

ORIGINALNI RAD – ORIGINAL PAPER

UDK 636.4.09:615.015.8:579.842.11

**ISPITIVANJE PRISUSTVA NOVIH OBLIKA REZISTENCIJE
NA NEKE ANTIBIOTIKE KOD SOJEVA *E. COLI*
IZOLOVANIH OD PRASADI******THE INVESTIGATION OF NEW FORMS OF RESISTANCE TO SOME
ANTIBIOTICS IN E coli STRAINS ISOLATED FROM PIGLETS*****Ružica Ašanin, M. Žutić, Jelena Ašanin, D. Mišić, Jadranka Žutić,
Dobrila Jakić-Dimić, N. Milić, J. Nišavić****

Rezistencija bakterija predstavlja značajan problem svuda u svetu, pa i kod nas. Širenju rezistencije doprinela je nekritička upotreba antibakterijskih lekova u humanoj i veterinarskoj medicini. Zbog aktuelnosti problema veliki broj država finansira projekte čiji je cilj praćenje i nadzor nad rezistencijom bakterija.

*Cilj ovog istraživanja je bio izolacija i identifikacija patogenih sojeva *E. coli* kod prasadi sa klinički manifestnom dijarejom i ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva na određeni broj odabranih antibiotika. Materijal za ovo ispitivanje predstavljali su delovi creva (jejunum, ileum) uginule prasadi, rektalni brisevi i feces obolele prasadi uzorkovani na farmama svinja iz okoline Beograda. Za izolaciju su korišćene klasične metode mikrobiološke dijagnostike, a za identifikaciju klasični i komercijalni testovi API 20E (bioMerieux, Francuska). Nakon biohemijske identifikacije pomoću hiperimunih seruma za određene grupne (O) antigene (O8, O138, O139, O147, O149 i O157) vršena je serološka tipizacija sojeva. Za utvrđivanje prisustva i identifikaciju fimbrijalnih antigena – adhezina primenom reakcije aglutinacije na pločici su korišćeni komercijalni antiserumi: K88 (F4), K99 (F5) i 987P (F6), Toxigenic *E. coli* pili antisera, Denka Seiken Co. Ltd. Tokyo, Japan. Osetljivost na antibiotike izolovanih sojeva *E. coli* ispitivana je prime-*

* Rad primljen za štampu 25. 12. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Ružica Ašanin, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sci. med. vet. Milenko Žutić, naučni saradnik, dr sci. med. Jelena Ašanin, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sci. med. vet. Dušan Mišić, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; mr sci. med. vet. Jadranka Žutić, istraživač saradnik, dr sci. med. vet. Dobrila Jakić-Dimić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sci. med. vet. Nenad Milić, redovni profesor, dr sci. med. vet. Jakov Nišavić, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

nom disk difuzione metode po Kirby Baueru i mikrodilucione metode u bujonu prema preporukama CLSI (2008). Ispitivanje mikrodilucionom metodom u bujonu je vršeno sa čistim aktivnim supstancama antibiotika: ampicilina, apramicina, gentamicina, kanamicina, tetraciklina, ceftriaksona i ciprofloksacina (Sigma, SAD).

*Ukupno je izolovano 400 sojeva *E. coli*, od kojih je 48 svrstano u kategoriju patogenih sojeva. Od navedenog broja patogenih sojeva *E. coli* kod 32 (66,67%) je ustanovljena multirezistencija na 3 i više od 3 antibiotika, a kod 16 sojeva (33,33%) rezistencija na 2 ili 1 ispitivani antibiotik. Rezistencija na tetraciklin i ampicilin ustanovljena je kod 89,58% izolovanih sojeva *E. coli*, a na ciprofloksacin kod 37,5% sojeva. Najniži procenat rezistencije na ceftriakson ustanovljen je kod 4,17% sojeva *E. coli*. Prisustvo rezistencije kod izolovanih sojeva *E. coli* ustanovljeno je i na neke aminoglikozidne antibiotike. Tako je rezistencija ustanovljena kod 18,75% sojeva kod kojih su vrednosti MIC-a bile veće od 128 µg/mL. Kod 52,08% sojeva *E. coli* otkrivena je rezistencija na kanamicin, a od navedenog procenta kod 96,00% sojeva vrednosti MIC-a kanamicina iznosile su preko 256 µg/mL. Takođe je kod 33,33% sojeva *E. coli* ustanovljena rezistencija i na treći aminoglikozidni antibiotik, gentamicin. Svi sojevi *E. coli* koji su uzrokovali dijareju kod prasadi bili su rezistentni na najmanje dva antibiotika, a kod preko 50% sojeva otkriveno je prisustvo rezistencije na više od 3 antibiotika. Značajno je naglasiti da su svi izolovani sojevi *E. coli* obuhvaćeni ispitivanjem bili osetljivi samo na amikacin.*

