

ANALIZA PLAZMIDSKOG PROFILA SALMONELLAE ENTERICA SEROTIP ENTERITIDIS

Biljana Miljković-Selimović, Tatjana Babić, Branislava Kocić, Predrag Stojanović, Ljiljana Ristić i Marina Dinić

Analiza plazmidskog profila (PP) je određivanje broja i veličine plazmida u bakterijskim izolatima. Prilikom primene analize plazmidskog profila u određivanju epidemijskog soja za procenu ove metode, neophodno je porediti epidemijske sojeve sa neepidemijskim sojevima izolovanih u istom vremenskom periodu. Određivanje plazmidskog profila vrši se lizom bakterijske ćelije, denaturacijom hromozoma, taloženjem ćelijskih ostataka centrifugiranjem i precipitacijom DNK etanolom. DNK se razdvaja elektroforezom u gelu na osnovu molekulske mase. Plazmidi mogu biti analizirani i restrikcionim enzimima, ali i direktnim tehnikama, hibridizacijom i elektronomikroskopski. Primena analize plazmidskog profila je omogućila rešavanje brojnih epidemija izazvanih crevnim bakterijama, naročito salmonelama. Kada je u pitanju *Salmonella enterica* serotip Enteritidis, metoda se može koristiti sama, kao metoda komplementarna fagotipizaciji, ali se može dopunjavati i drugim molekularno-genetskim tehnikama. *Acta Medica Medianae* 2008;47(2):54-57.

Ključne reči: plazmidski profil, *Salmonella enterica* serotip Enteritidis

Institut za javno zdravlje Kliničkog centra u Nišu

Kontakt: Biljana Miljković-Selimović
Institut za javno zdravlje Kliničkog centra
Bulevar dr Zorana Đinđića 50
18000 Niš, Srbija
Tel.: +381 18 226448; 0644332238
E-mail: biljams@eunet.yu

Uvod

Sa poboljšanjem metoda izolacije plazmida, od sedamdesetih godina prošlog veka, raste značaj tehnika ispitivanja sadržaja ukupnih bakterijskih plazmida kao način za utvrđivanje klonalnosti. Određivanje broja i veličine plazmida u bakterijskim izolatima naziva se analiza plazmidskog profila (PP) (1,2,3,4). Epidemijski sojevi crevnih bakterija, bakterija iz rodova *Pseudomonas* i *Vibrio*, stafilokoka i streptokoka se, izgleda, najlakše identifikuju na ovaj način (4,5). Međutim, i izolati nepovezani sa epidemijom mogu da ispoljavaju epidemijski profil. Stoga je, prilikom primene analize plazmidskog profila u određivanju epidemijskog soja za procenu ove metode, neophodno porediti epidemijske sojeve sa neepidemijskim sojevima izolovanih u istom vremenskom periodu (4).

Ukratko, određivanje plazmidskog profila se vrši nakon porasta kulture u tečnoj ili na čvrstoj podlozi, kada se spoljašna membrana

bakterijske ćelije prekida tretmanom sa lizozimima, unutrašnje membrane liziraju deterdžentom, a hromozom se denaturiše u alkalnom pH. Ćelijski ostatak se taloži centrifugiranjem u mikrocentrifugi nekoliko minuta. DNK se onda precipitira etanolom. Sa manjim modifikacijama ova se tehnika uspešno koristi za izolaciju plazmidске DNK iz većine rodova i vrsta porodice *Enterobacteriaceae* (4). Plazmidска DNK se podvrgava elektroforezi na horizontalnom ili vertikalnom gelu, a razdvajanje se vrši na bazi molekularne mase tokom migracije prema anodi. Gel se boji etidijum bromidom, koji se vezuje za DNK i fluorescira kada se osvetli ultraljubičastim svetlom. Plazmidска DNK poznate molekularne mase se uvodi kao standarad na svaki gel i njena relativna mobilnost na gelu se koristi za izračunavanje mase nepoznatih plazmida (4). Pošto dužina migracije zavisi od oblika i veličine plazmida, na gelu se može javiti više traka jednog plazmida. Kovalentno vezani uvijeni molekuli, koji najbrže putuju, mogu u toku ekstrakcije preći u otvorene prstenaste ili linerane forme. S obzirom na to da uvijene forme migriraju brže nego relaksirane, na njihov međusobni odnos i položaj u elektroforetskom polju utiču jačina struje, puferski sistem, veličina pora gela i veličina DNK molekula. Prema tome, pojava više traka može se pogrešno protumačiti kao postojanje više plazmida, a da se, u stvari, radi o više formi jednog plazmida. Sa druge strane, pošto

