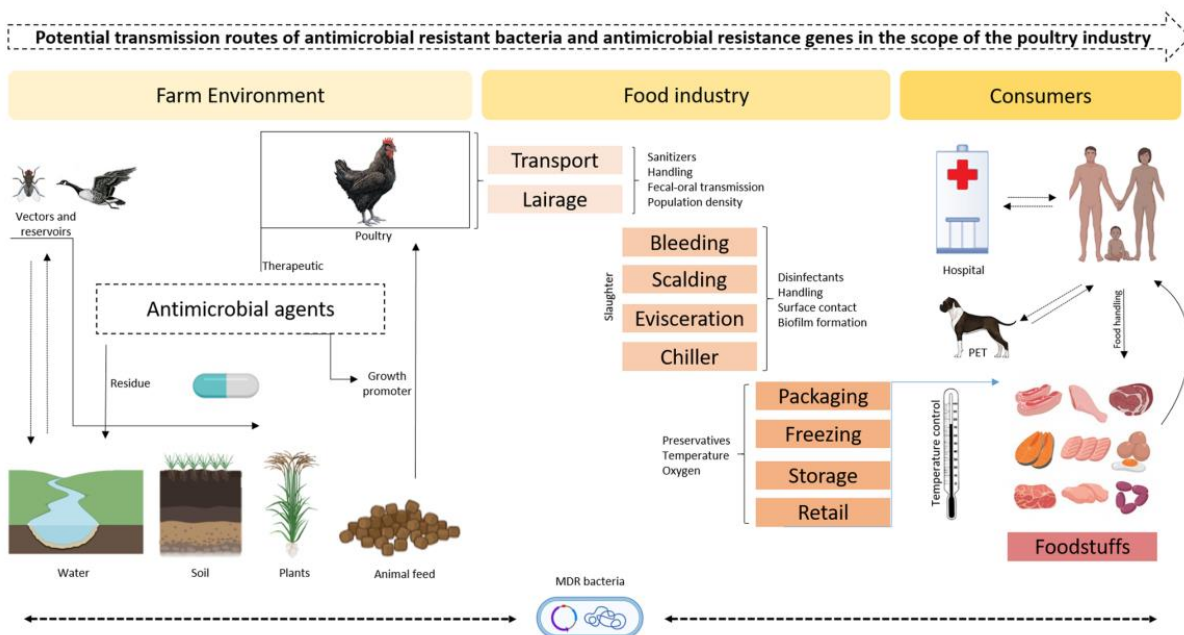




***S. Mbandaka* нов серовар, криещ рискове от инфекции. Характеристики и антимикробна резистентност на изолатите**

Негифоидната *Salmonella* е **основен хранителен патоген** (EFSA & ECDC, 2018a), който е отговорен за повече от един милион заболявания и 450 смъртни случая годишно само в Съединените щати (CDC, 2019). *S. enterica* може да бъде разделена на над **2500 признати серовари**, от които серовари Typhimurium и Enteritidis са най-честите причини за човешката салмонелоза (СЗО, 2019). Продуктите от свинско месо се считат за важни източници на салмонела (ЕОБХ и ECDC, 2018; СЗО, 2019), като разпространението на *Salmonella* в кланичните трупове на свине варира от 1,5% до 24% в зависимост от условията и практиките на обработка в животновъдството (Bersot et al., 2019; Bohaychuk, Gensler, & Barrios, 2011; Cabral et al., 2017; Kich et al., 2011; Pala et al., 2019; Pesciaroli et al., 2017).

Антибиотичната резистентност е призната като **глобален здравен проблем** и контролирането на разпространението и предаването му се счита за значително предизвикателство в световен мащаб (Ferri, Ranucci, Romagnoli, & Giaccone, 2017). Използването на антимикробни средства при животни за терапевтично лечение, профилактика и насърчаване на растежа може да увеличи селекцията и разпространението на резистентни на антибиотици бактерии в агрохранителната верига (Chantziaras, Boyen, Callens, & Dewulf, 2014; Magouras, Carmo, Stärk, & Schüpbach-Regula, 2017; Postma et al., 2016). Изчислено е, че **средното количество антибиотици в световен мащаб варира от 45 mg антимикробни средства (АМС) за всеки kg говеждо месо, 148 mg за всеки kg птиче месо и 172 mg за всеки kg свинско месо** (Van Boeckel et al., 2015). В Бразилия например Dutra et al. (2019) съобщават, че в производството на свинско месо са използвани най-малко седем антибиотици със средно 358 mg АМС на килограм свинско месо. С над два пъти увеличение на вложените антибиотици в глобален мащаб, се предполага, че антимикробно резистентни патогенни бактерии като *Salmonella* ще бъдат често срещани във веригата за производство на храни, както е наблюдавано в други държави (Barilli et al., 2018; Calayag, Paclibare, Santos, Bautista, & Rivera, 2017; Fois et al., 2017).



Фиг. 1: Схематично представени потенциални пътища на предаване на резистентни бактерии и гени, кодиращи резистентност

Салмонелозата е световен проблем както за животинското, така и за човешкото здраве. Неинформираната превантивна употреба на антибиотици в стадата и циркулацията на щамове с антибиотична резистентност от стадо на стадо е пречка за борбата със салмонелозата. Предаването на резистентни паратифоидни *Salmonellae* на хора чрез консумация на пилешко месо, яйца и пилешки субпродукти, които се приготвят при неподходящи условия или са недостатъчно термично обработени, води до трансфер на гени на резистентност към антибиотици. От изследваните на случаен принцип 362 фекални проби в проучване на тема „*Salmonella Serovars and Antimicrobial Resistance Profiles in Commercial Layer Flocks*” на авторски колектив Çokal, Y., Günaydin, E., Goncagül, G., Önat, K.; Gökmen, T.G. от Турция е установено, че 45 (12,4%) са положителни за *Salmonella*, като **най-често изолираните серовари са *S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. Enteritidis* и *S. Mbandaka***. Общо 45 изолати на *Salmonella* са тествани за чувствителност към 10 антибиотици чрез метода *Kirby Bauer* диск дифузия, като приблизително **53% са резистентни към един или повече антибиотици**. От тестваните антибиотици никой от изолатите не проявява резистентност към ципрофлоксацин и гентамицин, докато **най-високата резистентност е открита към тетрациклин**, а **най-ниската резистентност е определена към ципрофлоксацин**. Всички изолати на *S. Mbandaka* са определени като устойчиви единствено на канамицин. Останалите серовари са с мулти-лекарствена резистентност (MDR). В обобщение, налице е **необходимост от ефективни ваксинационни програми, предпазни мерки за биосигурност, както и прилагане на съзнателна употреба на антибиотици с цел защита както на продуктивните животни, така и на човешкото здраве**.

Разпространението на различните серовари и доминиращите *Salmonella* серовари варират в различните страни. *S. Kentucky* и *S. Typhimurium* в САЩ са съответно 62% и 66,7%. *S. Heidelberg* в Канада с 20 % и *S. Enteritidis* в Турция - 70,1%, са докладвани като

доминиращи серовари. В това проучване, както *S. Enteritidis*, така и *S. Kentucky* с 31,11% заболяемост са доминантни серовари, следвани от *S. Infantis* и *S. Mbandaka* с 26,66% и 11,11% заболяемост, които циркулират сред стада в *Bandirma*, регион *Marmara* в Турция.

Сред 5-те серовари, на които **ЕС отдава най-висок приоритет поради опасения за общественото здраве**, са *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*, *S. Infantis* и *S. Nadar*. *S. Mbandaka* е нетифоиден хранителен патоген, причиняващ диария с разнообразна гама от гостоприемници, включително хора. За първи път е изолиран в Р. Конго през 1948 г. По-късно той е **класифициран като един от десетте най-големи серовари, причиняващи салмонелоза при човека в Европейския съюз**.

Проучванията показват, че *S. Mbandaka* (клон ST413) може да оцелее повече от 15 години и успешно да се разпространи в стада от домашни птици, във фуражи, храни и накрая при хора. *S. Mbandaka* е представен като един от 10-те най-разпространени серовари в Полша след появата му при хората през 1997 г. В Австралия първото идентифициране на този серовар като причина за инфекция при човека е през 1978 г. По-късно през периода 1985-1996 г. са докладвани няколко огнища. В САЩ съобщенията за човешка епидемия, причинена от този серовар, са много редки. През 1999 г. една от най-големите епидемии, причинени от *S. Mbandaka*, се случва в Орегон, Айдахо, Вашингтон и Калифорния. При обследване на източника на това огнище кълнове от люцерна и непокълнати семена са идентифицирани като източник на инфекцията от ферма в Южна Калифорния. Анализът на данните за разпространението на болести, причинени от *Salmonella enterica* серовари и свързаните с тях хранителни матрици в Съединените щати през периода 1998-2008 г. от *Jackson et al.*, посочва, че **кълновете са често срещана хранителна матрица за *S. Mbandaka***. Неотдавнашните многонационални огнища на салмонела при хората (огнища от 2013г. и 2016г.) свидетелстват за епидемиологичното значение за този серовар. При проучването на огнищата е установено, че източниците на инфекция от 2013 г. и 2016 г. са съответно сусамов тахан и домашни птици от ферми тип заден двор. Този серовар е изолиран с подобна честота както в САЩ, така и в Обединеното кралство. **Говедата, пилетата и свинете са основният източник на изолация за *S. Mbandaka*** в САЩ с честота на изолация съответно 27%, 25% и 14%. Докато в Обединеното кралство, 65% от случаите са от птиче и 20% от говеждо месо. В Обединеното кралство *S. Mbandaka* е най-често изолираният серовар на *Salmonella* от фураж през 2013 г.

Резултатите от различни проучванията показват, че този патоген постоянно присъства в птичите стада в Турция. **Неподходящите хигиенни и санитарно-хигиенни мерки, неефективните и/или недостатъчни мерки за биосигурност и недостатъчната ваксинация излагат стадата на постоянна персистираща инфекция с *S. Enteritidis***.

Наличието на *S. Mbandaka* е докладвано в птичи стада и продукти от домашни птици по целия свят. В настоящото проучване процентът на *S. Mbandaka* при птичите стада не е изненадващ.

Въз основа на полско проучване следва да се има предвид, че поради тясната връзка между *S. Mbandaka* от човешки и птичи произход животните могат да бъдат **основен източник на инфекция при човека**.