*Ključne reči: svinje, *E. coli*, antibiotici, rezistencija*

Uvod / Introduction

Intenzivni razvoj svinjarstva kao značajnije grane stočarske proizvodnje praćen je brojnim problemima. Najčešći zdravstveni problemi koji zahvataju sve kategorije svinja u farmskom uzgoju jesu respiratorni sindrom i gastrointestinalna oboljenja. Kada su u pitanju gastrointestinalna oboljenja prasadi od bakterijskih uzročnika najčešće se pominju različiti sojevi *E. coli*. Ovaj mikroorganizam normalno se nalazi u zadnjim partijama creva ljudi i životinja i tu dominira u odnosu na sve druge vrste bakterija koje čine takozvani "crevni mikrobiom". Međutim, pored poželjnih postoje i patogeni sojevi *E. coli* koji mogu pripadati enterotoksičnim (enterotoksičnim), enteroinvazivnim, enteropatogenim, verotoksičnim (enterohemoragičnim) i nekrotoksičnim grupama. Enterotoksični sojevi *E. coli* (ETEC) izazivaju vodenasti proliv kod novorođene prasadi i odlučene prasadi odmah posle odbijanja od sise. Patogeni sojevi ETEC, osim dijareje u neonatalnom periodu (kolibaciloze), mogu da izazovu i koliseptikemiju, meningitis prasadi, kao i edemsku bolest (Fairbrother i Gyles, 2006). Pošto se može lako

izolovati i identifikovati, *E. coli* je najviše korišćen mikroorganizam u laboratorijskim i eksperimentalnim ispitivanjima (biohemijskim, molekularnim, genetskim i drugim).

Poznato je da životinje predstavljaju važan potencijalni izvor multirezistentnih sojeva bakterija, tačnije gena rezistencije bakterija na antibiotike. Geni se mogu preneti direktnim kontaktom ili indirektno, preko predmeta, kao i namirnicama animalnog porekla, na bakterije koje normalno nastanjuju organizam ljudi. Značaj životinja kao rezervoara multirezistentnih sojeva bakterija je toliko veći ukoliko se radi o patogenim bakterijama uzročnicima zoonoza. Geni rezistencije smešteni na hromozomima bakterija prenose se tokom proste deobe, što ima manji značaj. Veću opasnost predstavlja širenje gena rezistencije na antibiotike između bakterija pomoću takozvanih mobilnih genetičkih elemenata, plazmida, transpozona, integra i insercionih sekvenci. Ovakav način širenja gena rezistencije odigrava se u prirodi između bakterija različitih taksonomskih vrsta svakog trenutka u svim uslovima sredine i na svim mestima (zemljište, voda, vazduh). Širenje gena rezistencije je nepredvidiva pojava koju nije moguće kontrolisati, meriti i izračunavati (Smith i Lewin, 1993).

Zbog sve učestalije pojave ozbiljnih infekcija kod ljudi izazvanih multirezistentnim sojevima bakterija koje se ne mogu lečiti antibioticima i koje se u najvećem broju slučajeva završavaju fatalnim ishodom, sve razvijene zemlje sveta uvele su zakonski obavezan monitoring upotrebe i kontrolu primene antibiotika (Ašanin i sar., 2005).

Sa druge strane, dokazano je da su geni rezistencije (R-geni) bili prisutni kod bakterija i pre uvođenja antibiotika u kliničku upotrebu i to zahvaljujući njihovom otkriću u sojevima *E. coli* izolovanim iz naslaga arktičkog leda starog 2000 godina (Alonso i sar., 2001; Hariharan i sar., 2004). Zbog toga se smatra da je rezistencija na antibiotike pojava stara nekoliko stotina miliona godina, odnosno isto onoliko koliko su stari i mikroorganizmi. Ovo otkriće nije bilo neobično s obzirom na to da antibiotike prirodno proizvode same bakterije i jasno je da u tom slučaju moraju biti rezistentne na antibiotik koji proizvode, kako ne bi bile ubijene sopstvenim proizvodom.