elektroforetska mobilnost dva različita plazmida može biti ista, neophodno je na osnovu ispitivanja sekvenci nukleotidnih baza, utvrditi da li su plazmidi iste molekulske težine i genetski identični (5). Ovakva analiza radi se digestijom (isecanjem) plazmida pomoću restrikcionih endonukleaza. Tehnike koje se koriste u analizi plazmida mogu biti direktne i indirektno. Direktne tehnike obuhvataju (I) hibridizaciju DNK lanaca sa izračunavanjem stepena homolognosti (II) analizu heterodupleksa kod malih plazmida direktno elektronsko-mikroskopski (nehomologna DNK će se pojaviti kao jednostruka omča), (III) otkrivanje DNK sekvenci Southern-blot hibridizacijom radioaktivnim DNK probama. Indirektno tehnike su (I) elektroforeza u gelu agaroze i (II) analiza restrikcionim endonukleazama (3).

Poređenje sojeva koje se bazira na njihovom sadržaju plazmida ili na restrikcionim profilima plazmidске DNK veoma je korisno kada bakterija ima plazmide. Međutim, kada bakterija ne poseduje plazmide, ova metoda je od male koristi (1).

Analiza plazmidskog profila je korisna u određivanju epidemijskog soja u epidemijama izazvanih brojnim rodovima: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* i dr (4). Ova metoda omogućila je uspešnu identifikaciju epidemijskog soja *P. aeruginosa* kod bolesnika na hemodijalizi. Naime, isti soj je izolovan i iz bolesničkog materijala i iz rastvora jodofora koji je bio put prenošenja infekcije i koji je nakon toga povučen sa tržišta (6).

Primena analize plazmidskog profila potvrdila je da su humane infekcije izazvane salmonelama obično nastajale upotrebom životinjskih proizvoda. Identični plazmidi rezistencije kod serotipova salmonela izolovanih iz ljudi i životinja kod *Salmonella enterica* serotip *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) var. Copenhagen, S. Newport i S. Dublin dobijeni su iz različitih geografskih područja u SAD. Zahvaljujući analizi plazmidskog profila ovih sojeva, utvrđeno je njihovo širenje upotrebom životinjskih proizvoda. Analiza restrikcionim endonukleazama je pokazala da su plazmidi izolata iz životinja i ljudi bili često identični ili gotovo identični (7).

Smatra se da je analiza plazmidskog profila u istraživanju epidemijskih sojeva *S. Typhimurium* relativno jednostavna za korišćenje, specifična kao i fagotipizacija, a superiorna u odnosu na biotipizaciju i rezistotipizaciju (8). Primena analize plazmidskog profila omogućila je otkrivanje mesta infekcije dece multirezistentnim sojevima *S. Typhimurium* u Sao Paulu (Brazil). Utvrđeno je da su se infekcije sojevima sa istim plazmidskim profilom javljale kod dece koja su bila hospitalizovana u istoj bolnici, tako da se endemski proces sastojao od niza manjih epidemija, koje su nastajale inficiranjem dece u pojedinim bolnicama (9).

Rešavanje epidemija izazvanih *S. Typhimurium* analizom plazmidskih profila bilo je uspešno i u našim laboratorijama. Čobeljčić i saradnici su u epidemiji izazvanoj ovim serotipom u vojnom kolektivu identifikovali epidemijski soj sa plazmidima veličine 30 MDa i 60 MDa. Soj je bio izolovan iz stolica bolesnika, kuvara kliconoše i

hrane. Isti autori su analizom druge epidemije koja se odvijala u bolničkoj sredini, ukazali da se iz jedne epidemije mogu izolovati i sojevi koji, mada pripadaju istom serotipu, nisu povezani sa epidemijom (10).