Резистентността към антимикробни средства може да бъде резултат от многократна злоупотреба и поради това високото ниво на антимикробна резистентност на изолатите на *Salmonella* предполага безразборна и непрекъсната употреба на субтерапевтични дози от такива лекарства в търговски стада. Всички *S. Mbandaka* изолати са резистентни към К за разлика от резултатите от проучванията на *Im et al.*

Изолациите в това проучване серовари на салмонела при търговски стада предоставя полезна информация за бързото предприемане на ефективни и ефикасни превантивни мерки при стада от кокошки носачки в *Bandirma*. Спешната необходимост от програми за борба със салмонелозата трябва да се прилагат незабавно за ограничаване циркулацията на серовете *Salmonella*. Освен това моделите на антибиотична резистентност на серовете, по-специално MDR, при птичите стада в *Bandirma*, се считат за важни за общественото здраве поради използването на общи антибиотици за лечение при хора. **Предаването на устойчиви гени от птици на човек е сериозен проблем.**

В проучване на тема: „*Retrospective use of whole genome sequencing to better understand an outbreak of Salmonella enterica serovar Mbandaka in New South Wales, Australia*“ на *Cassia Lindsay, James Flint, Kim Lilly, Kirsty Hope, Qinning Wang, Peter Howard, Vitali Sintchenko, David N Durrheim* е изследван *Salmonella enterica* серовар *Mbandaka*, който е сравнително необичаен *Salmonella* серовар в Нов Южен Уелс (NSW) със средно 17 случая годишно през последните 10 години. Случаите на *Mbandaka*, докладвани в Австралия, са придобити от Индия, Африка, Индонезия, Мексико и Китай. В Австралия, *Salmonella ser. Mbandaka* е изолиран от храни като пиле, фъстъчено масло, пуешко месо и кърри на прах.

Целогеномното секвениране (WGS) е метод за типизиране и охарактеризиране на патогени с висока резолюция, който може да помогне на учените да разграничат спорадичните случаи на инфекция от тези, при които има огнища. WGS все по-често се използва в изпълнение на мониторинговите програми за надзор и за бърза и точна диагностика в общественото здравеопазване. Горесцитираното проучване е фокусирано върху потенциала на WGS при подпомагане на разследване на огнища от *Salmonella ser. Mbandaka* с ограничено географско разпространение.

През февруари 2016 г. е наблюдавано увеличение на циркулацията на *Salmonella ser. Mbandaka* в райони на NSW в Хънтър Нова Англия и Централното крайбрежие. *Mbandaka* серовар изолати, свързани с това огнище са сравнени с 10 човешки щамове от 2010 г. до 2015 г. и шест изолати от храни от 2012 г. до 2015 г. От 1 януари 2016 г. до 30 април 2016 г. са докладвани 29 случая на салмонелоза, причинена от *Salmonella ser. Mbandaka*.

Фиг. 2. Потвърдени случаи ($n = 29$) на *Salmonella ser. Mbandaka* в Нов Южен Уелс по клъстер и седмица на заболяването, 3 януари до 30 април 2016 г. Филогенетично дърво на изолатите *Salmonella ser. Mbandaka* в NSW

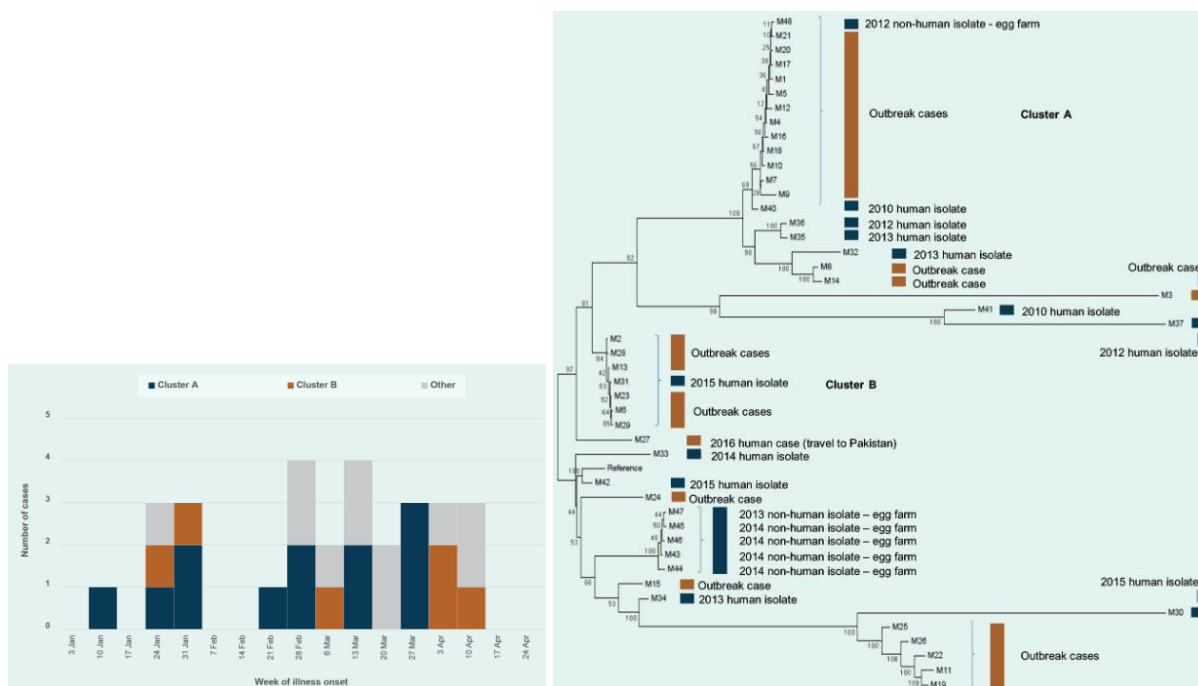


Таблица 1. Честоти на консумация на храни и по ключови клъстери, определени от WGS

Food Item	All cases			WGS – Cluster A			WGS – Cluster B			Reference*		
	Ate food	Total	%	Ate food	Total	%	Ate food	Total	%	Ate food	Total	%
Tomato	11	13	85%	9	9	100%	2	3	67%	497	665	75%
Carrot	12	16	75%	9	10	90%	3	4	75%	534	662	81%
Potato	10	14	71%	9	9	100%	1	3	33%**	546	667	82%
Onion	11	16	69%	8	10	80%**	3	4	75%	307	666	46%
Chicken pieces	11	16	69%	6	10	60%	3	4	75%	406	664	61%
Black pepper	11	16	69%	8	10	80%	3	4	75%	427	666	64%
Processed cheese	9	14	64%**	8	9	89%**	1	3	33%	149	665	22%
Free range eggs	7	11	64%	4	6	67%	2	3	67%	291	446	65%
Eggs (any)	7	11	64%	7	9	78%	3	4	75%	446	665	67%
Watermelon	10	16	63%**	8	10	80%**	2	4	50%	245	667	37%
Apple	10	16	63%	6	10	60%	3	4	75%	446	667	67%
Banana	10	16	63%	6	10	60%	3	4	75%	464	667	70%
Beef mince	8	14	57%	7	8	88%**	1	4	25%	332	663	50%
Green capsicum	8	15	53%	6	9	66%**	2	4	50%	209	667	31%
Grapes	8	15	53%	4	9	44%	3	4	75%	375	666	56%
Red capsicum	8	15	53%	6	9	67%	2	4	50%	304	667	46%
Broccoli	8	15	53%	6	9	67%	2	4	50%	348	665	52%
Cucumber	8	15	53%	5	9	56%	3	4	75%	383	665	58%

В международен план, WGS все повече се използва за засилено наблюдение и вземане на навременни мерки при борбата с патогенните причинители, пренасяни чрез храни, поради своята висока разделителна способност за типизиране на патогенните причинители и проследяване на източниците на инфекции, както и за определяне на генни локуси, кодиращи антимикуробна резистентност. **WGS също се използва за разбиране на пътищата за предаване на болести и определя механизмите на предаване на инфекцията, наблюдава развитието и адаптивните механизми на патогените, идентифицира инфекциите с епидемичен потенциал и спомага усъвършенстването на стратегиите за контрол.**

В САЩ и Европа WGS все по-често заменя конвенционалните методи в подтипизирането на пренасяните чрез храната патогени за наблюдение на огнища. WGS на хранителни патогени се е доказала като ценна методология при разследванията на епидемии за разграничаване на източниците на замърсяване. В държавите от

Европейския съюз и в Обединеното кралство **WGS** все повече се използва за **разследвания на огнища на болести, пренасяни чрез храни, и за наблюдение на инфекциозните болести** при животни и хора. В Австралия WGS се признава като **обещаваща алтернатива за типизиране на патогенните причинители**; въпреки това, тя все още не е широко разпространена поради ограничения в стандартизирания контрол на качеството и интерпретацията на данните, разходите и инфраструктурата.

Проучването на серовар Mbandaka е едно от първите в Австралия, които прилагат WGS към географски ограничен клъстер от *Salmonella*. Въпреки че WGS не е провеждан в реално време, неговият потенциал при обследване на огнище е доказан. WGS успява да разграничи случаите на огнище на *Salmonella ser. Mbandaka* в отделни групи от популацията и спорадични случаи. Данните от това проучване позволяват на изследователите да оценят очакваните честоти на консумация на конкретна храна в здрава популация и, използвайки биномни вероятности, да ги сравнят с честотата на консумация на определени храни при възникнали епидемии от хранителни заболявания. Този метод дава възможност за **бързо генериране на хипотези**, за да се предприемат по-нататъшни екологични и епидемиологични изследвания. В заключение, това проучване подчертава **потенциалната стойност на WGS за подпомагане на епидемиолозите да разследват сравнително малки епидемии от болести, пренасяни с храна в дадена общност**. Ако се провежда в реално време, WGS може да спомогне за откриването на потенциални източници на инфекция и да насочи по-нататъшните изследвания и да подпомага усилията за контрол.

През 1999 г. консумацията на кълнове от люцерна, замърсени със *Salmonella Mbandaka*, е довело до огнище на салмонелоза в много държави. В проучване на тема: „*Detection and Elimination of Salmonella Mbandaka from Naturally Contaminated Alfalfa Seed by Treatment with Heat or Calcium Hypochlorite*“ на Trevor V. Suslow, Jiangchun Wu, William F. Fett, Linda J. Harris, **партида семена от люцерна (№ 8119) е замърсена със *Salmonella Mbandaka* с честота на откриване приблизително 72% на 100 g семена**. С PCR анализи, *Salmonella Mbandaka* се открива при семена, съхранявани при 58°C в продължение на най-малко 11 месеца, но с все по-намаляваща честота. Използвайки конвенционални техники, жизнеспособни популации салмонели са открити при покълнали семена, съхранявани 8 месеца. Открито е, че обработка на семената с буферирани (до pH 7) и небуферирани **разтвори на калциев хипохлорид**, осигуряващи приблизително 2000 и 20 000 ppm свободен хлор, в продължение на 10 минути са еднакво **ефективни за елиминиране на жизнеспособните популации на *Salmonella Mbandaka***. Топлинна обработка до 858°C в продължение на 1 минута не елиминира естествено срещания се замърсител от семената. Намаляване на жизнеспособните колонии от 15% се наблюдава след топлинна обработка на 658°C за 6 min или 708°C за 4 min. Въз основа на тези резултати, топлинната обработка сама по себе си не изглежда алтернатива спрямо хлорирането като ефективен метод за елиминиране на салмонела от семената на люцерната.

