda za tipizaciju može značajno da varira. Prva ispitivanja *S. Mbandaka* koja su izvršili Hoszowski i sar., (1999) pokazala su da su biotipiziranje, rezistencija na antibiotike i analiza plazmida nedovoljni za karakterizaciju ovog serovara poreklom od životinja i hrane za životinje. U kasnijim ispitivanjima (2001) isti autori su utvrdili pojavu rezistencije na antibiotike kod 23 od 62 izolata. Ustanovili su i 7 profila rezistencije na antibiotike od čega su dva profila pripadala multirezistentnim izolatima, a od 59 izolata genotipizacijom sa XBal restriktivnim enzimom su utvrdili 15 PFGE profila. Autori su zaključili da PFGE predstavlja metodu izbora u subtipiziranju ovog serovara. Mogućnost tipizacije se povećava kombinovanjem više metoda. Takođe, autori smatraju da je *S. Mbandaka* preko hrane za životinje dospela do populacije živine, a odatle namirnicama animalnog porekla do ljudi. Liebana i sar., (2001) navode da su kod 15 izolata *S. Mbandaka* elektroforetskom analizom (PFGE) ustanovili 13 profila. Ispitivani izolati su ispoljili rezistenciju na antibiotike u 10 slučajeva. Kod pet izolata je ustanovljena multipla rezistencija na 4 i više antibiotika.

Od 19 izolata *S. Mbandaka* utvđenih na teritoriji Republike Srbije, kod 18 je ustanovljena osetljivost na 16 antibiotika koji su ispitivani. Kod jednog izolata je utvrđena multipla rezistencija na četiri antibiotika. Rezistencija na flumekvin, nalidiksinsku kiselinu, neomicin i tetraciklin nije neočekivana jer se navedeni antibiotici najčešće koriste u živinarskoj proizvodnji. Rezultati genotipske karakterizacije *S. Mbandaka* koje su izolovane na teritoriji Republike Srbije pokazuju da postoji najmanje 3 različita PFGE profila. Od 19 izolata *S. Mbandaka* koji su pitali sa područja sva tri veterinarska specijalistička instituta kod 15 je utvrđen profil SMBAXB001. Profili SMBAXB0002 i SMBAXB0003 su utvrđeni kod po dva izolata koji su pitali sa područja VSI Subotica. Ako se rezistencija na antibiotike iskoristi za dodatno razdvajanje unutar PFGE profila, onda bi se iz grupe od 15 izolata sa profilom pod oznakom SMBAXB0001 mogao da izdvoji profil sa oznakom SU020. Kod ovog izolata je otkrivena multipla rezistencija na 4 antibiotika za razliku od ostalih 14 izolata kod kojih nije otkrivena rezistencija na ispitivane antibiotike. Pošto je koeficijent sličnosti između PFGE profila veći od 96%, može se

zaključiti da su ispitivani izolati međusobno srodni i da verovatno predstavljaju podtipove jednog istog soja. Izolacija identičnih PFGE profila u laboratorijama koje se nalaze na različitim lokacijama je očekivana zbog relativne geografske blizine epizootičkih područja i razvijene trgovine hranom za životinje, živinom i živinskim proizvodima. Stepenn genotipske raznolikosti ne mora biti konstantan i može se menjati u vremenu i prostoru.

Zaključak / Conclusion

Od molekularnih metoda koje se koriste u epidemiološkim ispitivanjima PFGE predstavlja jednu od najpouzdanijih metoda za subtipizaciju mnogih mikroorganizama. Visoka moć razdvajanja PFGE se može povećati upotrebom više restriktivnih enzima, kao i u kombinaciji sa drugim metodama za subtipizaciju.

Rezultati dobijeni u ovom ispitivanju poslužili su kao osnov za izradu baze podataka o prevalenciji pojedinih klonova serovara *Salmonella* u Republici Srbiji. Dobijena baza podataka treba da posluži za poređenje učestalosti horizontalnog transfera i konverzije gena, preuređenja genoma i modularne organizacije hromozoma kroz vreme.