Analiza plazmidskog profila omogućava i rešavanje epidemija izazvanih drugim salmonelama. U jednoj epidemiji izazvanoj S. Newport u SAD utvrđeno je da je put prenošenja bilo goveđe meso sa jedne farme jer su svi sojevi izolovani iz obolelih, mesa i iz životinja sa farme sadržavali R plazmid koji je determinisao otpornost na ampicilin, karbencilin i tetraciklin. Mada su bile inficirane brojne osobe, obolele su samo one koje su antibioticima omogućile selektivnu prednost i razmnožavanje (11). Plazmidski profil koji je opisan kod sojeva izolovanih i iz stolica obolelih od enterokolitisa izazvanog S. Muenchen, u nekoliko država SAD, i iz marihuane, omogućio je identifikovanje epidemijskog soja koji je imao neobičan put prenošenja (12). U Institutu za zaštitu zdravlja u Novom Sadu, izolati *S. Hadar* koji su poticali iz jedne epidemije, a vodili su poreklo iz uzoraka hrane i stolice obolelih, zaposlenih u restoranu, bili su rezistentni na ampicilin i streptomycin. Analiza plazmidskog profila pokazala je prisustvo pet traka plazmida sa molekulskom težinom od 13, 5.4, 4.2, 2.0 i 1.7 MDa (13).

Analizom plazmidskog profila može se dokazati različiti broj profila u zavisnosti od toga sa kog geografskog područja potiču izolati, koji je vremenski period obuhvaćen istraživanjem, kao i od porekla sojeva, da li su ljudskog, životinjskog ili vode poreklo iz hrane. U Škotskoj, 2005. godine, kod *S. Enteritidis*, koja predstavlja i najčešći serotip, 523 od 543 izolata (96.3%) sadržavala su barem jedan plazmid. Kod 269 ovih izolata (49.5%), jedini prisutan plazmid bio je plazmid virulencije, od 57 kb, a dvadeset izolata nije posedovalo ni jedan plazmid. Kod 134 izolata PT 1 opisano je 16 različitih plazmidskih profila, a 11 profila dokazano je kod 117 izolata PT4. Kod preostala 292 izolata *S. Enteritidis* utvrđeno je prisustvo 74 različita plazmidска profila (14).

Ispitivanjem sojeva *S. Enteritidis* izolovanih iz ljudi i različitih životinja, identifikovano je šesnaest različitih plazmidskih profila koji su korišćeni za diferencijaciju sojeva, posebno unutar čestih fagotipova (PT 8 i PT 13a) (15). U studiji u kojoj je ispitano 318 sojeva *S. Enteritidis*, uglavnom izolovanih iz živine i njene okoline u Kanadi, dokazano je dvanaest fagotipova. Međutim, kod ovih sojeva bilo je moguće odrediti petnaest plazmidskih profila (16). Ispitujući plazmidski profil *S. Enteritidis* izolovane iz živine, u periodu 1989-90. u Kanadi, autori su dokazali dvanaest profila naspram samo četiri fagotipa (17). Ispitivanjem 105 sojeva *S. Enteritidis* (72 poreklom od ljudi i 33 koji nisu bili humanog porekla), izolovanih u periodu 1975-1995, dokazano je sedam različitih plazmidskih profila, dok je 96% izolata imalo plazmid veličine od približno 36 MDa (18). Ispitivanjem 64 izolata *S. Enteritidis* iz kolekcije laboratorije za enterobakterije na Medicinskom fakultetu u Ankari, od ispitivanih izolata, 88% posedovalo je

od 1 do 4 plazmida veličine od 2.5 do 100 kbp. Plazmid veličine 57 kbp bio je najčešći i dokazan je kod 69%, sam ili sa drugim plazmidima (19). Određen je plazmidski profil 276 sojeva *S. Enteritidis* izolovanih u Institutu za javno zdravlje u Nišu. Ispitano je 28 epidemijskih sojeva sa 94 izolata i 182 neepidemijska soja. Analiza plazmidskih profila epidemijskih i neepidemijskih sojeva pokazala je 12 plazmidskih profila. Pored dva najčešća plazmidiska profila: PP 38MDa i PP 38 2MDa, utvrđeni su i plazmidski profili sa plazmidima veličine 4,0, 3,4, 2,7 i 1,5MDa, ali i sa velikim plazmidima od 34 i 27MDa, mada mnogo ređe (20).