Тези цитирани проучвания са още едно доказателство, че **салмонелозата, която се пренася чрез храната, е глобален проблем за общественото здраве**, който причинява ентерити както при хората, така и при животните. Повечето от патогенните серовари на *Salmonella* попадат в подвид *Salmonella enterica*, включващ повече от 50%

от общия брой идентифицирани *Salmonella* серовари. Всяка година се идентифицират нови серовари и **общата честота на салмонелоза може да прикрие случаите на епидемии, причинени от отделни серовари.**

Salmonella enterica серовар Mbandaka е един от рядко съобщаваните причинители на нетифоидна салмонелоза в САЩ. Но той е считан за **един от честите серовари на салмонела в други региони като европейските страни, Израел, Африка, както и в Нова Зеландия.** Публикуваните изследвания за този серовар са много ограничени и няма наличие на голям брой секвенирани геноми на изолати *S. Mbandaka*. **Знанието за структурата на популацията и вътрешно сероварното генетично разнообразие, което съществува в изолатите на *S. Mbandaka* в глобален контекст, остава загадка.**

Дисертационен труд на тема: „*Phylogenetic and associated phenotypic analysis of Salmonella enterica serovar Mbandaka*“ на Linto Antony има за цел да разбере структурата на популацията на глобално разпределените *S. Mbandaka* изолати с хипотеза, че изолатите на този серовар от различни географски райони могат да бъдат генетично близки и да образуват специфични кълъстери. Данните за геномната последователност на 465 изолата от различни части на света са събрани от базата данни на NCBI и са използвани за анализ. Филогенетичното дърво, създадено въз основа на SNP анализ, разкрива разделянето на изолати в **два основни кълъстера и шест подгрупи.** Образоването на кълъстери е валидирано чрез по-нататъшен MLST анализ. Това изследване има за цел да **разбере генния модел на антимикробна резистентност и разпределението на факторите на вирулентност в изолатите на *S. Mbandaka* от различни източници.** Анализът на способността за инвазиране на клетките на гостоприемника и устойчивостта към среда с ниско рН в 76 американски изолати не показва голяма разлика в тези фенотипни характеристики, независимо от източника на изолация. Като цяло това изследване осигурява **солидна платформа за епидемиологично изследване на бъдещи огнища на салмонела, причинени от серовар *S. Mbandaka*.**

В епидемиологично проучване на щамовете *S. Mbandaka*, изолирани от животински, фуражни и човешки източници в Полша, *Hoszowski et al* предполага, че *S. Mbandaka* е попаднал в стадата пилета чрез фуража и след това при човека чрез хранителната верига. По-късно в статия, *Hayward et al.* показва, че изолатите на *S. Mbandaka* във Великобритания са в една клонална линия, която има способността да образува биофилм при 25°C. Въз основа на тези констатации учените заключват, че **този серовар има висока адаптивност към оцеляване *ex vivo*.**

Не са налични много геномни изследвания или доклади специално за серовар *S. Mbandaka* и неговите щамове. Първата последователност на щамовете *S. Mbandaka* (два щамове - M1 и M2) е публикувана от *Hayward et al* през 2013 г. Това са британски щамове, изолирани от говеда през 2008 и 2009 г. Според това проучване **общата дължина на генома на M1 и M2 е 4,72Mb нуклеотиди с GC съдържание съответно 51,91% и 52,01%.** Броят на прогнозираните гени е съответно 4616 и 4619 гени. Важната характеристика, която се наблюдава в генома на тези изолати, е наличието на 860 kb инверсия на секвенцията, която кодира 909 гени, разположени между базови 1086415 и 1947250 M1, и 1132370 и 1992477 M2.

Широкомасштабният филогенетичен анализ на 78 серовари в *Salmonella enterica subsp. enterica* от Timme et al. показва две основни сестрински линии клейд А и клейд В. Има две подлинии в клейд А: А1 и А2. *S. Mbandaka* е групиран в подлинния А2 в близост до силен клъстер от изолати на серовар *S. Typhi* и *S. Paratyphi*. В друго проучване, включващо британски изолати на *S. Mbandaka* се съобщава, че тези изолати са съставени от една клонална линия. Както бе споменато по-рано, появата на секвениране от следващо поколение, направи възможно в глобален мащаб събирането на данни за геномните последователности на изолати *S. Mbandaka*. Това е първото проучване на докладвани филогенетични изследвания в световен мащаб на *S. Mbandaka* от различни части на света.

Salmonella Mbandaka, нетифоиден *Salmonella* серовар, е класифициран като един от десетте най-големи *Salmonella* серовари, причиняващи заболявания, пренасяни от човека в Европейския съюз. Доказано е, че **клонингите на този серовар могат да оцелеят в продължение на много години и да се разпространяват между различни гостоприемници, включително фуражи, животни, храна и хора**. Независимо от географското местоположение този серовар е идентифициран като причина за човешката салмонелоза в много страни, което прави **този серовар глобален проблем**. Разпространението при стадата продуктивни животни и способността да се предава чрез храна и потенциала за причиняване на заболявания при хората в световен мащаб, показва, че **този серовар представлява сериозен риск за здравето на хора и животни**.

Направени са много малко опити да се разберат геномните особености, както и структурата на серовар *S. Mbandaka*. Тези проучвания са ограничени до малък брой изолати от конкретен географски регион. Досега **не са провеждани проучвания в глобален контекст**, за да се направи извод за еволюционната история на този серовар. **Разбирането на филогенетичната структура и генетичното разнообразие между изолатите от серовара ще насърчи проследяването на бъдещи огнища**, причинени от този патоген.

Целта е да се отговори на следните въпроси, колко добре изолатите на този серовар са генетично различни, колко тясно са свързани тези изолати от различен географски произход, дали те показват някаква зависима от гостоприемника генетична връзка и ако има такава, генетично на какво ниво показват връзката или диференциацията, да се изясни генния профил на вирулентността и антимикробната резистентност на този серовар, за да се проучи потенциала на този серовар да засегне общественото здраве.

Филогенетичен анализ на *S. Mbandaka*

За да се изясни филогенетичната организация на серовар *S. Mbandaka*, са използвани данни от следващо поколение секвениране на 465 *S. Mbandaka* изолати, за да се изследва еволюционното генетично разнообразие на *Salmonella* серовар *Mbandaka*. Секвенциите за новосеквенирани 76 *S. Mbandaka* изолати от 9 различни северноамерикански държави и един южноамерикански щат са анализирани филогенетично заедно със секвенции от 388 изолати от различни части на света. Извършена е цялостна филогенетична характеристика, използвайки SNP анализ от

следващо поколение и cgMLST, за да се изясни еволюционната връзка на тези изолати в глобален мащаб. Получените филогенетични дървета са използвани за генериране на различни хипотези, свързани с еволюцията, разпределението на гостоприемниците и способността да причиняват човешки инфекции от различни източници.

Анализ, базиран на SNP

Общо **87 089 геномни SNP позиции са открити** чрез сравнение по двойки на всички *S. Mbandaka* изолирани геноми с референтния геном *S. Mbandaka str. ATCC 51958 (NBI Reference Sequence: NZ_CP019183.1)*. Подобни промени на нуклеотидите се наблюдават в геномните позиции (общо 85115) във всички 465 изолати. Филогенетичният анализ на данните по-горе от SNP анализа показва еволюционно дърво, състоящо се от два първични клъстера - „Клъстер 1„ и „Клъстер 2“. Идентифицирани са шест подгрупи в „Клъстер 2“ въз основа на тясната връзка между изолатите в контекста на източника на изолация и географския произход. Броят на уникалните SNP, които разграничават всеки клъстер, са идентифицирани чрез сравняване на представителни изолати от всеки клъстер.

Клъстер 1 се състои от 13 изолата, всички от които са събрани от един и същ географски район, Тексас САЩ. Тази група **включва изолати от говеда и от сурови яйца**.

Останалите 452 *S. Mbandaka* изолати съставляват **клъстер 2**. Тези изолати отново са групирани в 6 подгрупи във връзка с източника на изолация и географския район на изолатите.

Подгрупа 2А: Всички тези 29 изолати са от **домашни птици и/или продукти от тях - пилешко месо и яйца**. Други източници на изолация в този клъстер са **еднокопитни, свине, хора, фуражи за животни и източници на околната среда**. Общо **21 уникални SNP** са открити в този клъстер, които ги разграничават от подклъстер 2В, съдържащ предимно изолати от едър рогат добитък.

Подгрупа 2В: 50 изолата са включени **от говеда**, събрани от Тексас, САЩ през периода 2006-2007. Наблюдавани са **39 уникални SNP**, които разграничават този подклъстер. Изолатите споделят обща характеристика на източника на изолация - **говеда, говеждо месо или продукти от говеждо месо**. Две изключения са от свине или продукти от свине.

Подгрупа 2С: 28 изолата, получени от две различни групи източници на изолация, съставляват този клъстер. 71% от изолатите в този клъстер са получени **от хранителни стоки от Азия, Северна Америка и Европа**. Останалите 29% са **човешки изолати само от Европа**. SNP със 141 геномни позиции са открити в този клъстер. Независимо от географското местоположение, тези тясно свързани изолати *S. Mbandaka* **споделят общ произход**. Освен това групирането на тези генетично сходни изолати от хранителни стоки и човешки източници може да покажат **възможностите за предаване и потенциалната сила на свързаните с храната изолати Mbandaka, които причиняват салмонелоза при човека**.

Подгрупа 2D: 16 изолати, събрани от щата Тенеси на САЩ. Всички изолати в този клъстер са изолирани **от месни продукти, които включват пилешко, смялно говеждо месо и свинско месо**, събрани през 2008 г.

Подгрупа 2E: Съставен от общо 34 изолати, този клъстер се определя от **157 SNP**. Изолатите **от Великобритания** формират 70,5% от този клъстер, от които 23 са **човешки изолати и един от хранителни стоки**. Изолатите от азиатския континент са 29,5%, всички от които са получени от хранителни стоки. **Тясната генетична връзка на азиатските изолати от хранителни стоки и човешки изолати от различни географски места на Обединеното кралство** оформят особеностите на тази клъстерна формация. За този клъстер са идентифицирани **15 уникални SNP**, включително SNP в *carB* ген, който кодира голяма субединица на карбамоил фосфат синтетаза. Осем SNP включват последователностите за кодиране на MFS транспортера (*locus tag: SEEM1958_RS18305*), който придава **резистентност към антибиотик фосфомицин**, интегграза (*SEEM1958_RS17410*), *PhoPQ* регулационен протеин (*SEEM1958_RS12735*) и захарен ефлукс транспортер (*SEEM1958_RS12855*).