Suprotno od toga, mikroorganizmi koji nisu imali sposobnost proizvodnje antibiotika, a bili su izloženi delovanju antibiotika iz okruženja morali su se adaptirati i razviti mehanizme rezistencije kako bi preživeli. Sposobnost prilagođavanja i preživljavanja u neprijateljskom okruženju, osetljive bakterije sticale su putem mutacija i genetičkog transfera, odnosno prenošenjem, kako mutiranih gena, tako i gena koji kodiraju samozaštitu. Slično tome, u poslednjih 60 godina, koliko traje antibiotska era, patogene bakterije razvile su "klinički značajnu rezistenciju" na antibiotike koji se koriste u terapiji oboljenja poznate bakterijske etiologije (Walch, 2003). Primećeno je da se ovaj oblik rezistencije javlja nakon samo nekoliko meseci od uvođenja novog antibiotika u kliničku praksu, kao što se dogodilo sa penicilinima i cefalosporinima, ili nakon nekoliko godina pa čak i desetine godina, što je ređi slučaj. Vankomicin je u kliničku upotrebu uveden 1956. go-

dine, a prvi slučaj rezistencije zabeležen je 1988. godine (Walch, 2003). Ustanovljeno je da se klinička rezistencija bakterija na antibiotike izrazito lako širi preko drugih vrsta životinja, posebno miševa, mačaka i pasa, ali i preko ljudi koji su prethodno dolazili u kontakt sa životinjama nosiocima rezistentnih sojeva *E. coli* (Alonso, 2001; Hartman i sar., 2003; Krnjaić, 2005, Filipović, 2005).

Danas je poznato da najduže 3 godine posle uvođenja novog antibiotika u terapijski protokol za lečenje obolele životinje ili njihovog korišćenja kao promotera rasta dolazi do pojave rezistentnih sojeva bakterija na taj antibiotik pri čemu se pojava novih oblika rezistencije skoro uvek se otkriva najpre kod *E. coli* (Bywater, 2004; Catry i sar., 2003). Međutim, 2003. godine otkriven je potpuno novi oblik rezistencije na aminoglikozidne antibiotike kod sojeva *E. coli* poreklom od ljudi i životinja, koji nije direktno povezan sa kliničkom upotrebom aminoglikozida, ali do danas nije objašnjeno kako je došlo do širenja gena koji kodiraju ovu rezistenciju. Naime, radi se o genima koji kodiraju proizvodnju enzima metiltransferaze koja metiluje ciljno mesto vezivanja aminoglikozida, koji su inače nukleotidi u 16S subjedinici ribozomalne RNK i na taj način ih čine neprepoznatljivim za navedene antibiotike (Dominguez i sar., 2005). Ovi geni su postojali isključivo kod bakterija koje i same proizvode aminoglikozidne antibiotike i to kao mehanizam samoodbrane. Tako su pomenuti geni otkriveni kod vrsta *Micromonospora purpurea* koja proizvodi gentamicin, *Streptomyces tenjimariensis* koja proizvodi istamicin, *Streptomyces griseus* koja proizvodi streptomycin itd., ali do 2003. godine se ovi geni nisu mogli naći kod drugih vrsta bakterija. Kako je došlo do toga da se navedeni geni prošire sa bakterija producera aminoglikozida na bakterije uzročnike infektivnih bolesti još nije ustanovljeno. Takođe, nije jasno zašto su se ovi geni proširili na ostale bakterije tek 2003. godine, kada se zna da postoje milionima godina i da se aminoglikozidni antibiotici intenzivno koriste u kliničkoj praksi skoro 40 godina. Naime, još od momenta uvođenja aminoglikozida u kliničku praksu pojavila se i klinička rezistencija na aminoglikozide kod bakterija, ali to su bili potpuno drugi mehanizmi rezistencije. Svim tim "starim" mehanizmima rezistencije je zajednička proizvodnja enzima koji vrše fosforilaciju ili acetilaciju samih aminoglikozida i tako ih inaktivišu. Novootkriveni mehanizam rezistencije na aminoglikozide se naziva i takozvani "high-level aminoglycosides resistance" jer omogućava rezistenciju pri koncentracijama aminoglikozida većim čak od 1000 µg/mL pa i 2000 µg/mL koja u mikrobiološkom smislu predstavlja izrazito visoku koncentraciju antibiotika. Stoga je, za sada, ovo jedan od najopasnijih oblika rezistencije. Do danas je otkriveno 6 različitih gena koji kodiraju ovu rezistenciju i oni su označeni kao *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* i *npmA*. Ono što je zabrinjavajuće jeste činjenica da se ovi geni u skoro 100 % slučajeva nalaze na konjugativnim plazmidima pa se lako šire, a vezani su i sa genima koji kodiraju rezistenciju na fluorokvinolone i proizvodnju ESBL enzima (beta laktamaze proširenog spektra delovanja). Smatra se da su navedeni geni, tačnije *armA* gen koji je i prvi bio otkriven, "izašli" iz Poljske u kojoj je prijavljen prvi slučaj ovog oblika rezistencije kod soja *E. coli* izolovanog iz fecesa bolničkog pacijenta. Što se tiče veterinarske

