

УДК: 637.5.065:579.842.14(497.7)

АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА ИЗОЛАТИ НА *SALMONELLA SPP.* ОД РАЗЛИЧНИ ВИДОВИ СУРОВО МЕСО И МОМ ОД УВОЗ ВО Р. МАКЕДОНИЈА

Јанкулоски Деан¹, Раткова Марија¹, Костова Сандра¹, Ангеловски Љупчо¹,
Ераковиќ Токалиќ Ирена², Секуловски Павле¹

¹Катедра за безбедност на храна, Факултет за ветеринарна медицина во Скопје

²Раководител за квалитет и безбедност на храна,

CJ компани, Франшизер за McDonalds

e-mail: djankuloski@fvm.ukim.edu.mk

АБСТРАКТ

Испитувањето е спроведено со цел да се детерминира антимикробната резистентност на поедините соеви на *Salmonella spp.* изолирани од различни видови сурово месо (свинско, мисиркино, пилешко и мелено обескоскено месо). Беа испитани 822 примероци на различни видови месо, од кои се изолирани и серотипизирани 72 соеви на *Salmonella*, по што истите беа тествани за антимикробна резистентност на 8 антимикробни супстанции. Утврдено е дека 50 од нив (69,4%) се резистентни барем на една антимикробна супстанца, 10 соеви (13,9%) се резистентни на две антимикробни супстанции, а останатите 16,7% се мултирезистентни соеви (резистентни на повеќе од 2 супстанции).

ВОВЕД

Антимикробната резистентност на патогените бактерии во храната кои можат да потекнуваат од животни или луѓе претставува значајно прашање за заштита на здравјето на населението. Утврдено е дека употребата на антимикробните супстанции во профилактички цели или како промотори на раст кај домашните животни, претставува потенцијал за зголемување на дисеминацијата на антимикробно-резистентни бактерии (9).

Еден од најзначајните патогени кои предизвикуваат болести чиј извор е храната претставува *Salmonella spp.* *Salmonella spp.* е причинител на алиментарни инфекции низ целиот свет, поради што е актуелен предмет на истражувања и постојано следење во контаминираната храна како нејзин вектор. За сериозноста на заболувањето укажува и фактот

дека преваленцата на нетифоиден облик на салмонелоза е проценета со 1,3 милијарди случаи годишно и со 3 милиони смртни случаи годишно (2).

Појавата на мултирезистентни соеви (MDR) на *Salmonella* е во подем последниве неколку децении, пред се заради неправилната употреба на антимикробните супстанции во хуманата и ветеринарната медицина, како и во производството на храна, и претставува значајно епидемиолошко прашање од светски размери. Овој проблем сериозно ја ограничува достапната ефективна антимикробна терапија, со значајни последици по општата здравствена состојба на луѓето.

Антимикробната резистентност на *Salmonella spp.* во Европската Унија и во САД се користи како индикатор за статусот на резистентноста на зоонотските бактерии, што воедно е препорачано и од ОИЕ. Заради тоа

целта на ова истражување е да се следи состојбата на соевите кои се присутни во повеќе видови сурово месо од увоз наменети за човечка конзумација во Република Македонија, и да се детерминира профилот на анти-микробна резистентност на овие изолати.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

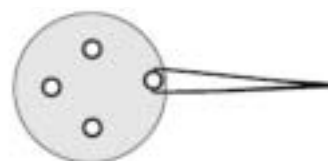
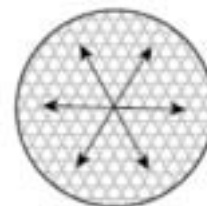
Материјал. За целите на ова истражување беа користени примероци храна доставени од државните инспекциски органи надлежни за контролата на безбедноста на храната во Република Македонија. Во периодот јуни 2007г. – јуни 2008г. беа тестирани вкупно 822 примероци од различни видови месо и тоа, 510 примероци на пилешко месо, 192 на свинско месо, 84 мелено обескоскено месо и 36 примероци на мисиркино месо.