Подгрупа 2F: Това е географски добре дефиниран клъстер, включващ 43 от 47 мексикански изолати, споделящи **SNP в 136 геномни позиции**. Два изолата от Мичиган, един от Пенсилвания и един от Ню Мексико са останалите 4 изолата в клъстера. От 43 мексикански изолати, 29 изолати са групирани заедно според **общия им източник на изолация - папая**. Останалите 14 изолата в този клъстер са **изолирани или от храна, или от фураж за животни**. Общо **33 уникални SNP** са намерени.

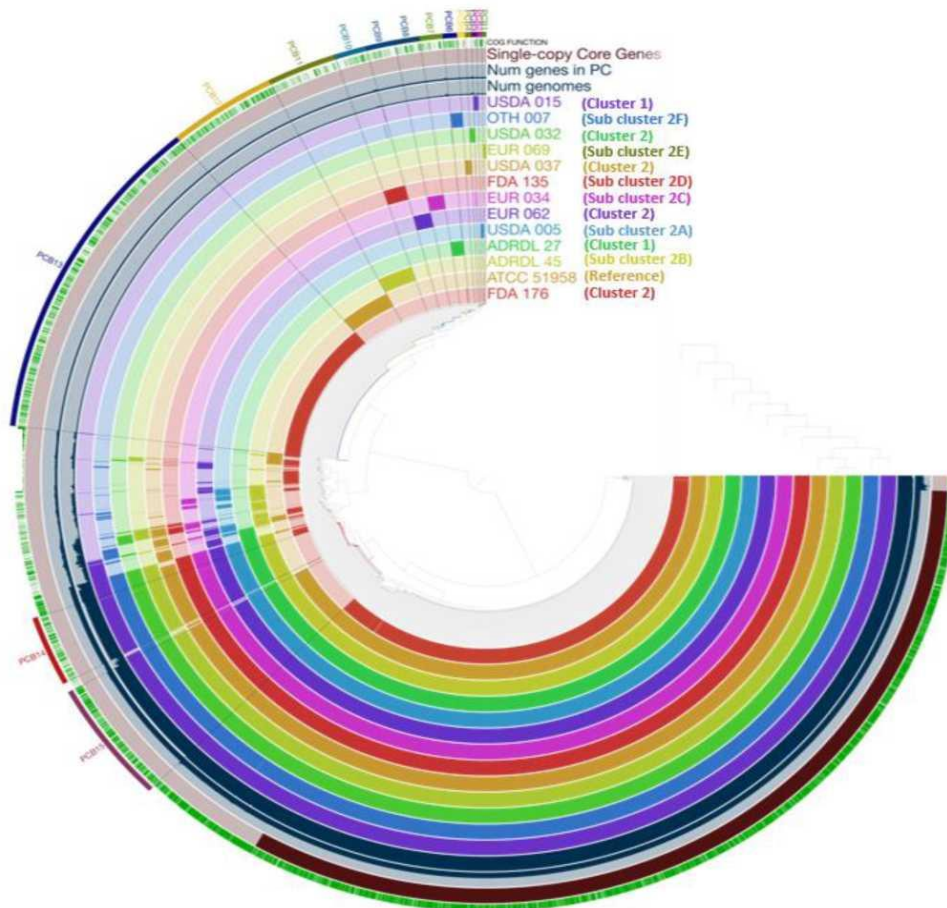
Извършена е допълнителна оценка с *cgMLST*, за да се валидират подгрупите на клъстерите, образувани в SNP анализа. За разлика от SNP базирания анализ, където секвентните четения са използвани за анализ на единични нуклеотидни вариации, *de novo* сглобени контиг последователности са използвани за *MLST* анализа. Вместо да се търсят нуклеотидни вариации в целия геном, вариациите в избраните целеви гени, които са общи за референтните, както и геномите на изолатите, са идентифицирани чрез *MLST* анализа. За изчисляване на разстоянието по *MLST* са избрани 2502 цели. Филтрирани са 399 секвенции на изолати, за да се генерира последователност, базирана на *MLST*.

Пангеномен анализ и протеин картиране на *S. Mbandaka*

Много по-голяма резолюция в анализа на интра сероварното генетично разнообразие на серовара *S. Mbandaka* се постига чрез анализ на пангенома и протеиновите клъстери въз основа на разпределението на наличието и липсата на гени между генома на изолата. За разлика от предишните методи за анализ, които се основават на нуклеотидни вариации или в геномните последователности, както SNP анализ, или *cgMLST*, **пангеномният анализ изяснява вариацията на геномното съдържание между изолатите. SNP и *cgMLST* анализът предоставят информация относно гени или последователности в сравнение с референтния геном и не дават информация за допълнителни гени, присъстващи или отсъстващи в проучваните изолати. Пангеномният анализ може да предостави информация за променливи гени, присъстващи във всеки изолат.**

Основният геном на *Salmonella* и пангеномът се оценяват съответно на **около 2800 и 10000 генни семейства**. Пангеномът на *Salmonella* е общата сума на стабилния геном на ядрото, както и изобилието от аксесоарен геном, включително SPI, плазмиди, фаги и транспонируеми елементи. Пангеномът също е описан като „допълнение“ на основния геном (ортолози, споделени между множество геноми) и променлив геном, който включва генни семейства, споделяни от два или повече организми и сингълтони (наричани гени, специфични за конкретни изолати, които нямат ортолози в съответните геномни последователности). Ортолозите са гени, които са еволюирали от прародителските гени, но поддържат подобна функция.

Дванадесет избрани изолирани геноми са избрани за анализ на пангенома заедно с ATCC 51958 референтен геном. *De novo* сглобени геноми във файлов формат FASTA са анализирани и са идентифицирани ексклузивни ортологични протеини във всичките тринадесет изолата, които са групирани в 13 PC Bins (Протеинови клъстерни групи - PCB). Този анализ разкрива **по-висока степен на придобиване на променливи гени в генома на изолатите салмонела, независимо от географския произход и източника на изолация**, което повишава общото генетично разнообразие в серовара.



Фиг. 3. Пангеномен анализ и визуализация на *S. Mbandaka* изолати. Външният кръг изобразява избрани протеинови клъстери. Вътрешният зелен кръг показва функциите на COG (Клъстер от ортоложни групи). Зеленият цвят в този кръг представлява известна функция, а бялото показва неизвестна функция. Следващите два кръга

показват хистограма на броя на гените в протеиновия клъстер и броя им в генома. Останалите кръгове показват генома на 13 *S. Mbandaka* изолати.

Филогенетичният анализ разкрива генетичното разнообразие и разделянето на изолатите на *S. Mbandaka* от подобен източник на изолация. Чрез прилагането на NGS, този научен труд представя обстоен филогенетичен анализ на изолатите *Salmonella* серовар *Mbandaka*. Пълната геномна секвенция на ATCC 51958 (NCBI: NZ_CP019183.1) с обща дължина 4,9 Mb е използвана като референтна последователност за сравнителен анализ. Сравнителният анализ с помощта на WGS позволява да се идентифицират два първични клъстера и шест подгрупи в структурата на този серовар. Клъстер 1 остава като периферна група, отличаваща се с 9 SNP от клъстер 2. Минималният брой нуклеотидни вариации на изолатите от клъстер 1 спрямо референтния геном, както и групирането на изолатите по отношение на източника на изолация и географския произход, могат да хвърлят светлина върху възможността тези изолати да са близки и върху еволюционния произход на серовара *Salmonella Mbandaka*.

Картографиране на гените на вирулентността

De novo сглобени 465 *S. Mbandaka* геномни последователности са анализирани за детерминанти на вирулентността чрез BLAST търсене в базата данни за факторите на вирулентност. Идентифицирането на факторите на вирулентност е извършено чрез *CLC Genomics Workbench (Version 9.5.3, Qiagen)* въз основа на параметрите на минимална идентичност на секвенцията от 90% и минимална дължина на секвенцията от 50%.

Като цяло **195 гени на вирулентност, групирани в 9 категории, са идентифицирани във всички изолати на *S. Mbandaka***. 49% от идентифицираните фактори на вирулентност принадлежат към групата ***Fimbrial Adherence Determinant (FAD)***, а 42,6% от гените са **свързани със секреторната система**. Девет гена (4,5%) са **плазмид кодирани гени**. От 196 гени, представени в базата данни, 63 гена са присъствали във всички 465 изолати. Наличието на 93 гени варира между 97,4% и 99,8% от изолатите. Един ген не е идентифициран в нито един изолат, докато останалите 39 гена са силно разнообразни в присъствието си.

Общо **97 детерминанти за FAD и 4 не-FAD детерминанти са идентифицирани**. Двадесет FAD гени са присъствали във всички 465 изолати. Тези двадесет FAD гени включват 6 *bcf*, 4 *csg*, 3 *fim*, 5 *stb* и 2 *std* гени. Повече от 99,5% от изолатите пренасят фактор на вирулентност *fim*, кодиран от 9 гени (*fimA*, *C*, *D*, *F*, *H*, *L*, *W*, *Y* и *Z*). Други фактори на вирулентност и гени, които са присъствали в повече от 97,4% от изолатите, включват фактори *Stj*, *Ste*, *Stf*, *Sth*, *Sti*, *Stk* и гени *bcfG*, *csgD*, *F*, *G*, *lpfA*, *B*, *C*, *E*, *stdA*, *tcfB* и *tcfC*.

Уникално присъствие на 8 FAD гени (*pefB*, *pefC*, *pefD*, *sefC*, *spvA*, *spvB*, *spvC* и *spvR*) е открито в човешки изолат (EUR 033) от Обединеното кралство. Други по-рядко срещани фактори на вирулентност са *sta*, *stc*, кодиран от гени *stcA*, *B*, *C* и *D* и *tcf*, кодиран *tcfD*, *tcfB* и *tcfC* гени.