medicine, do danas su pomenuti geni otkriveni kod sojeva *E. coli* poreklom od svinja, dok kod drugih životinja nisu zabeleženi. Slučajevi ovog oblika rezistencije kod sojeva *E. coli* u veterinarskoj medicini prijavljeni su u Španiji, Francuskoj, Bugarskoj i Japanu (Dominguez i sar., 2005).

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

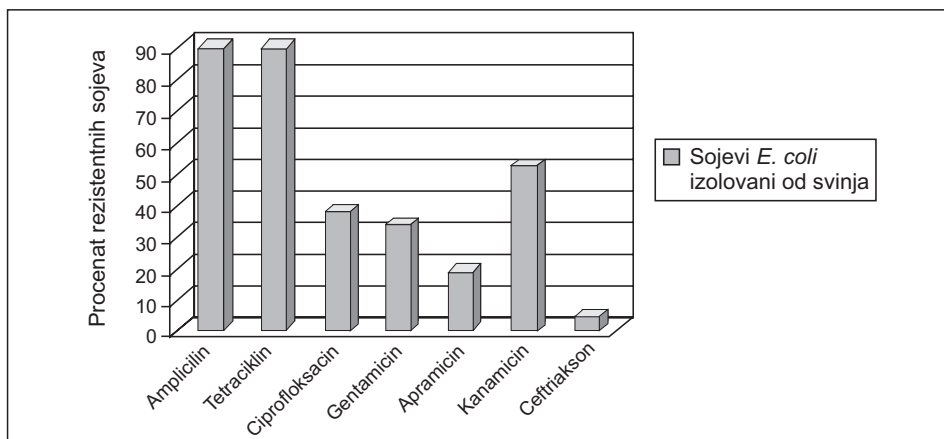
Materijal za ovo ispitivanje predstavljali su delovi creva (jejunum, ileum) uginule prasadi, rektalni brisevi i feces obolele prasadi uzorkovani na nekoliko farmi svinja iz okoline Beograda. Za izolaciju su korišćene klasične metode mikrobiološke dijagnostike, a za identifikaciju klasični i komercijalni testovi API 20E (bioMerieux, Francuska). Primenom hiperimunih dijagnostičkih seruma proizvedenih na kunićima koji su imunizovani referentnim sojevima *E. coli*, određivana je pripadnost izolovanih sojeva *E. coli* serološkim grupama: O8, O138, O139, O147, O149 i O157. Za identifikaciju fimbrijalnih adhezina korišćeni su komercijalni antiserumi (Toxigenic *E. coli* pili antisera, Denka Seiken, Japan) i to za adhezine K88 (F4), K99(F5) i 987P(F6), koji se najčešće nalaze kod svinja. Za ispitivanje osetljivosti na antibiotike izolovanih sojeva *E. coli* primenjene su disk difuziona i mikrodiluciona metoda u bujonu koje su izvođene na osnovu preporuka Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) iz 2008. godine. Ispitivanje je vršeno sa čistim aktivnim supstancama antibiotika: ampicilina, apramicina, gentamicina, kanamicina, tetraciklina, ceftriaksona i ciprofloksacina (Sigma, SAD). Svi nabrojani antibiotici koriste se i u kliničkoj veterinarskoj praksi osim apramicina, koji je u ovom ispitivanju korišćen kao marker antibiotik radi detekcije novog oblika rezistencije na aminoglikozide. Za kontrolu kvaliteta izvođenja metode, kvaliteta hranljivih podloga i ostalih dijagnostikuma korišćen je referentni soj *Escherichia coli* ATCC 25922. Očitavanje i interpretacija dobijenih rezultata vršeni su prema preporukama CLSI (2008).