Методи. Примероците беа тестирани во согласност со стандардот ISO 6579. За контрола на квалитетот на постапката користевме *Salmonella agona* SRM-SAG 12J-0801 (Food consumer and Product Safety Authority (VWA)). Од примерокот на месо или MOM, стерилно земавме 25 г. кои ги стававме во стерилна кеса за стомахер, а потоа додававме 225 г. на пуферирана пептонска вода (BPW), по што кесата со примерокот се инкубираше на $37^{\circ}\pm 1^{\circ}$ за 18 ± 2 часа. По инкубацијата од тестирањот примерок со пипета префрлавме по 1 ml во Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin бујон, а по 0,1 ml во RVS бујон (Rappaport-Vassiliadis Soya broth) кои се инкубираат на $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, односно $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ за $24\text{ч} \pm 3\text{ч}$. Од култивираниите бујони засевавме на два селективни цврсти медиума XLD agar (xylose lysin deoxycholate agar) и Rambach agar, кои ги инкубиравме на $37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ за $24\text{ часа} \pm 3\text{ч}$. Потоа вршевме конфирмација на секоја колонија која беше сомнителна на *Salmonella spp.* со помош на биохемиски тестови и серолошки тестови со аглутинација. Од тестираните примероци добивме 72 изолати на *Salmonella spp.* и тоа 43 од пилешко месо, 13 од MOM, 12 од свинско месо и 4 од мисиркино месо. Овие изолати беа тестирани за нивната резистентност со 8 антимикробни агенси со методот на диск дифузија (Kirby-Bauer тест) на плочи со agar Mueller

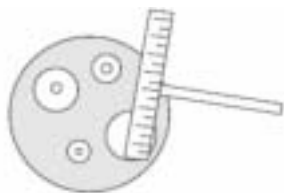
Hinton (Fluka, 70191). Работевме со следниве 8 видови антибиотици и тоа: Amoxiclav (30 µg/tab), Flumequine (30 µg/tab), Oxytetracycline (30 µg/tab), Gentamicin (10 µg/tab), Nalidixic acid (30 µg/tab), Streptomycin (10 µg/tab), Enroxil (5 µg/tab) и Neomycin (10 µg/tab). Тестот го изведувавме според стандардната процедура на CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), и во секоја серија на испитување беа вклучени и *E.coli* SRM-EC 3C-0711 и *Staph. aureus* SRM-SA 1Z-0711 (Food consumer and Product Safety Authority (VWA)) за контрола на квалитетот. Изолатите се класифицираат како осетливи (S), средно осетливи (IM) и резистентни (R) според стандардите за интерпретација на зоната на инхибиција дадени од CLSI. Методот по кој се работеа изолатите е методот на диск дифузија (Kirby-Bauer тест), кој е препорачан и опишан од CLSI (4,8).

За тестот беа земани неколку колонии од чиста култура клетки на сојот на *Salmonella*, и ставани во епрувета со солена раствор (Maximum recovery diluent, Oxoid CM 0733), за да се добие густина на суспензијата од 0,5 Mc Farlands, која беше проверувана со помош на денситометар.

По 15 мин. се зема стерилен брис, кој се натупува во суспензијата со клетки, по што содржината на брисот се размачкува на целата површина на Mueller Hinton агарот, со ротирање на плочата по 60° . За да се верифицира точноста на тестот, при секое тестирање се употребува барем по еден тест организам, ние употребувавме *E.coli* SRM-EC 3C-0711 и *Staph. aureus* SRM-SA 1Z-0711 (Food consumer and Product Safety Authority (VWA)), а потоа резултатите се споредуваат со дадените од CLSI.



Поставување
на дисковите на плочата



Мерење на зоната на инхибиција

Откако површината на агарот на која е нанесена суспензија ќе се исуши (за 10–15 мин), со стерилна пинцета се нанесуваат дисковите со антимикробни супстанции, на соодветно растојание, така што на плоча од 85 мм се поставуваат најмногу 4 дискови. Плочата се превртува и се инкубира на 35°C, 16–18ч, по што се мери дијаметарот на зоната на инхибиција заедно со дијаметарот на дискот.

На крајот, добиениот резултат се споредува со стандардите определени од CLSI (4).

РЕЗУЛТАТИ

Во ова испитување вклучивме 822 примероци на месо од кои 510 примероци (62%) се од пилешко месо, 192 (23,4%) свинско месо, 84 (10,2%) MOM и 36 (4,4%) мисиркино месо.