Факторите на вирулентност, свързани със секреторната система, са 48,8% от идентифицираните във всички изолати. 39 от 84 гени са открити в $\geq 98\%$ от

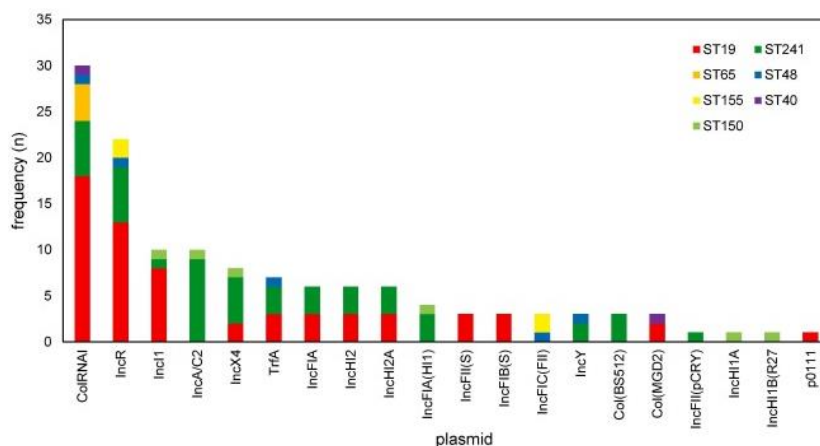
анализираните изолати, което предполага, че **повечето от гените в тази категория са силно запазени в изолатите на *S. Mbandaka***. Само четири гена (*sspH2*, *sopE*, *srfH* и *gogB*), кодиращи **три секреторни ефекторни протеини, показват големи вариации в тяхното присъствие**. Те са открити само в > 10 изолати с ген *gogB*. Гените за вирулентността, свързани със секреторните функции, са предимно от SPI-1 или SPI-2. Има 30 SPI-1 гени, кодиращи протеини от секреторна система тип III, които включват *hil* и *inv* гени, заедно с 10 *T3SS-1* ефекторни гени. От SPI-2 има 28 гени за T3SS и 15 за T3SS-2. Ген *SLRP* кодиращи ефектори, които са транслокирани чрез двете системи също са идентифицирани.

Има два гена на макрофага *mig14* и *mig5*, идентифицирани в изолатите от това проучване. Генът за вирулентност ***mig14***, който кодира транскрипционен регулатор, е **идентифициран в 463 *S. Mbandaka* изолати**. ***Mig5*** е плазмиден ген, който е **уникално идентифициран в човешки изолати**.

Два гена *mgtB* и *mgtC* са идентифицирани съответно в 464 и 465 изолати. Два гена, кодиращи субединиците на тифоиден токсин, също са идентифицирани в изолатите на *S. Mbandaka* (ген на вирулентност *cdtB* или *pltA*). Два фактора на вирулентност на *PhoPQ* са открити универсално във всички изолати.

Набор от пет FAD оперона (*bcf*, *csg*, *fim*, *stb* и *std*) са идентифицирани като често срещани вирулентни фактори, присъстващи в 465 *S. Mbandaka* изолати независимо от източника на изолация и географското местоположение. Установено е, че **някои от тези оперони (*Bcf*, *stb*, *std* и *stj* *fimbrial* *operons*) допринасят за чревната устойчивост и дългосрочното пренасяне на *S. Enterica* серотип *Typhimurium* при резистентни мишки**. **Всичките седем ORF в тези оперони са идентифицирани в > 97% от *S. Mbandaka* изолати**.

Наличие на вирулентни плаزمиди, не във всички изолати, е докладвано при няколко серовари на *Salmonella*, като серовар Abortusovis, Choleraesuis, Dublin, Enteritidis, Gallinarum/Pullorum, Paratyphi C, Sendai и Typhimurium. Всички вирулентни плазмиди съдържат *Salmonella* плазмиден вирулентен locus, силно запазен 8-kb регион. **Наличието на плазмидна вирулентност в този *spv* оперон, състоящ се от регулаторни *spvR* локуси и структурни *spvABCD* гени, е докладвано, че е достатъчно, за да се наблюдава системна инфекция при животински модели**. От петте плазмидни вирулентни гени *spvR* е транскрипционен активатор, който кодира положителен регулаторен протеин, необходим за експресията на *spvABCD*. От пет гена в *spv* локуса, четири от тях, *spvRABC*, са уникални за човешки изолати. Шест други плазмид кодирани гени (*pefB*, *pefC*, *pefD*, *sefC*, (*FAD*), *mig -5* (*MIG*) и *rck* (ген за резистентност) също са уникални за британски човешки изолати. Според *Feng et. al. Salmonella* сероварите придобиват вирулентни плазмиди главно **чрез вертикално предаване**, въпреки че съществуват изключения, както в случая с *Enteritidis*, където придобиването е хоризонтално. Ако вертикалната трансмисия е пътят на плазмидното придобиване, то **сравняването на вирулентните плазмиди между този и други серовари може да даде прозрения за източника на вирулентния плазмид и еволюционна информация за този серовар**. Тъй като наличието или липсата на плазмид играе роля в адаптацията към гостоприемника, сравнението между изолатите в този аспект може да разкрие и първоначалните причини за огнища.



Фиг. 4. Често срещани секвенирани плазмидни репликони, открити от PlasmidFinder в различни ST профили на изолати на *Salmonella enterica*

Baumler et. al. предполага, че наличието или отсъствието на тези FAD оперони може да е изиграло роля в адаптирането на някои серовари на *Salmonella*. В подкрепа на тази хипотеза, някои фактори на вирулентност (*cdtB*, *pltA* и *pltB*), които първоначално са били изолирани в *S. Typhi* вече са идентифицирани и в изолати на NTS серовари Montevideo, Schwarzengrund, Bredeney и 9,12:l,v: , доказано чрез сравнителна геномна хибридизационна техника (CGH). Голяма част от изолатите с *cdtB* ген са изолирани главно от проби от околната среда, с изключение на два izolata, което предполага разпространението на тифоиден токсин при *S. Mbandaka* изолати от околната среда и възможност за предаването му чрез хранителната верига на гостоприемниците.

Тиф колонизационен факторен (*tcf*) оперон също е описан и играе важна роля в спецификата на гостоприемниците на *S. typhi*. Този оперон е открит в *Salmonella* серовари Choleraesuis, Schwarzengrund и Heidelberg, Virchow и Montevideo в допълнение към *Typhi* и *Paratyphi*. ORF *tcfB* и *C* са идентифицирани в 98 % от изследваните изолати *S. Mbandaka*. Изолатите са събрани от фуражи и от почвата, което показва разпространението на щамовете *S. Mbandaka* в околната среда, като тези изолати съдържат генния набор, причиняващ тежки инфекции със *Salmonella*.

Модел на антимикробна резистентност

Всички 465 изолати в това проучване са подложени на секвениране на целия геном с късо четене. Минималният процент идентичност на последователността от $\geq 85\%$ и идентичността на дължината на последователността $\geq 50\%$ са критериите, използвани за идентифициране на детерминантите на резистентността. **Общо 376 (17,4%) гени на резистентност са идентифицирани** в 125 генома. Идентифицирани са гени, които придават резистентност към 9 различни класове антимикробни средства. Най-често срещаният ген е за тетрациклинова резистентност (*tetB*), последван от гени за резистентност към стрептомицин (*strA* и *strB*). Изолатите от птици съдържат най-голям брой, 246 детерминанти, за резистентност. Част от изолатите са идентифицирани с *qnrB* или *qnrS* хинолон резистентни гени.

Устойчивост на тетрациклин:

Гените *tetA*, *tetB*, *tetC* и *tetG* са единствените четири тетрациклинови гени, идентифицирани от 104 общи гени, налични в набора от референтни данни *ResFinder*. Тези гени участват в механизма на ефлукс помпата, който придава лекарствена резистентност на бактериите. Генът ***tetB*** е най-често срещаният сред всички изолати. *tetA* е най-често срещаният ген, придаващ резистентност към тетрациклин в Грам-отрицателните бактерии. Гени *tetC* и *tetG* са идентифицирани съответно в 7 и 1 изолати. Генът *tetB* е само с един-единствен АМР детерминант.

Аминогликозидна резистентност:

Общо 34 резистентни гени са открити в 64 резистентни щама. Гените ***strA*** и ***strB*** са най-често срещаните гени на резистентност, присъстващи в > 60% от устойчивите изолати, последвани от гени *aadA1*, *aadA2*, *aadA3*, *aadA12*, *aadA13*, *aadA15*, *aadA17*, *aadA21*, *aadA22*, *aadA23*, *aadA24*, *aadA8* и *aadA8b* (37%). Тринадесет устойчиви гени (***Ant(3')-Ib-aac(6')-IId***, ***aadA6***, ***aadA10***, ***aadA11***, ***aadA16***, ***aac(3)-Ib-aac(6,,)-Ib-aac(6'')-Ib-cr***, ***aac(3)-IIa***, ***aac(3)-IIc***, ***aac(3)-IId***, ***aac(3)-IIf***, ***aac(6')-Ib***, ***aac(6'')-Ib-cr*** и ***aacA4***), които образуват 38,2% от откритите гени на общата аминогликозидна резистентност, са уникални за турските изолати.

Устойчивост на беталактами:

Беталактам резистентни гени ***blaCARB1***, ***blaCARB2***, ***blaCARB3***, ***blaCARB4***, ***blaCARB6***, ***blaCARB11*** и ***blaCARB12*** са уникални за говежди изолати. Други по-рядко срещани гени за резистентност към бета лактами са *blaSEDI*, *blaCMY* и *blaTEM*.

Устойчивост на хинолони:

73 резистентни на хинолон детерминанти са идентифицирани в набора от изолати. Всички изолирани гени са *qnrB* гени, като изолатите са основно от хора, едър рогат добитък и изолати от околната среда. Шест гена (*qnrS1 - S6*) са уникално присъстващи в 6 човешки изолата от Обединеното кралство. *Qnr* гените са плазмидно медираны хинолонови детерминанти (*PMQR*), които са идентифицирани в няколко ентеробактерии, включително *Salmonella*. ***Aac(6')-Ib-cr*** детерминант е единственият ген за устойчивост на флуорохинолон, идентифициран сред всички изолати. Аминогликозид ацетилтрансфераза ***aac(6')-Ib-cr*** детерминант ацетилират няколко флуорохинолона и придават резистентност към АМС като норфлоксацин и ципрофлоксацин. Немалка част от човешките изолати от Великобритания са идентифицирани с хинолон резистентни гени.

Устойчивост на сулфонамид и триметоприм:

Три детерминанти на резистентност към сулфонамид, *sul1*, *sul 2* и *sul 3* са идентифицирани в общо 39 изолата. *Sul2* присъства в изолати от хора, едър рогат добитък и пилета. *Sul1* и *sul3* са идентифицирани в изолати от много различни източници. *Dfr12* е често срещан детерминант. Детерминанти *dfrA16*, *dfrA15* и *dfrA15b*, *dfrA27* и *dfrA28* са по-рядко идентифицирани.

Устойчивост на макролиди, фениколи и рифампицин:

Макролид резистентен детерминант *ereA* е идентифициран в говежди изолати и *mphA* е идентифициран в турски изолати от почва. Феникол резистентен детерминант *floR* е идентифициран често.