Rezultati ispitivanja i diskusija / *Results and Discussion*

Ukupno je izolovano 400 sojeva *E. coli*, od kojih je 48 svrstano u kategoriju patogenih sojeva. Serološkom tipizacijom izolovanih sojeva ustanovljeno je da 42,8% pripada serološkoj grupi O149, a zatim 19,0% grupi O138. Sa istim procentima sojeva od 14,2% bile su zastupljene grupe O8 i O147. Svega 9,5% sojeva je pripadalo grupi O157. Nije tipiziran nijedan soj *E. coli* iz serološke grupe O139.

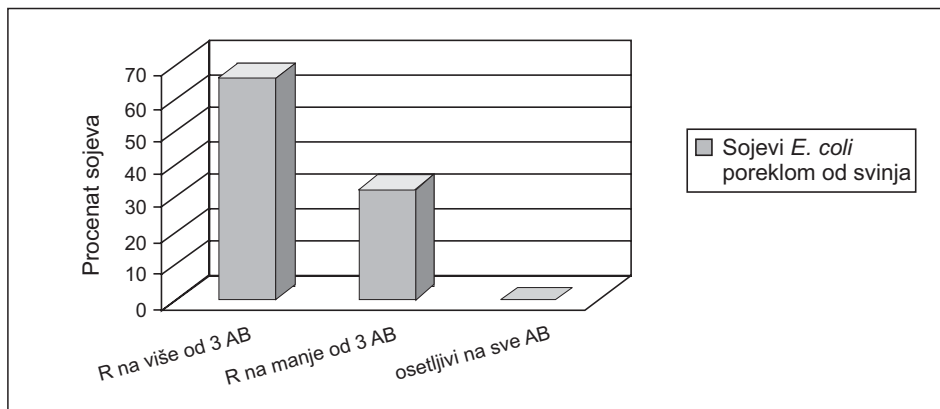
Prisustvo fimbrijalnih adhezina je utvrđeno kod 19 (33,3%) sojeva. Najzastupljeniji su bili adhezini F4 i to kod 17 (29,8%) sojeva, dok je kod 2 (3,5%) soja ustanovljeno prisustvo F6 adhezina. Nijedan od ispitanih sojeva nije posedovao adhezin tipa F5.

Od navedenog broja patogenih sojeva *E. coli* kod 32 (66,67%) ustanovljena je multirezistencija na 3 i više od 3 antibiotika, a kod 16 (33,33%) sojeva rezistencija na 2 ili 1 ispitivani antibiotik. Nisu otkriveni sojevi koji su bili osetljivi na sve primenjene antibiotike, odnosno svi ispitani sojevi bili su rezistentni na najmanje jedan antibiotik. Značajno je naglasiti da su svi izolovani sojevi *E. coli* obuhvaćeni ispitivanjem bili osetljivi samo na amikacin. Distribucija rezistencije na antibiotike obuhvaćene ispitivanjem prikazana je na grafikonima 1 i 2.



Grafikon 1. Prikaz procentualne zastupljenosti rezistencije na pojedine antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

Graph 1. Graphic illustration of resistance to some antibiotics in *E. coli* strains isolated from piglets shown in percentage



Grafikon 2. Prisustvo multirezistentnih sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi /

Graph 2. The presence of multiresistant *E. coli* strains isolated from piglets

Legenda: AB – antibiotik; R – rezistentan / Legend: AB - Antibiotic; R - Resistant