Добивме 72 изолати на *Salmonella* spp., за кои со серолошко тестирање констатиравме дека им припаѓаат на 13 соеви и тоа: 22 (30,5%) изолати на *S. enteritidis*, 16 (22,2%) на *S. Infantis*, 10 (13,9%) на *S.gallinarum*, 8 (11,1%) на *S.typhimurium*, 5 (6,9%) на *S. Newport*, 3 (4,2%) на *S. Heidelberg*, 2 (2,8%) на *S. Senftenberg*, *S. dublin*, *S.blockley*, *S.virchow*, *S. livingstone*, *S. panama* и *S. derby* со по 1 изолат (1,4%).

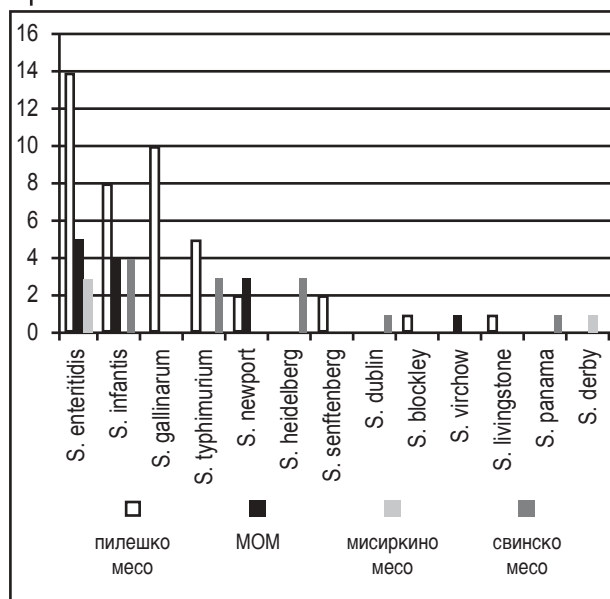
Од Табела бр.1 се гледа дека најголема застапеност на *Salmonella* spp. има кај пилешкото месо (59,7%) и тоа најмногу *S.enteritidis* која е застапена со 32,5% од вкупниот број изолирани *Salmonella* spp во овој тип на месо.

Резистентноста на сите соеви *Salmonella* spp. вклучени во ова истражување е претставена во Графикон 1.

Табела бр.1. Застапеност на поединечни соеви на *Salmonella* spp. во различните видови месо

Видови <i>Salmonella</i> spp.	Видови месо				Вкупно	Вкупно во %
	Пилешко месо	MOM	Мисиркино месо	Свинско месо		
<i>S. enteritidis</i>	14	5	3		22	30,5%
<i>S. infantis</i>	8	4		4	16	22,2%
<i>S.gallinarum</i>	10				10	13,9%
<i>S.typhimurium</i>	5			3	8	11,1%
<i>S. newport</i>	2	3			5	6,9%
<i>S. heidelberg</i>				3	3	4,2%
<i>S. senftenberg</i>	2				2	2,8%
<i>S.dublin</i>				1	1	1,4%
<i>S.blockley</i>	1				1	1,4%
<i>S. virchow</i>		1			1	1,4%
<i>S. livingstone</i>	1				1	1,4%
<i>S. panama</i>				1	1	1,4%
<i>S. derby</i>			1		1	1,4%
Вкупно	43	13	4	12	72	100%
Вкупно во %	59,7%	18,0%	5,6%	16,7%		

Графикон 1. Резистентност на сите соеви *Salmonella* spp. опфатени со истражувањето



Во следниве табели дадени се податоците на дистрибуцијата на резистентност кон осумте испитувани антимикробни супстанции за секој сој поединечно.

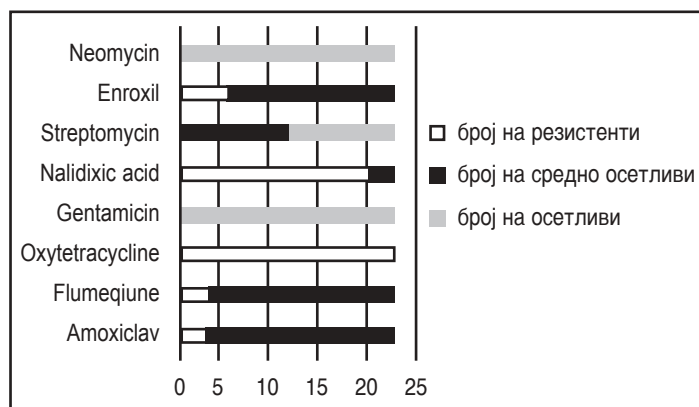
Резистентноста на *S. enteritidis* е претставена во Графикон 2.