Резистентност към множество антимикробни средства е установена в изолати *S. Mbandaka*

Потенциалът на WGS за прогнозиране на антимикробната чувствителност на бактериите вече е описан в доста научни изследвания. Общо **376 гени**, които придават резистентност към **9 класа антимикробни средства**, са идентифицирани при 125 *S. Mbandaka* изолати. **65,6%** от изолатите показват резистентност към тетрациклин, последван от резистентност към аминогликозиди (52,8% изолати). Не малък брой проучвания и анализи разкриват резистентност на *S. Mbandaka* изолати към повече от три класа антимикробни средства. Не малка част от изолатите показват наличие на гени за резистентност срещу повече от три класа антимикробни средства и резистентност към повече от три класа антимикробни средства. За пример, един изолат от Турция носи **246 резистентни детерминанти**, свързани с резистентност към всичките **9 класа антимикробни средства**.

Разширен спектър бета лактамаза (ESBL) *CTX-2* е идентифициран в щам *S. Mbandaka*, изолиран от бебе, с намалена чувствителност към цефотаксим. В друго проучване *bla SHV-12*, ген на ESBL, който придава резистентност към цефалоспорини с разширен спектър, е идентифициран в *S. Mbandaka* изолат. Резистентността към цефтриаксон е сериозен проблем поради употребата му при лечението на салмонелоза при деца. При *Salmonella* резистентността към цефтриаксон се дължи главно на AmpC β-лактамаза (*blaCMY-2*) ген. Публикувани са четири *S. Mbandaka* изолати, съдържащи *blaCMY-2* гени, основно от птици и хора. Това обяснява разпространението на цефтриаксон резистентни *S. Mbandaka* изолати при хора, както и при продуктивни животни или животински продукти. Тези изолати съдържат общо **82 blaCMY** гени. CMY-β-лактаматази са цефалоспоринози, които могат да хидролизират всички β-лактами с изключение на карбапенемите. Повечето човешките изолати са β-лактаматаза продуциращи и са основно от Великобритания. От тези изолати голяма част имат хинолон резистентни гени, *qnrB* и *qnrS*. Това са PMQR гени, които придават резистентност чрез защита на ДНК гиразата и топоизомераза IV от инхибиране от хинолони. Първият доклад за PMQR е през 1998 г. в *Klebsiella pneumoniae* изолат от САЩ. QNR протеини, аминогликозид ацетил трансфераза *Aac(6')-Ib-cr* и ефлукс помпа протеин *QepA* са различните видове идентифицирани PMQR механизми.

Трите вида детерминанти на резистентност *qnr* са много добре обяснени в статия от *Cattoir et al, 2009* г. Хинолоните са широко използвани антиминобни средства както в хуманната, така и във ветеринарната клинична практика. Развитие на резистентност към хинолони при Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии ограничава употребата на хинолони за различни клинични приложения. **Безразборната употреба на антибиотици при животни се счита за една от основните причини за развитието на резистентни на хинолони бактериални видове, които могат да достигнат до човека чрез хранителната верига.**

Друг изключително притеснителен факт освен антиминобната резистентност, документиран в проучване на тема „*Endocarditis following Consumption of Cereal Associated with Salmonella enterica Subtype Mbandaka Outbreak*“ на авторски колектив *Jana K. Dickter, LiYing Cai, and David S. Snyder*, е усложнение от инфекция със ***Salmonella enterica* серовар Mbandaka, а именно ендокардит, свързан с огнище на инфекция, причинено от консумацията на зърнени култури.** Само от 2009 г. насам Националната медицинска библиотека на САЩ е регистрирала 1079 изолати на *S. enterica* серовар Mbandaka, взети от клинични и проби от околната среда от цял свят. На 18 май 2018 г. е докладван случай на огнище от серовар Mbandaka в САЩ, причинено от зърнени култури, които са били изтеглени от пазара. Изолатите от околната среда идват главно от животни, за които е известно, че са колонизирани със салмонела (птици, яйца, говеда и свине и месо от тях), но също така и от по-рядко описани при аквакултури, риба и морски дарове, при влечуги, коне, овце, кози, котки, кучета и вълци. Други хранителни източници на *Salmonella enterica* серовар Mbandaka включват плодове и зеленчуци, сусамово семе, фъстъци, шамфъстък, брашно и различни подправки.

Повечето хора, заразени със салмонелоза, развиват диария, треска и коремни болки след излагане на тези патогенни бактерии. **Симптомите обикновено продължават 4-7 дни и повечето пациенти често се възстановяват без антибиотично лечение.** Някои хора като например имунокомпрометираните лица са изложени на **по-висок риск от усложнения при тежко протичаща инфекция.** Описани са също и персистиращи инфекции с нетифоидна салмонела серовар Mbandaka. **Четири серовара във все повече проучвания се отбелязват, че са значително по-често срещани сред персистиращите инфекции, включително Mbandaka, Bredeney, Infantis и Virchow.** Това предполага, че специфични за сероварите генетични или екологични фактори допринасят за персистиращите инфекции при хората. Сърдечни заболявания се развиват **при 1 - 5% от пациентите със салмонелоза.** Те включват ендокардит, **аневризма, перикардит, стинит и дурални артериовенозни фистули.** При имунокомпрометираните пациенти с промени в локалния чревен имунитет се наблюдава по-лесно разпространение на *Salmonella* от червата към кръвния ток. *Salmonella* spp. има склонност да се загнездва в сърдечния ендотел и артериалните стени. Испанско проучване е установило, че **рискът от ендоваскуларна инфекция при пациенти с бактериемия, дължаща се на нетифоидна салмонела, е 23%.** Повечето пациенти, които развиват ендокардит при прекарана салмонелоза, имат и хронично сърдечно заболяване. В разгледания случай пациентът е имал по-висок риск от развитие на бактериемия, тъй като е имал GVHD. **Няма установени насоки за лечение на салмонелозен ендокардит.** Доказано е, че използването на ампицилин плюс тамидин

или цефалоспорици от трето поколение самостоятелно или в комбинация с гентамицин, са ефективни. Има и случаи, при които флуорохинолоните и цефалоспорици са били използвани успешно за лечение на няколко пациенти с ендокардит.

Съобщеният случай на пациент с усложнение ендокардит след инфекция със *S. Enterica* серовар Mbandaka, **подчертава още веднъж предизвикателствата, пред които са изправени медицинските специалисти при борбата и превенцията на тези инфекции, особено сред имунокомпрометираните гостоприемници.**

В предварителен доклад, публикуван в платформата WGS EFSA DB и изчакващ изготвяне на оценка на риска от EFSA/ECDC на база секвенирани геноми на изолати от серовар Mbandaka през 2021-2022г., са подадени случаи на *S. Mbandaka* при хора, докладвани на Европейската система за наблюдение (TESSy) от ДЧ на ЕС, в съответствие с Регламент (ЕО) № 851/2004 и Решение № 1082/2013/ЕС относно сериозните трансгранични заплахи за здравето.

Salmonella Mbandaka е докладвана като част от наблюдението на салмонелозата в ЕС/ЕИП. **Уведомяването за нетифоидна салмонелоза е задължително в повечето ДЧ на ЕС, както и в Исландия и Норвегия.** В четири държави членки докладването е доброволно (Белгия, Франция, Люксембург и Нидерландия). Съгласно законодателството на ЕС докладването на *Salmonella spp.*, изолати от хора, също е задължително. Системите за надзор на салмонелозата имат национално покритие във всички държави членки с изключение на три (Франция, Нидерландия и Испания). Броят на населението през 2020 г. се оценява на 48% във Франция и 64% в Нидерландия.

Между 2007 и 2021 г. **общо 3 329 случая на *S. Mbandaka* са докладвани на Европейската система за наблюдение (TESSy) от 27 държави от ЕС/ЕИП и Обединеното кралство.** Средният брой на случаите на година е **216.** Обединеното кралство представлява 24,3% от всички случаи, следвани от Германия с 21,2% и Франция с 13,2%. Сред случаите с известен статус (n=2 130), 62,9% се отчитат като вътрешно придобити инфекции. Сред внесените случаи с известна вероятна държава на инфекция (n=688), 19,2% съобщават за пътуване до Индия, а 17,6% съобщават за пътуване до Тайланд.

Броят на докладваните случаи е относително стабилен между 2007 г. и 2021 г., с изключение на забележителен връх в случаите през 2010 г. Това се дължи главно на увеличаването на случаите в Австрия поради избухването на хранителен взрив, свързан с яйца; разследванията на огнището са разкрили, че *S. Mbandaka* е постъпил в стадата от кокошки носачки чрез замърсени фуражи. През 2020 г. и 2021 г. на TESSy са докладвани съответно 96 и 97 случая. Това е значително по-малко от броя на случаите, докладвани през предходните години (средно 206 случая, докладвани годишно между 2015 г. и 2019 г.), и вероятно се дължи на пандемията от COVID-19. **През всички години на наблюдение *S. Mbandaka* се нарежда на 36-то място сред докладваните серотипове.**

Повечето от случаите (n=3 157) 53,3% са при жени. Сред домашно придобитите инфекции годишното преобладаване на жените е по-рядко, а между 2015 и 2020 г. случаите са по-често докладвани при мъжете, отколкото при жените. Има сериозни доказателства, че делът на жените във възрастовата група 45 - 65 години е значително

по-висок от този на мъжете. В периода между 2007 г. и 2021 г. 31,6% от случаите са докладвани през лятото/ранна есен (от август до октомври). Допълнителна информация може да бъде намерена в годишния епидемиологичен доклад на ECDC и в онлайн атласа за наблюдение на инфекциозните болести.

В проучване на тема: „*Animal feed contains diverse populations of Salmonella*“ на авторски колектив *Nikki W Shariat, Bryan R Larsen, Chery Schaeffer, Kurt E Richardson* е изследвано мьултисероварното разпространение на *Salmonella* сред популации продуктивни и целта на това изследване е да се определи дали положителни за *Salmonella* проби от фуражи също се състоят от мултисероварни популации.

Общо 50 положителни за *Salmonella* проби, събрани от 10 страни и са изследвани за различните серовари. Пробите включват 25 проби от фуражни добавки, 13 от цял фураж и 12 проби от прах от фуражните заводи. Пробите са анализирани чрез *CRISPR-SeroSeq*, за да се изследват различните серовари в отделните проби. Сероварите **Anatum** и **Mbandaka** са най-често идентифицираните и са открити във фуражите, фуражните съставки и фуражната среда. Идентифицирани са и серовари, често свързвани със заболяване при човека, и включват серовари **Enteritidis**, **Typhimurium** и **Infantis**. Като цяло са открити 12 различни серогрупи (37 различни серовара), с осем серовара, принадлежащи към O:7 серогрупа (C1). Над половината (56%) от пробите съдържат два или повече серовара, като в една проба са намерени 11 серовара. Съставките на фуража показват по-голямо разнообразие от серовари. В набогатени проби се наблюдава, че 83% от популациите на серовара са силно съвпадащи.

Представените данни в това проучване показват, че серовари, принадлежащи към O:7 серогрупа, обикновено се срещат във фуража и че фуражът може да съдържа множество серовари. Популациите на серовара в различни среди на *Salmonella* са до голяма степен сходни.