Kod 89,58% izolovanih patogenih sojeva *E. coli* ustanovljena je rezistencija na tetraciklin i ampicilin. Slične rezultate rezistencije na antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od svinja dobili su u ranijim istraživanjima (Krnjaić, 2000; Ašanin i sar., 2004; Krnjaić i sar., 2005; Filipović, 2005; Mišić i sar., 2006; Gavrović, 2007). Ovo ukazuje na to da se kod sojeva *E. coli* izolovanih od svinja u Srbiji rezistencija na tetraciklin i ampicilin održava na gotovo istom nivou već godinama, što nije neobično s obzirom na to da se navedeni antibiotici u našoj zemlji intenzivno upotrebljavaju kod životinja u svim granama proizvodnje. Najniži procenat od 4,17% rezistentnih sojeva *E. coli* ustanovljen je na ceftriakson. Vrlo visoko prisustvo rezistencije kod 37,5% sojeva otkriveno je na ciprofloksacin što je veoma zabrinjavajuća pojava prvenstveno zbog opasnosti od širenja ovog oblika rezistencije (kako gena rezistencije, tako i rezistentnih sojeva bakterija) na populaciju ljudi, jer je u humanoj medicini ciprofloksacin jedan od najšire upotrebljivanih antibiotika. Međutim, ni ovakav nalaz nije neobičan s obzirom na to da je rezistencija na fluorokvinalone kod sojeva bakterija poreklom od životinja otkrivena na svim kontinentima, osim u Australiji gde je upotreba antibiotika ove klase kod životinja zabranjena. U naše ispitivanje su bila uključena i tri antibiotika koji pripadaju klasi aminoglikozida, najpre iz razloga što se aminoglikozidi intenzivno koriste, kako u lečenju ljudi, tako i u lečenju životinja. Visoke vrednosti MIC-a apramicina mogu ukazivati na prisustvo novog, navedenog i vrlo opasnog oblika rezistencije. U ispitivanjima osetljivosti 48 izolovanih sojeva *E. coli* na apramicin, kod čak 9 (18,75%) sojeva vrednosti MIC-a apramicina su bile izuzetno visoke i iznosile su više od 128 µg/mL, što je jasan znak da se može sumnjati i na prisustvo novog oblika rezistencije kod sojeva *E. coli* izolovanih od svinja na farmama u Srbiji. Na ovu pretpostavku može ukazivati i rezultat koji je dobijen ispitivanjem osetljivosti izolovanih sojeva *E. coli* na kanamicin. Čak 13 (52,08%) sojeva *E. coli* bilo je rezistentno na ovaj antibiotik sa vrednostima MIC-a od preko 256 µg/mL. Na gentamicin je bilo rezistentno 33,3% sojeva sa vrednostima MIC-a od 16 do 128 µg/mL. Da bi novi oblik rezistencije bio potvrđen neophodno je detektovati *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* i *npmA* gene primenom molekularnih metoda. Ipak, kako se aminoglikozidi već duži niz godina široko koriste u veterinarskoj medicini u Srbiji, nije isključeno da se radi o starim mehanizmima rezistencije na ove antibiotike. Najmanji procenat rezistentnih sojeva *E. coli* od 4,17% ustanovljen je na ceftriakson.

Zaključak / Conclusion

Visoke vrednosti MIC-a apramicina dobijene primenom veoma osetljive mikrodilucione metode u bujonu mogu ukazivati na prisustvo novog i vrlo opasnog oblika rezistencije na aminoglikozidne antibiotike. Međutim, da bi ovakva sumnja bila i potvrđena moraju se primenom molekularnih metoda detektovati i geni odgovorni za rezistenciju na aminoglikozide. Sigurno je da razlog za zabrinutost i dalje postoji jer od 400 izolovanih i ispitanih sojeva nije otkriven

nijedan soj koji je bio osetljiv na sve antibiotike, ali je rezistencija na ampicilin i tetraciklin ustanovljena kod čak 89,58% sojeva. Na ciprofloksacin je bilo rezistentno 37,5% sojeva, što je takođe zabrinjavajuće visok procenat jer je ciprofloksacin jedan od najznačajnijih antibiotika koji se koristi u humanoj medicini.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je podržan sredstvima projekta TP 20151 iz programa istraživanja tehnološkog razvoja finansiranog od strane Ministarstva nauke Republike Srbije.