Од 22 изолати на *S. enteritidis*, 14 (63,64%) се утврдени во пилешко месо, 5 (22,72 %) во MOM и 3 (13,64%) во мисиркино месо. Утврдено е дека овие изолирани соеви се 100% резистентни на *Oxytetracycline*, 86,4% резистентни на налидиксична киселина, 22,7 % резистентни на *Enroxil*, 13,6 % резистентни на *Amoxiclav* и *Flumequine*. Овие 22 изолати се 100% осетливи на две антимикробни супстанции и тоа на *Gentamicin* и *Neomycin*. Наведените соеви се средно осетливи кон следниве супстанции 86,4 % кон *Amoxiclav* и *Flumequine*, 77,3% кон *Enroxil*, 54,5% кон *Streptomycin* и 13,6% кон налидиксична киселина.

Табела 2. Резистентност на *S. enteritidis*

Вид антимикроб. супстанција	Број на резистентни	Процент на резистентни	Број на средно осетливи	Процент на средно осетливи	Број на осетливи	Процент на осетливи
Amoxiclav	3	13,6	19	86,4	0	0
Flumequine	3	13,6	19	86,4	0	0
Oxytetracycline	22	100	0	0	0	0
Gentamicin	0	0	0	0	22	100
Nalidixic acid	19	86,4	3	13,6	0	0
Streptomycin	0	0	12	54,5	10	45,4
Enroxil	5	22,7	17	77,3	0	0
Neomycin	0	0	0	0	22	100

Графикон 2. Резистентност на *S. enteritidis*

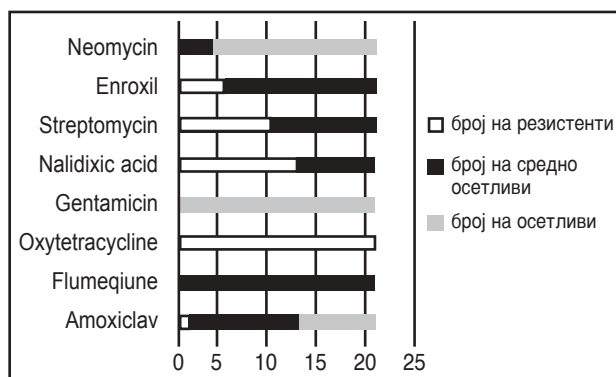


Тоа значи дека изолатите на *S. enteritidis* се резистентни само на една антимикробна супстанција и тоа на *Oxytetracycline*.

Табела 3. Резистентност на *S. infantis*

Вид антимикроб. супстанција	Број на резистентни	Процент на резистентни	Број на средно осетливи	Процент на средно осетливи	Број на осетливи	Процент на осетливи
Amoxiclav	1	6,25	9	56,25	6	37,5
Flumequine	0	0	16	100	0	0
Oxytetracycline	16	100	0	0	0	0
Gentamicin	0	0	0	0	16	100
Nalidixic acid	10	62,5	6	37,5	0	0
Streptomycin	8	50	8	50	0	0
Enroxil	4	25	12	75	0	0
Neomycin	0	0	3	18,75	13	81,25

Резистентноста на *S. infantis* е претставена во Графикон 3.

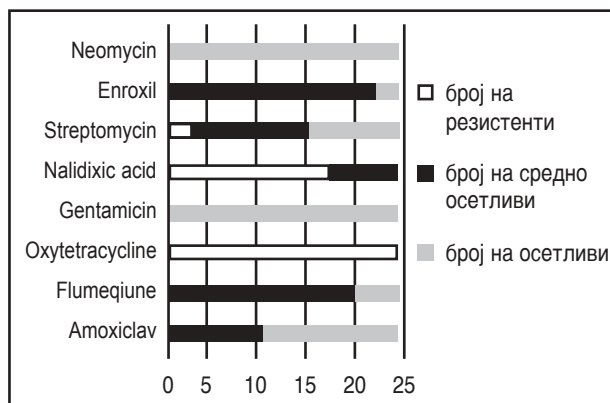
Графикон 3. Резистентност на *S. infantis*


Од 16 изолати на *S. infantis*, 8 (50%) се утврдени во пилешко месо, и по 4 (25%) во MOM и во свинско месо. Овие изолати покажаа 100% резистентност само на *Oxytetracycline*,

додека најголема осетливост од 81,25% покажаа на *Neomycin*.