Literatura / References

1. Bolton DJ, Meally D, McDowell, Blair IS. A survey for serotyping, antibiotic resistance profiling and PFGE characterization of and the potential multiplication of restaurant *Salmonella* isolates, *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.
2. Carattoli A, Filetici E, Villa L, Dionisi AM, Ricci A, Luzzi I. Antibiotic Resistance Genes and *Salmonella* Genomic Island 1 in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated in Italy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, September 2002; 46(9) 2821-8.
3. Doran Geraldine, Dearbhaile Morris, Colette O'Hare, Niall DeLappe, Bernard Bradshaw, Geraldine Corbett-Feeney, and Martin Cormican. Cost-Effective Application of Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Typing of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Applied and environmental microbiology* 2005; 8236-40.
4. Hoszowski A, Wasyl D, Truszczynski M. 1999. Epidemiological investigation of *Salmonella* serovar Mbandaka strains isolated from animals, their feed and food products in Poland during the years 1995-1997. *Polish J Vet Sci*; 2, 43-8.
5. Hoszowski A, Dariusz W. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka isolates, 21 May 2001; 139-48.
6. Li X, Payne JB, Santos FB, Levine JF, Anderson KE, Sheldon BW. *Salmonella* Populations and Prevalence in Layer Feces from Commercial High-Rise Houses and Characterization of the *Salmonella* Isolates by Serotyping, Antibiotic Resistance Analysis, and Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Poultry Science* 2007; 86: 591-7.
7. Liebana E, Guns D, Lourdes GM, Woodward MJ, Felicity A, Clifton-Hadley FA, Davies RH. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: Assessment of methodology. *Journal of Clinical Microbiology* Oct 2001; 3609-16.

Vet. glasnik 62 (5-6) 351 - 358 (2008) D. Vidanović i sar.: Rezistencija na antibiotike i genotipske karakteristike *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Mbandaka ...

8. Tenover CF, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced, by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing, *Journal of Clinical Microbiology*, Sept 1995; 2233-9.
9. Wonderling L, Pearce R, Wallace FM, Call JE, Feder I, Tamplin M, Luchansky JB. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis To Characterize the Heterogeneity and Clonality of *Salmonella* Isolates Obtained from the Carcasses and Feces of Swine at Slaughter, *Appl Environ Microbiol.* 2003 July; 69(7): 4177-82.

ENGLISH

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AND GENOTYPE CHARACTERISTICS OF *Salmonella enterica* SUBSPECIES *enterica* serovar Mbandaka ISOLATED FROM POULTRY

D. Vidanović, Z. Sabo, Nataša Kilibarda, Mira Živadinović, A. Žarković, K. Matović

Salmonellas are one of the main zoonotic pathogens whose reservoirs are poultry, cattle and pigs. By means of the food chain salmonellas can be transferred to humans through contaminated food of animal origin. Multiresistant strains *Salmonella* are particularly dangerous since they can transfer genes of resistance to antibiotics to other microorganisms. Control of salmonellas primarily depends on a good surveillance system and knowledge of the strain types present in the epizootiologic area. In some geographical regions only a few *Salmonella* serotypes are usually of epidemiological importance. Due to the predomination of some serotypes and fagotypes, when an additional discrimination within serotypes and fagotypes is needed, DNA genotyping is used. In cases when it is necessary to compare the strains which caused the poisoning of patients, with strains isolated from food or animals, a highly discriminatory method is used – pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Due to a high degree of discrimination the results of PFGE testing enable decision making with a higher degree of certainty in epizootiologic and epidemiologic research work.

The aim of this testing was to determine the antibiotics resistance and genotype characteristics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka isolated from poultry from some areas of the territory of Serbia.

Key words: *Salmonella* Mbandaka, serovar, antibiotics resistance, PFGE profile

**СОПРОТИВЛЕНИЕ НА АНТИБИОТИКИ И ГЕНОТИПОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
SALMONELLA ENTERICA SUBSPECIES *ENTERICA* SEROVAR MBANDAKA,
ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ДОМАШНИХ ПТИЦ**

**Д. Виданович, З. Сабо, Наташа Килибарда, Мира Живадинович, А. Жаркович,
К. Матович**

Сальмонеллы один из ведущих патогенных микроорганизмов, которые с животных могут передаваться и на людей, а их резервуары домашние птицы, крупный рогатый скот и свиньи. На людей передаются путём контаминированного корма животного происхождения. Отдельную опасность представляют собой мультирезистентные штаммы сальмонелл, которые могут перенести гены сопротивления и на другие микроорганизмы. Контроль сальмонеллёзов первично зависит от хорошей системы надзора и познания присутствия серовариететов штаммов на эпизоотологическом районе. На некоторых географических регионах обычно только несколько серовариететов сальмонелл имеет эпидемиологическое и эпизоотологическое значение. Из-за доминанции некоторых серовариететов и фаготипов, когда нужно дополнительное раздвоение внутри серовара и фаготипа, используется ДНК генотипизация. В случае, когда нужно сравнить изоляты, которые причинили отравления людей с изолятами из корма или от животных, используется метод высокой возможности раздвоения, как электрофорез в пульсирующем поле (*pulsed field gel electrophoresis – PFGE*). Благодаря высокой степени раздвоения, результаты *PFGE* дают возможность, что с высокой степенью надёжности приносят решения в проведении эпизоотологических и эпидемиологических программ работы. Цель этой работы была испытать сопротивление на антибиотики и утвердить генотиповые характеристики. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka, изолированных от домашних птиц с несколько мест в Республике Сербии.

Ключевые слова: *Salmonella Mbandaka*, сопротивление, антибиотики, *PFGE* профиль