Наличието на *Salmonella* във фуражите се счита за важен път на предаване на този патоген в месото и птичите продукти и това проучване доказва, че фуражите за животни могат да съдържат множество серовари на *Salmonella*.

На 20 май 2022 г. Обединеното кралство (Обединеното кралство) е докладвало за група от 31 случая на *Salmonella* **Mbandaka ST413** от Англия (25 случая), Шотландия (3 случая) и Уелс (3 случая) с дати на изолация между 24 септември 2021 г. и 23 април 2022 г. (*EpiPulse ID 2022-FWD-00033*). От 13-те случая, за които е налична информация, четири (31%) са приети в болница и един случай е завършил летално. Обединеното кралство сподели със страните последователността на два представителни щам на огнища за сравнение с данните от последователността в националните бази данни.

Финландия докладва също за група от девет случая **S. Mbandaka** от различни региони между 19 април и 24 май 2022 г. (*EpiPulse ID 2022-FWD-00042*). Последвалият анализ от 20 юни потвърди, че групата от девет случая във Финландия е генетично близка до представителните изолати на щамове на огнището в Обединеното кралство. Тъй като Финландия и Обединеното кралство продължават да докладват нови случаи, което показва, че огнището е в ход, ECDC и ЕОБХ ще изготвят съвместно резюме на уведомлението и оценка на риска.

Двата представителни щама на огнище от Обединеното кралство се характеризират, както следва: *Salmonella* серовар Mbandaka, тип последователност (ST) 413, EBG (група e-BURST) 62, UKHSA и 5-SNP.

Прогнозни детерминанти на антимикробната резистентност са открити срещу следните класове антибиотици: **аминогликозиди** (*aac(6')-Iaa*) и **флуорохинолони** (единична мутация на гена *parC* [57:T-S], която не е задължително да доведе до резистентност). Фенотипни тестове не са извършени. Кодовете за присъединяване на изолатите от огнищата са: SRR16920742 и SRR19087024.

До 26 юли 2022 г. са докладвани 100 случая (88 потвърдени и 12 възможни) в шест държави от ЕС/ЕИП (**Естония, Финландия, Франция, Германия, Италия и Нидерландия**), **Обединеното кралство и Израел при хора**. Като цяло случаите се докладват във всички възрастови групи и няма разлика по пол.

Във Финландия повечето случаи се дължат на **консумация на пилешко месо** в различни ястия и в различни ресторанти. Пилешкото месо е от няколко различни производителя - Финландия, друга държава от ЕС, държава извън ЕС).

Обединеното кралство отчита по-високо ниво на заболяемост, пак причинена от птиче месо - **RTE пилешки продукти и не-RTE продукти от пилешко**. Повечето продукти са закупени от местни заведения и ресторанти. Към 28 юли 2022 г., чрез Системата RASFF не са предадени оригинални уведомления, свързани с това огнище.

Представителните необработени последователности от Обединеното кралство (2022-FWD-00033) и представителните изолати от Финландия (2022-FWD-00042), са анализирани от ECDC. Открити са по-малко от 2 702 (90%) от 3 002 основни локуса.

На 14 юли 2022 г., в контекста на събирането на данни от WGS, **ЕОБХ отправи покана за представяне на данни, като прикани държавите членки да представят на ЕОБХ геномна информация по системата One Health WGS system относно хранителни изолати на *S. Mbandaka***, събрана между януари 2021 г. и юли 2022 г., с акцент върху изолатите, от домашни птици, включително фуражите. До 21 юли 2022 г. **шест държави са отговорили: Австрия, Белгия, Франция, Германия, Ирландия и Литва**. Подадени са три геномни профила (една последователност от Австрия и две последователности от Германия).

Като цяло системата на **ЕОБХ One Health WGS съдържа 224 cgMLST геномни профили на изолати *S. Mbandaka* ST413**, от които 216 са от публично хранилище на европейски нуклеотиден архив (ENA), а осем са събрани от ЕОБХ в контекста на „огнище в много държави на множество серовари на *Salmonella enterica*, свързани с вносни продукти, съдържащи сусам“. Сравнението по двойки с референтния щам на огнището с код за присъединяване SRR16920742, не показва съвпадение с наличните геномни профили.

Интервютата на случаи във Финландия и Обединеното кралство показват, че **консумацията на различни видове пилешки продукти RTE и non-RTE обикновено са хранителната матрица на разпространение на този серовар**. Според базата данни на ЕОБХ за зоонозите в рамките на Директива 2003/99/ЕО за зоонозите „**Месо от бройлери (*Gallus gallus*)**“ е най-често срещаната храна, заразена с *S. Mbandaka*, докладвана на ЕОБХ от държавите членки на ЕС през последните 5 години. 49 от общо

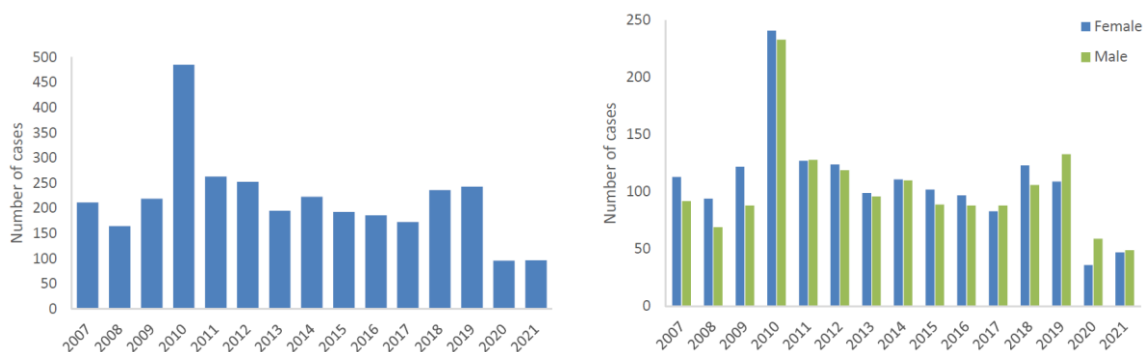
72 единици са положителни за *S. Mbandaka* в матрицата „non-RTE Food,, (62 454 изпитвани единици), като включват матрицата „месо от бройлери (*Gallus gallus*)“.

Въз основа на наличната информация е докладвано, че **домашните птици са микробиологично свързани с човешки инфекции *S. Mbandaka* ST413.**

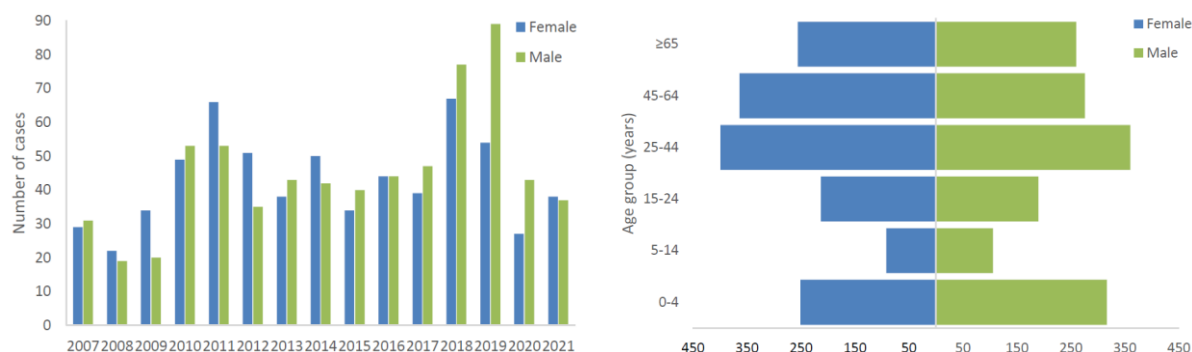
Сравнението по двойки на представителния щам от огнището с геномните профили на *S. Mbandaka* ST413 от изолати, различни от човешките включително вносните продукти със сусам, не показва съвпадение. Това показва, че **щамът *S. Mbandaka* ST413 в този случай е различен от този, установен при наскоро докладваното трансгранично огнище, свързано със сусам.** Имайки предвид летния сезон с по-високи температури, улесняващи растежа на салмонела и увеличените честоти на консумация на пилешко, **вероятно ще се появят нови инфекции.** **Необходими са допълнителни проучвания в секторите на общественото здраве и безопасността на храните, за да се провери тази хипотеза и да се проследи произходът/източникът на замърсяването.**

ECDC и EFSA насърчават държавите членки да секвенират *S. Mbandaka* изолати от хора и храни, свързани с настоящия клъстер, както и да предоставят микробиологични и епидемиологични данни и то с акцент върху различни продукти от птиче месо, фуражи, животни и изолати от околна среда. Препоръчват се допълнителни разследвания в сътрудничество с органите по безопасност на храните съобразно стратегията „Едно здраве“.

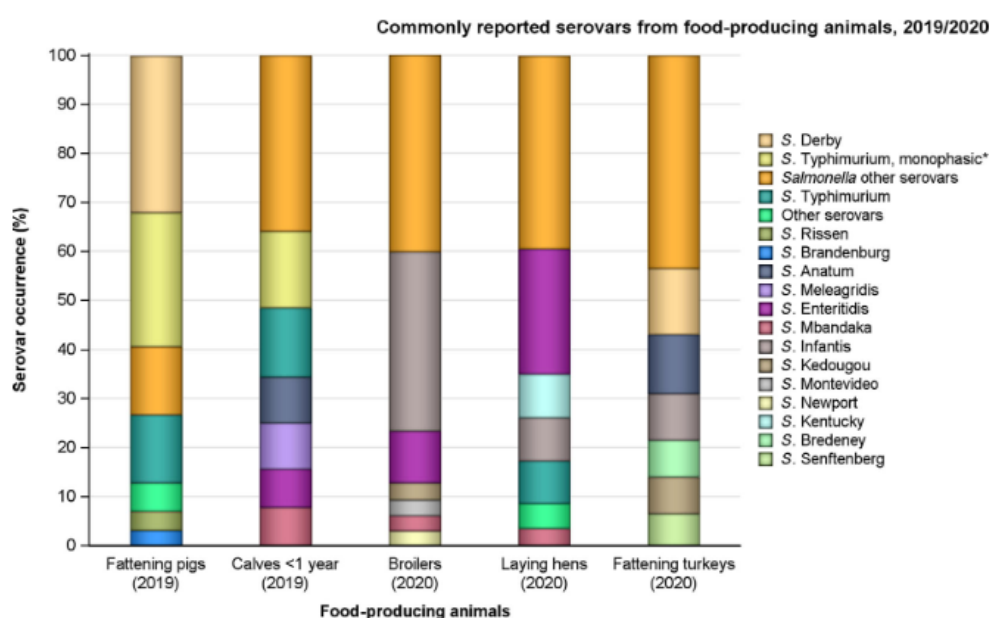
От 2016 г. до 2020 г. в съответствие с Директива 2003/99/ЕО за зоонозите, Испания през 2016 г. и Словакия през 2018 г. са съобщили за две огнища, причинени от *S. Mbandaka*. Хранителните матрици са „неизвестни“. Докладвани са общо 13 случая при хора (11 случая в Испания и два в Словакия). През 2018 г. една държава извън ЕС (Сърбия) съобщава за наличието на **сериозна хранителна епидемия**. Хранителната матрица, което „разпространява“ инфекцията е „**яйца и яйчни продукти**“. Има осем докладвани случая. Сред докладваните огнища няма хоспитализирани пациенти и няма смъртни случаи. Проучване на тема „*Genomic Characteristics of Colistin-Resistant Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Infantis from Poultry Farms in the Republic of Serbia*“ - Branko Jovčić, Katarina Novović, Brankica Filipiћ, Maja Velhner, Dalibor Todoroviћ, Kazimir Matoviћ, Zoran Rašiћ, Sonja Nikoliћ, Ferenc Kiškarolj and Milan Kojiћ ясно описва тези изолати.