Analiza plazmidskog profila bila je uspešno primenjena i u rešavanju epidemija izazvanih *S. Enteritidis*. Istraživanjem epidemije enterokolitisa u lancu restorana u Merilendu utvrđen je identičan plazmidski profil (55, 3,5 i 2,5 kb) kod izolata *S. enteritidis* svih obolelih. Verovatnoća da je ovaj plazmidski profil bio slučajno udružen sa epidemijom iznosila je manje od 0,05 (21). Istraživanje jedne epidemije na Medicinskom fakultetu u Ankari, utvrđeno je da su sojevi izolovani tokom epidemije imali isti plazmidski profil od 3 plazmida veličine 57, 40, i 3.0 kbp 22 19 (19). Epidemija izazvana *S. Enteritidis* fagotip 13 (*S. Enteritidis* PT13), zabeležena je u Republici Češkoj. Soj je pripadao retkom fagotipu i bio je osetljiv na ampicilin. Sojevi izolovani tokom epidemije, kao i sojevi izolovani pre epidemije, ispitivani su analizom plazmidskog profila. Utvrđeno je da je otpornost na ampicilin povezana sa plazmidom veličine 200 kb koji je dokazan kod *S. Enteritidis* (22).

Kada su u pitanju sojevi *S. Enteritidis* PT 8, smatra se da je širenje ovog dominantnog klona kod koga je uglavnom dokazan PP 38 MDa, smanjilo diskriminatornu sposobnost oba tipizirajuća sistema. Ispitivanjem 203 sporadična i epidemijska izolata *S. Enteritidis*, koja su izolovana

u Merilendu između 1985. i 1990. godine, identifikovano je deset plazmidskih profila. Dominantan profil bio je PP 55 kba (38 MDa); on je činio 86% plazmidskih profila kod izolata ovog fagotipa iz 1988-89. godine (23).

U drugom istraživanju analiza plazmidskih profila pokazala se superiornom u odnosu na fagotipizaciju kod sojeva PT 8 jer je bilo moguće opisati šest različitih plazmidskih profila naspram samo jednog fagotipa. Sa druge strane, tri soja bez plazmida od 55kba (38 MDa) mogla su biti diferencirana primenom dva dodatna faga (24). Ovi rezultati ukazuju da u nekim slučajevima određivanje plazmidskog profila i fagotipizacija mogu biti komplementarne metode.

Prema drugim autorima, određivanje plazmidskog profila predstavlja dodatak fagotipizaciji (25). Ispitivanje predstavnika 27 fagotipova *S. Enteritidis* pokazalo je da se može identifikovati samo jedanaest plazmidskih profila. Dva profila su dokazana u petnaest sojeva PT 4 i 8, koji su i dva najčešća fagotipa u Velikoj Britaniji. Varijacije plazmidskih profila pogodne za epidemiološka ispitivanja su nađene kod trinaest fagotipova (26). *S. Enteritidis* PT 4 imala je devet različitih plazmidskih profila (27). Stoga se analiza plazmidskog profila prema ovim autorima može prihvatiti kao efikasna dopuna fagotipizacije. Smatra se, takođe, da je analiza plazmidskog profila veoma korisna za diferencijaciju unutar sojeva PT 4 (28).

U drugim studijama, istraživači su ukazali i na nestabilnost plazmida *S. Enteritidis* u izolatima različitog porekla. Ispitivanjem jedne nozokomijalne epidemije izazvane *S. Enteritidis* u SAD, utvrđene su delimične razlike u plazmidskom profilu kod sojeva izolovanih iz bolesnika (54 kb kod jednih ; 54, 8,4 kb kod drugih ; 54 i >100 kb kod trećih), hrane (54 kb) i ovarijuma kokošaka (54 kb), dok soj izolovan iz svežih jaja nije sadržavao plazmide (29).