Literatura / References

1. Alonso A, Sánchez P, Martínez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 2001; 3(1),1-9.
2. Ašanin R, Krnjaić D, Mišić D. Ispitivanje rezistencije izolovanih sojeva *E. coli* od teladi i svinja na antimikrobna sredstva. *Veterinarski glasnik* 2004; 58(5-6): 607-17.
3. Ašanin R, Mišić D, Krnjaić D. Značaj monitoringa rezistencije bakterija na antimikrobna sredstva. *Tehnologija mesa* 2005; 46(1-2): 75-80.
4. Bywater JR. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J Vet Med* 2004; 51: 361-3.
5. Catry B, Laevens H, Devriese LA, Opsomer G, de Kruif A. Antimicrobial resistance in livestock, 2003.
6. Dominguez L. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*, *Emerging Infectious Diseases*, 2005.
7. Fairbrother JM, Gyles CL. *Escherichia coli* infections: In, *Diseases of Swine*, by Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, Blackwell Publishing, 2006.
8. Filipović I. Ispitivanje rezistencije nekih patogenih bakterija izolovanih od domaćih životinja na području Crne Gore. Magistarska teza, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 2005.
9. Gavrović M. Ispitivanje osetljivosti nekih patogenih bakterija izolovanih od životinja na odabrane antibiotike i hemioterapeutike, Magistarska teza, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 2007.
10. Hariharan H, Coles M, Poole D, Page R. Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea. *Can Vet J* 2004; 45: 605-6.
11. Krnjaić D. Ispitivanje rezistencije bakterija izolovanih od domaćih životinja prema hemoterapijskim sredstvima. Doktorska disertacija, 2000.
12. Krnjaić D, Mišić D, Ašanin R. Investigation of sensitivity and resistance to antibiotics and chemiotherapeutics in *E. coli* strains isolated from animals bred in intensive farming conditions. *Acta Veterinaria* 2005; 55(5-6): 501-9.
13. Mišić D, Stošić Z, Kiškarolj F, Adamov V, Ašanin R. Ispitivanje multirezistencije *E. coli* i *Salmonella* koje potiču od domaćih životinja na antibiotike i hemioterapeutike, *Veterinarski glasnik* 2006; 60(1-2): 21-31.
14. Smith JT, Lewin CS. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. *Vet Microbiol* 1993; 35(3-4): 233-42.
15. Walsh C. Antibiotics: actions, origins, resistance. American Society for Microbiology Press, 2003.

THE INVESTIGATION OF NEW FORMS OF RESISTANCE TO SOME ANTIBIOTICS IN *E. coli* STRAINS ISOLATED FROM PIGLETS

Ružica Ašanin, M. Žutić, Jelena Ašanin, D. Mišić, Jadranka Žutić, Dobrila Jakić-Dimić, N. Milić, J. Nišavić

The resistance of bacteria poses a significant problem everywhere in the world, and consequently in our country as well. The non-critical use of antibacterial medicines in human and veterinary medicine has contributed to the spreading of this resistance. Due to the global importance of this problem, large numbers of states in the world are financing projects of which the objective is to follow and monitor bacterial resistance.

The objective of this investigation was to isolate and identify pathogenic strains of *E. coli* from piglets with clinically manifest diarrhoea and to examine the sensitivity of the isolated strains to a certain number of selected antibiotics. The material for these investigations were parts of intestines (jejunum, ileum) from piglets that died, rectal smears and feces of diseased piglets sampled pig farms in the vicinity of Bgrade.

Conventional methods of microbiological diagnostics were used for isolation, and conventional and commercial tests API 20E (bioMerieux, France) were used for identification. Following biochemical identification using hyperimmune serums for certain group (O) antigens: (O8, O138, O139, O147, O149, and O157), the serological typization of the strains was carried out.

Commercial antisera: T K88 (F4), K99 (F5), and 987P (F6), Toxigenic *E. coli* pili antisera, Denka Seiken Co. Ltd. Tokyo, Japan) were used to establish the presence and to identify fimbrial antigens-adhesins through slide agglutination reaction. The sensitivity of the antibiotics to the isolated strains of *E. coli* was examined using the disc diffusion method according to Kirby Bauer and the microdilution method in bouillon according to CLSI recommendations (2008). Examinations using the microdilution method in bouillon were performed with pure active antibiotic substances: ampicillin, apramycin, gentamicin, kanamycin, tetracycline, ceftriaxone, and ciprofloxacin (Sigma, USA). A total of 400 *E. coli* strains were isolated, including 48 *E. coli* strains that are within the category of pathogenic strains. Out of the total number of pathogenic strains of *E. coli*, 32 (66.67%) were found to be multiresistant to 3 or more than 3 antibiotics, and 16 (33.33%) pathogenic strains of *E. coli* were resistant to 2 or 1 of the examined antibiotics.