Резистентноста на *S. gallinarum* е претставена во Табела 4.

Резистентноста на *S. gallinarum* е претставена во Графикон 4.

Графикон 4. Резистентност на *S. gallinarum*

Табела 4. Резистентност на *S. gallinarum*

Вид антимикроб. супстанција	Број на резистентни	Процент на резистентни	Број на средно осетливи	Процент на средно осетливи	Број на осетливи	Процент на осетливи
Amoxiclav	0	0	4	40	6	60
Flumequine	0	0	8	80	2	20
Oxytetracycline	10	100	0	0	0	0
Gentamicin	0	0	0	0	10	100
Nalidixic acid	7	70	3	30	0	0
Streptomycin	1	10	5	50	4	40
Enroxil	0	0	9	90	1	10
Neomycin	0	0	0	0	10	100

Сите 10 изолати на *S. gallinarum* се утврдени во пилешкото месо. Овие изолати покажаа 100% резистентност само на *Oxytetracycline*, додека 100% осетливост покажаа на *Neomycin* и на *Gentamicin*.

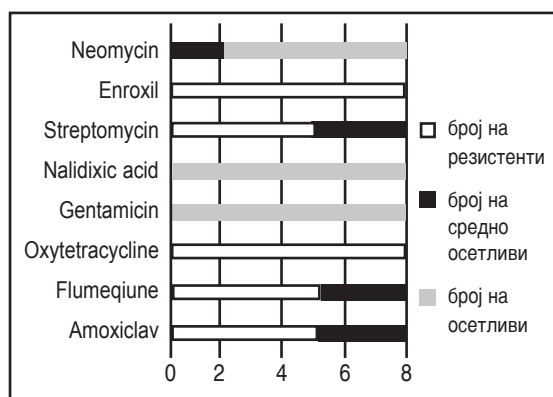
Резистентноста на *S. typhimurium* е претставена во Графикон 5.

Од добиените 8 изолати на *S. typhimurium*, 5 (62,5%) се утврдени во пилешко месо и 3 (37,5%) во свинско месо. Показаа 100% ре-

Табела 5. Резистентност на *S. typhimurium*

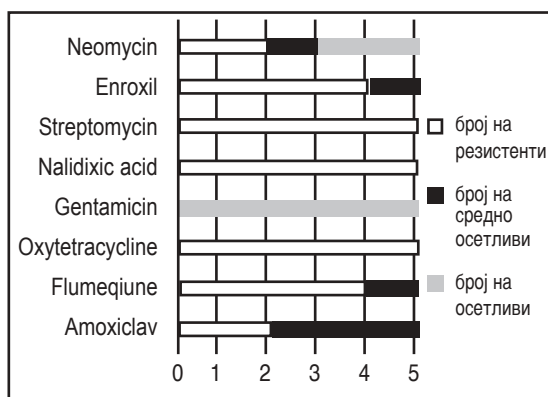
Вид антимикроб. супстанција	Број на резистентни	Процент на резистентни	Број на средно осетливи	Процент на средно осетливи	Број на осетливи	Процент на осетливи
Amoxiclav	5	62,5	3	37,5	0	0
Flumequine	5	62,5	3	37,5	0	0
Oxytetracycline	8	100	0	0	0	0
Gentamicin	0	0	0	0	8	100
Nalidixic acid	0	0	0	0	8	100
Streptomycin	5	62,5	3	37,5	0	0
Enroxil	8	100	0	0	0	0
Neomycin	0	0	2	25	6	75

Графикон 5. Резистентност на *S. typhimurium*



Резистентноста на *S. typhimurium* е претставена во Табела 5.

Графикон 6. Резистентност на *S. newport*



зистентност на *Oxytetracycline* и на *Enroxil*, додека 100% осетливост покажаа на *Gentamicin* и на налидиксична киселина.