Literatura

- Orskov F, Orskov I. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the Enterobacteriaceae and other bacteria. *J Infect Dis* 1983;148:346-57.
- Riley LW, DiFerdinando GT Jr, DeMelfi TM, Cohen ML. Evaluation of isolated cases of salmonellosis by plasmid profile analysis: introduction and transmission of a bacterial clone by precooked roast beef. *J Infect Dis* 1983;148:12-7.
- Farrar WE Jr. Molecular analysis of plasmids in epidemiologic investigation. *J Infect Dis* 1983;148:1-6.
- Wachsmuth K. Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. *Rev Infect Dis* 1986;8:682-92.
- Tompkins L. DNA methods in clinical microbiology. In: Lenette EH, Manual of clinical microbiology (4th edition), Washington D.C.: American Society for Microbiology;1985. p1023-28.
- Parrot PL, Terry PM, Whitworth EH, Frawley LW, Cable RS, Wachsmuth IK, et al. Pseudomonas aeruginosa peritonitis associated with contaminated poloxameriodine solutions. *Lancet* 1982; ii: 683-5.
- O'Brien TF, Hopkins JD, Gilleece ES, Medeiros AA, Kent RL, Blackburn BO. et al. Molecular epidemiology of a antibiotic resistance in salmonella from animals and human beings in the United States. *N Engl J Med.* 1982;307:1-6.
- Threlfall EJ, Rowe B, Ferguson JL, Ward LR. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of Salmonella typhimurium phage type 204c isolated in Britain. *J Hyg Camb*, 1986;97:419-26.
- Riley LW, Ceballos BS, Trabulsi LR, Fernandes de Toledo MR, Blake PA. The significance of hospitals as reservoirs for endemic multiresistant Salmonella typhimurium causing infection in urban brazilian children. *J Infect Dis* 1984;150:236-41.
- Čobeljić M, Stojiljković I, Salaj-Šmic E, Drndarević D, Stojadinović N, Paunović ???, i sar. Primena analize plazmidskog profila u ispitivanju epidemija alimentarnih toksinfekcija. *Vojnosanit Pregl* 1986;5:335-9