Resistance to tetracycline and ampicillin was established in 89.58% isolated strains of *E. coli*, and to ciprofloxacin in 37.5% strains. The lowest percentage of resistance to ceftriaxone was established in 4.17% strains of *E. coli*. The isolated strains of *E. coli* were also found to be resistant to certain aminoglycosides antibiotics. Thus, resistance to apramycin was established in 18.75% strains whose MIC values were higher than 128 µg/mL. Resistance to kanamycin was established in 52.08% strains of *E. coli*, and in these, 96.00% strains showed MIC kanamycin values of over 256 µg/mL. Resistance to the third aminoglycosides antibiotic, gentamicin, was established in 33.33% *E. coli* strains. All the *E. coli* strains that led to diarrhoea in piglets were resistant to at least two antibiotics, and more than 50% strains were found to be resistant to more than 3 antibiotics. It is significant to stress that all isolated strains of *E. coli* covered by these investigations were sensitive only to amikacyn.

Key words: pigs, *E. coli*, resistance, antibiotics

РУССКИЙ

ЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ФОРМ СОПРОТИВЛЕНИЯ К АНТИБИОТИКАМ У ШТАММОВ *E. coli*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПОРОСЯТ

Ружица Ашанин, М. Жутич, Елена Ашанин, Д. Мишич, Ядранка Жутич, Добрила Якич-Димич, Н. Милич, Я. Нишавич

Сопrotивление бактерий представляет собой значительную проблему всюду в мире, да и у нас. Расширению сопrotивления содействовало некритическое употребление антибактериальных лекарств в гуманной и ветеринарной медицине. Из-за актуальности проблемы большое число государств в мире финансирует проекты чья цель слежка и надзор над сопrotивляемостью бактерий.

Цель этого исследования была изоляция и идентификация патогенных штаммов *E. coli* из поросят с клинически манифестной диареей и испытание чувствительности изолированных штаммов на определенное число отобранных антибиотиков. Материал для этого испытания представляли собой части кишок (еюnum, илеум) из околелвших поросят, ректальные мазки и помёт заболелвших поросят, образчикованы на фермах свиней из окрестности Белграда.

Для изоляции пользованы классические методы микробиологической диагностики, а для идентификации классические и коммерческие тесты АПИ20Е (BioMerieux, Франция). После биохимической идентификации с помощью гипериммунных серумов для определенных групповых (O) антигенов (O8, O138, O139, O147, O149 и O157) совершена серологическая типизация штаммов.

Для утверждения присутствия и идентификации фимбриальных антигенов-адгезинов реакцией агглютинации на плите пользованы коммерческие антисерумы: K88 (F4), K99 (F5) и 987P (F6), *Toxigenic E. coli pili antisera*, *Denka Senken Co Ltd*. Токио, Японая. Чувствительность к антибиотикам изолированных штаммов *E. coli* испытана применением диск диффузионного метода по Кирбе Бауре и микродилуционного метода в бульоне по рекомендациям *CLSI* (2008). Испытание микродилуционным методом в бульоне совершено с чистыми активными субстанциями антибиотиков: ампицилина, апрамицина, гентамицина, канамицина, тетрациклина, цефтриаксона и ципрофлоксацина (Sigma, США). Совокупно изолировано 400 штаммов *E. coli*, из которых 48 распределено в категорию патогенных штаммов. Из совокупного числа патогенных штаммов *E. coli* у 32 (66,67%) установлено мультисопrotивление к 3 и больше 3 антибиотиков, а у 16 (33,33%) штаммов *E. coli* сопrotивление к 2 или 1 испытанным антибиотикам.

Сопrotивление к тетрациклину и ампицилину установлено у 89,58% изолированных штаммов *E. coli*, а к ципрофлоксацину у 37,5% штаммов. Наиболее низкий процент сопrotивления к цефтриаксону установлен у 4,17% штаммов *E. coli*. Присутствие сопrotивления у изолированных штаммов *E. coli* установлено и к некоторым аминокликозидным антибиотикам. Так сопrotивление к апрамицину установлено у 18,75% штаммов у которых стоимости MIC-а были больше 128 мг/мл. У 52,08% штаммов *E. coli* открыто сопrotивление и к канамицину, а из приведенного процента у 96,00% штаммов стоимости МИЦ-а канамицина составляли больше 256 мг/мл. Также, у 33,33% штаммов *E. coli* установлено сопrotивление и к третьему аминокликозидному антибиотикам гентамицину. Все штаммы *E. coli*, которые обуславливали диарею у поросят были супrotивляемые к меньше всего двум антибиотикам, а больше 50% штаммов открыто присутствие сопrotивления к больше 3 антибиотикам. Значительно подчеркнуть, что все изолированные штаммы *E. coli* охвачены испытанием были чувствительный только к амикацину.

Ключевые слова: свиньи, *E. coli*, антибиотики, сопrotивление