Табела 6. Резистентност на *S. newport*

Вид антимикроб. супстанција	Број на резистентни	Процент на резистентни	Број на средно осетливи	Процент на средно осетливи	Број на осетливи	Процент на осетливи
Amoxiclav	2	40	3	60	0	0
Flumequine	4	80	1	20	0	0
Oxytetracycline	5	100	0	0	0	0
Gentamicin	0	0	0	0	5	100
Nalidixic acid	5	100	0	0	0	0
Streptomycin	5	100	0	0	0	0
Enroxil	4	80	1	20	0	0
Neomycin	2	40	1	20	2	40

Резистентноста на *S. newport* е претставена во Табела 6.

Резистентноста на *S. newport* е претставена во Графикон 6.

Петте изолати на *S. newport* покажуваат мултирезистентност и тоа на 3 од 8-те антимикробни супстанции *Oxytetracycline*, *Streptomycin* и налидиксична киселина. Воедно се слабо осетливи и на останатите антибиотици, освен на *Gentamicin*.

Резистентноста на *S. heidelberg* е претставена во Табела 7.

Добиените 3 изолати на *S. heidelberg* исто така пројавуваат мултирезистентност на истите 3 антимикробни супстанции *Oxytetracycline*, *Streptomycin* и налидиксична киселина. Резистентноста на *S. senftenberg* е претставена во Табела 8.

Овие 2 изолати покажаа 100% резистентност на 1 супстанција и тоа на *Oxytetracycline*.

Табела 7. Резистентност на *S. heidelberg*

Вид антимикроб. супстанција	Број на резистентни	Процент на резистентни	Број на средно осетливи	Процент на средно осетливи	Број на осетливи	Процент на осетливи
Amoxiclav	1	33,3	2	66,7	0	0
Flumequine	0	0	3	100	0	0
Oxytetracycline	3	100	0	0	0	0
Gentamicin	0	0	0	0	3	100
Nalidixic acid	3	100	0	0	0	0
Streptomycin	3	100	0	0	0	0
Enroxil	1	33,3	2	66,7	0	0
Neomycin	0	0	0	0	3	100

Табела 8. Резистентност на *S. senftenberg*

Вид антимикроб. супстанција	Број на резистентни	Процент на резистентни	Број на средно осетливи	Процент на средно осетливи	Број на осетливи	Процент на осетливи
Amoxiclav	0	0	0	0	2	100
Flumequine	0	0	2	100	0	0
Oxytetracycline	2	100	0	0	0	0
Gentamicin	0	0	0	0	2	100
Nalidixic acid	1	50	1	50	0	0
Streptomycin	1	50	1	50	0	0
Enroxil	0	0	2	100	0	0
Neomycin	0	0	1	50	1	50

Табела 9. Останати изолати на *Salmonella* spp.

Вид антимикробна супстанција	Соеви на <i>Salmonella</i> spp.					
	<i>S. blockley</i>	<i>S. derby</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. livingstone</i>	<i>S. panama</i>	<i>S. virchow</i>
Amoxiclav	ср. осетлива	средно осетлива	резистентна	средно осетлива	средно осетлива	ср. осетлива
Flumequine	резистентна	средно осетлива	средно осетлива	средно осетлива	средно осетлива	сред. осетлива
Oxytetracycline	резистентна	резистентна	резистентна	резистентна	резистентна	резистентна
Gentamicin	осетлива	осетлива	осетлива	осетлива	осетлива	осетлива
Nalidixic acid	резистентна	средно осетлива	резистентна	резистентна	резистентна	сред. осетлива
Streptomycin	резистентна	резистентна	резистентна	резистентна	средно осетлива	сред. осетлива
Enroxil	резистентна	средно осетлива	средно осетлива	средно осетлива	средно осетлива	сред. осетлива
Neomycin	резистентна	осетлива	резистентна	осетлива	осетлива	резистентна

Во Табела 9 се прикажани останатите соеви кои се изолирани само по еднаш.

Од податоците прикажани во Табела 9 утврдено е дека *S. blockley* е резистентна дури на 6 од испитуваните антимикиробни супстанции, *S. dublin* на 5, *S. livingstone* на 3, *S. panama*, *S. derby* на 2 и *S. virchow* на 2.