11. Holmberg SD, Osterholm MT, Senger KA. Drug resistant salmonella from animals fed antimicrobials. *N Engl J Med* 1984;311:617-22.
12. Taylor DN, Wachsmuth KI, Shangkuan Y, Schmidt EV, Barrett TJ, Schrader IS, et al. Salmonellosis associated with marijuana. A multistate outbreak traced by plasmid fingerprinting. *N Engl J Med* 1982;306:1249-53.
13. Jelasić Z, Kulauzov M, Kozoderović G. Analysis of the plasmid profile of various Salmonella serotypes. *Med Pregl* 2000;53(11-12):564-7.
14. Health protection Scotland. The Scottish Salmonella Reference Laboratory. Gastrointestinal & Zoonoses. Weekly Report Articles 02 May. Available from: URL:2007http://www.hps.scot.nhs.uk/giz/wrdetail.aspx?id=34171&wrtype=9#
15. Wachsmuth IK, Kiehlbauch JA, Bopp CA, Cameron DN, Strockbine NA, Wells JG, et al. The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigations of foodborne, diarrheal diseases. *Int J Food Microbiol* 1991;12:77-89.
16. Poppe C, Demczuk W, McFadden K, Johnson RP. Virulence of Salmonella enteritidis phage types 4, B and 13 and other Salmonella spp. for day-old chicks, heans and mice. *Can J Vet Res* 1993;57:281-7.
17. Dorn CR, Silapanuntakul R, Angrick EJ, Shipman LD. Plasmid analysis and epidemiology of Salmonella enteritidis infection in three commercial layer flocks. *Avian Dis* 1992;36: 844-51.
18. Fernandes SA, Ghilardi AC, Tavechio AT, Machado AM, Pignatari AC. Phenotypic and molecular characterization of Salmonella Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;2:59-63.
19. Tekeli A, Erdem B, Sahin F, Koyuncu E, Karasartova D, Bayramova M. Plasmid profiles and randomly amplified polymorphic DNA analysis of Salmonella enterica serotype Enteritidis strains from outbreaks and sporadic cases in Turkey. *New Microbiol* 2006; 29(4):251-60.
20. Miljković-Selimović B. Karakteristike plazmidskih profila Salmonellae enteritidis. Medicinski fakultet: Univerzitet u Nišu; 1997.
21. Lin F-YC, Morris, GJ Jr, Trump D, Tilghman D, Wood PK, Jackman N, Israel E, Libonati PJ. Investigation of an outbreak of Salmonella enteritidis gastroenteritis associated with consumption of eggs in a restaurant chain in Maryland. *Am J Epidemiol* 1988;128:839-44.
22. Hradecka H, Kolackova I, Karpiskova R, Rychlik I. An outbreak of human salmonellosis caused by ampicillin-resistant Salmonella enterica serovar Enteritidis PT13 in the Czech Republic. *Epidemiol Infect* 2006;134(4):737-40.
23. Morris JG Jr, Dwyer DM, Hoge CW, Stubbs AD, Tilghman D, Groves C, et al. Changing clonal patterns of Salmonella enteritidis in Maryland: evaluation of strains isolated between 1985 and 1990. *J Clin Microbiol* 1992;30:1301-3.
24. Stubbs AD, Hickman-Brenner FW, Cameron DN, Farmer JIII. Differentiation of Salmonella enteritidis phage type 8 strains: evaluation of three additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns, and biotyping. *J Clin Microbiol* 1994;32:199-201.
25. Miljković-Selimović B, Babić T, Kocić B, Stojanović P, Ristić Lj, Dinć M. Bakterijski plazmidi. *Acta Medica Medianae* 2007;46(4):61-5.
26. Threlfall EJ, Rowe B, Ward LR. Subdivision of Salmonella enteritidis phage types by plasmid profile typing. *Epidemiol Infect* 1989;102:459-65.
27. Powell NG, Threlfall EJ, Chart H, Rowe B. Subdivision of Salmonella enteritidis, PT 4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. *FEMS Microbiol Lett* 1994;119:193-8.
28. Erdem B, Threlfall EJ, Schofield SL, Ward LR, Rowe B. Plasmid profile typing provides a method for the differentiation of strains of Salmonella enteritidis phage type 4 isolated in Turkey. *Lett Appl Microbiol* 1994;19:265-7.
29. Telzak EE, Budnick LD, Greenberg MS, Blum S, Shayegani M, Benson CE, et al. A nosocomial outbreak of Salmonella enteritidis infection due to the consumption of raw eggs. *N Engl J Med*, 1990;6:394-7.

PLASMID PROFILE ANALYSIS OF SALMONELLA ENTERICA SEROTYPE ENTERITIDIS

Biljana Miljkovic-Selimovic, Tatjana Babic, Branislava Kocic, Predrag Stojanovic, Ljiljana Ristic and Marina Dinic

Plasmid profile analysis (PP) is a method of determining a number and size of plasmids in bacterial isolates. When using plasmid profile analysis in determining epidemical strain for evaluation of this method, it is necessary to compare epidemiological strains with non-epidemiological ones isolated in the same period of time. Plasmid profile determination is performed by lyses of bacterial cell, chromosomal denaturation, sedimentation of cells fragments by centrifugation, and precipitation of DNA with ethanol. DNA is separated by gel electrophoresis based on its molecule mass. Plasmids could be also analyzed by restriction enzymes, as well as by direct techniques, such as hybridization and electronmicroscopically. Using of plasmid profile analysis enables resolving numerous outbreaks caused by *Enterobacteriaceae*, especially *Salmonella*. This method could be performed alone for *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*, but also as a complementary method to phage typing (phagotypization), and other molecular genetic based techniques. *Acta Medica Medianae* 2008;47(2):54-57.

Key words: plasmid profile, *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*