ДИСКУСИЈА

Резултатите добиени од ова истражување ја илустрираат проширеноста на антимикиробната резистентност на *Salmonella* соевите изолирани од примероци сурово месо. Сето ова укажува на неопходноста да се посвети повеќе внимание на праксата за добра хигиена на храната, со цел да се редуцира или елиминира ризикот од антибиотик-резистентни патогени бактерии кои потекнуваат од

храната. Податоците за висок степен на контаминираност укажуваат на потенцијална критична точка во хигиената во различните стадиуми на производство на храна и синџирот на дистрибуција на истата(1,2). Дополнително, потребно е употребата на антимикиробни супстанции и во храната за животните, правилно да се регулира и да се минимизира можноста овие организми да развијат резистентност (2). Податоците од ова истражување го нагласуваат значењето на постојаните напори да се изврши едукација на консументите за правилна хигиена на храната и да се потенцира потребата за континуирана опсервација на зоонотските патогени добиени од храната, вклучувајќи ги и антимикиробно-резистентните примероци, низ целиот синџир на производство на храна.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *SALMONELLA* SPP. ISOLATES FROM DIFFERENT TYPES OF RAW MEATS AND MECHANICALLY DEBONED MEAT FORM IMPORT IN R. OF MACEDONIA

Jankuloski Dean¹, Ratkova Marija¹, Kostova Sandra¹, Angelovski Ljupco¹,
Erakovic Tokalic Irena², Sekulovski Pavle¹

¹Department for food safety, Faculty for veterinary medicine in Skopje

²Manager for food safety and quality, SJ company, McDonald's

e-mail: djankuloski@fvm.ukim.edu.mk

ABSTRACT

This research is conducted to determine antimicrobial resistance of individual strains of Salmonella spp. isolated from different types of raw meats (pork, turkey, poultry and mechanically deboned meat). We examined 822 samples of meats, from which we determined and serotyped 72 strains of Salmonella, and there after we tested them all to antimicrobial resistance towards 8 antimicrobials. We determined that 50 from the isolates (69,4%) showed resistance towards at least one antimicrobial, 10 strains (13,9) are resistant towards two antimicrobials, and the rest of the 12 isolates (16,7%) are multi-drug resistant (resistance toward more then 2 antimicrobials).

ЛИТЕРАТУРА

1. Salina Parveen, Maryam Taabodi, Jurgen G. Schwarz, Thomas P. Oscar, Jeanine Harter Dennis, David G. White 2007 Prevalence and Antimicrobial resistance of Salmonella recovered from processed poultry JFP MS 07-112.
2. Thi Thu Hao Van, George Moutafis, Taghrir Istivan, Linh Thuoc Tran, Peter J. Coloe 2007 Detection of Salmonella spp. in Retail raw food samples from Vietnam and characterization of their antibiotic resistance, Ap.and Env. Microb. vol.73, no 21
3. S.Valdezate, M.Arroyo, R.Gonzalez-Sanz, R. Ramiro, S. Herrera-Leon, M.A.Usera, M. De la Fuente, A. Echeita, 2007 Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of Salmonella strains isolated from food for human consumption in Spain, J. of Food Protection vol.70, No 12, december 2007
4. CLSI 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th informational supplement. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
5. Julie M. Johnson, Andrijana Rajic, Lynn M. McMullen 2005, Antimicrobial resistance of selected Salmonella isolates from food animals and food in Alberta, Can Vet J. vol 46,feb.2005
6. Hidetake Esaki, Ayako Morioka, Kanako Ishihara, Akemi Kojima, Sanae Shiroki, Yutaka Tamura, Toshio Takahashi, 2003 Antimicrobial susceptibility of Salmonella isolated from cattle, swine and poultry(2001-2002):report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program, J. of Antimicrobial Chemotherapy (2004) 53, No 2
7. E. van Duinkerken, W.J.B. Wannet, D.J. Houwers, W van Pelt, 2003, Antimicrobial susceptibilities of Salmonella strains isolated from humans, cattle, pigs and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001, J.C.M. vol 14 No 8, aug.2003.

-
8. BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing, version 7.1, febr. 2008
9. Sheng Chen, Shaohua Zhao, David G. White, Carl M. Schroeder, Ran Lu, Hanchun Yang, Patrick F. McDermott, Sherry Ayers and Jianghong Meng, 2004, Characterization of multiple antimicrobial resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats, *Applied and environmental microbiology* Vol. 70, No. 1, jan. 2004
10. M.Daly, L.Villa, C. Pezella, S. Fanning and A. Carattoli, 2005, Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes, *J.A.C.*doi 10.1093/jac/dki015