Фиг. 3 Разпределение на случаите на *S. Mbandaka* по година и по пол в ЕС/ЕИП и Обединеното кралство (до 2019 г.), 2007-2021 г.



Фиг. 4 Разпределение на местно придобитите инфекции на *S. Mbandaka* по пол, възраст и година в ЕС/ЕИП и Обединеното кралство (до 2019 г.), 2007-2021 г.



Фиг. 5 Често докладвани серовари на *Salmonella* при продуктивни животни съгласно последният доклад на ЕОБХ за зоонозите и зоонозните причинители и антимикробната резистентност за 2020г.

Всяка държава членка има специфични данни за появата на *S. Mbandaka* за матриците „RTE храни,“ и „non-RTE храни“ за периода 2016 - 2020 г., докладвани на ЕОБХ в съответствие с Директива 2003/99/ЕО за зоонозите. **През тези пет години 74 положителни единици за *S. Mbandaka* от общо 62 846 изследвани единици (0,11%) са докладвани на ЕОБХ за матриците „RTE храни,“ и „non-RTE храни“ от 14 ДЧ на ЕС (Австрия, Белгия, България, Хърватия, Чехия, Дания, Естония, Франция, Унгария, Италия, Латвия, Нидерландия, Полша и Словакия).**

Двете положителни единици за *S. Mbandaka* от общо 392 тествани единици (0,51%) за матрицата „RTE храни,“ са докладвани от една ДЧ на ЕС (Унгария), и принадлежат към „Други преработени хранителни продукти и приготвени ястия“

(докладвани през 2017 г. и 2020 г.). 72-те единици положителни за *S. Mbandaka* от общо 62 454 изследвани единици (0,11%) за матрицата „non-RTE храни“ принадлежат към следните матрици: 49 единици с положителен резултат от „Месо от бройлери (*Gallus gallus*)“ (от Австрия през 2018 г. и 2019 г., и от Белгия от 2016 г. до 2019 г., от Хърватия през 2018 г. и 2019 г., от Чехия през 2018 г., от Италия през 2020 г., от Латвия през 2019 г., от Нидерландия от 2017 г. до 2020 г., от Полша през 2018 г. и от Словакия през 2017 г.); **шест единици с положителен резултат от „свинско месо“** (една единица, докладвана от **България през 2018 г.** (не е проведен секвентен анализ), от Дания през 2019 г., от Естония през 2016 г., от Франция през 2019 г., от Италия през 2018 г.); пет единици с положителен резултат от „Месо от едър рогат добитък“ (от Естония през 2018 г., от Франция през 2019 г., от Унгария през 2020 г. и от Италия през 2020 г.); четири единици с положителен резултат от „Месо от други животински видове“ (от Хърватия през 2018 г., и от Италия през 2017 г., 2018 г. и 2019 г.); три единици с положителен резултат от „Месо от бракувани кокошки“ (от Белгия през 2018 г.); две единици с положителен резултат от „Месо от патици“ (от Дания и Унгария съответно през 2019 г. и 2017 г.); две единици с положителен резултат от „Други преработени хранителни продукти и приготвени ястия“ (от Нидерландия през 2017 г.); една единица е положителна от „Месо от домашни птици, неуточнено“ (от Полша през 2019 г.).

Изводи, заключения и препоръки:

Изводите са, че *Salmonella enterica* серовар Mbandaka (*Salmonella ser.* Mbandaka) е адаптирана към множество гостоприемници нетифоидна салмонела (NTS), която крие висок риск от причиняване на хранителни заболявания при хората. Огнища на *Salmonella ser.* Mbandaka са допринесли за големи икономически загуби и здравен риск за хора и животни поради персистиращи или тежко протичащи инфекции. Целогеномното секвениране (WGS) и филогенетичния анализ улесняват по-доброто разбиране на геномните характеристики, които могат да ускорят разпространението на *Salmonella ser.* Mbandaka.

Филогенетичен анализ на *Salmonella ser.* Mbandaka, използвайки подход, базиран на *Bayesian* моделиране, не показва във всички цитирани проучвания специфичен спрямо гостоприемника или географското разпределение модел, но **показва тенденция в модела на инвазия, вирулентността и адаптирането към среда с ниско рН.** Както генотипният, така и фенотипният анализ разкриват **пренасянето и циркулацията на гени на мултилекарствена резистентност (MDR) в *Salmonella* серовар Mbandaka.** Повечето резултати от проучванията показват, че наличието на мултилекарствена резистентност, заедно с адаптиране към широк спектър от гостоприемници и еднородност в потенциала за вирулентност, се наблюдава при не малка част от изолатите *Salmonella* серовар Mbandaka от всеки източник и разкриват **потенциала на този серовар да причини хранителни огнища, както и да разпространи гени/плазмиди, кодиращи AMP.**

Проследявайки всички достъпни данни последните две десетилетия *Salmonella* остава един от основните хранителни патогени според докладите на Центъра за контрол и превенция на заболяванията (CDC). Смята се, че нетифоидната *Salmonella*

(NTS) причинява **1 милион хранителни заболявания годишно**. *Salmonella enterica* подвид *Enterica* серовар Mbandaka е идентифициран от CDC като **важен серовар, причиняващ огнища на салмонелоза**. Класифициран като **един от десетте най-големи серовари на *Salmonella*, които причиняват заболявания, пренасяни от човека**, в Европа, серовар *Salmonella* Mbandaka (тип ST413) е в състояние да оцелее в продължение на много години и се изолира от фураж, смески за домашни птици и **разнообразни хранителни матрици**. *Salmonella* ser. Mbandaka е докладван като причина за човешка салмонелоза в няколко страни, което прави **този серовар от световно значение за здравето на хората и животните**.

Въз основа на събрани данни от няколко източника, *Hayward et al.* съобщава, че **говедата, домашните птици и свинете са основните гостоприемници на *Salmonella* ser. Mbandaka**. Източниците на две от горепосочените огнища обаче са от хранителни продукти, което показва **разпространението на този многогостоприемников серовар чрез други пътища и механизми**.

Въпреки че *Salmonella* ser. Mbandaka е участвал в няколко сравнителни проучвания, неговите **епидемиологични и еволюционни характеристики не са напълно разбрани**. Сравнителният геномен анализ е все по-широко използван като мощен инструмент за изясняване на геномното разнообразие между сероварите на *Salmonella*, както и за епидемиологично изследване на огнища. Необходими са **допълнителни проучвания на изолати *Salmonella* посредством молекулярно биологични методи, с цел бърза диагностика, вземане на адекватни и навременни мерки и решения, свързани с контрола и намаляване разпространението на този патоген**. Изводът е, че серовар Mbandaka е важен зоонозен патоген, който все по-често се докладва в държавите от ЕС и в световен мащаб и поради високата си вирулентност, високата адаптивност към различни гостоприемници и поради високата му устойчивост, а и не на последно място наличието на гени или плазмиди, отговорни за резистентността му към не един клас АМС **крие риск за здравето на хора и животни**.

Генотипните характеристики и наличието на гени, отговорни за AMP на *Salmonella* ser. Mbandaka в глобален аспект са изследвани посредством WGS анализ, като този анализ потвърждава отново, че **ST413 е една от най-често срещаната салмонела**. Извършеният cgMLST анализ на геномната мултилокусна последователност посредством инструмента „SISTR“ показва, че **най-срещаният тип ST в *Salmonella* ser. Mbandaka е ST413 (93% от изолатите), следван от ST1602 (5% от изолатите)**. **ST413 показва глобално разпространение**, докато други са ограничени до определени географски райони. Например **ST1602, ST2238 и ST2444 са доказани само в европейски или азиатски изолати**, докато ST2404 е открит само в северноамерикански изолати. **ST143 показва широк обхват на възприемчивите гостоприемници и видове хранителни източници**, докато за други ST от този серовар е установено по-висока специфичност спрямо източника.

Съблюдавайки всички налични данни специфичността на гостоприемника и причиняването на инфекция на видовете *Salmonella enterica* са серотипно зависими. Някои серотипове са „хост-ограничени“, т.е. те са в състояние да заразят само един конкретен гостоприемник; други като *Salmonella* ser. Mbandaka има широка гама

гостоприемници. В допълнение към хората и селскостопанските животни, основните източници на *Salmonella ser. Mbandaka* са кучета, диви птици и риби. Според докладите за зоонозите на ЕОБХ и ECDC, *Salmonella ser. Mbandaka* произхожда както от живи животни, така и от храни. Адаптацията на ST413 спрямо източници като фураж, животни, храна и хора подпомага неговото оцеляване в хранителната верига и прави *Salmonella ser. Mbandaka* **сериозна заплаха за възникване на взривове от хранителни заболявания.**

Генът *tet(B)*, който придава резистентност към тетрациклиновата група антибиотици, е **най-разпространен** и се намира в 10,66% от генома, последван от два аминокликозидни гена за резистентност *aph(6) -Id* и *aph(3') -Ib*, които присъстват процентно съответно 8,93% и 8,68% в генома. **Идентифицирани са изолати носещи устойчиви гени срещу хинолони, линкозамид, блеомицин и рифампицин. Повече от 60% от изолатите показват резистентност към поне един антибиотик.** По-голямата част от резистентността е наблюдавана срещу стрептомицин (62%) и тетрациклин (9%). Има изолати, които показват резистентност (междинна) срещу цефокситин, хлорамфеникол и сулфонамид.

S. Mbandaka was the 34th most common serotype in the EU/EEA in 2015-2019. It was reported by 24 EU/EEA countries with an annual case number of 162-209 confirmed cases per year. The UK, Germany and France accounted for 30%, 17% and 16%, respectively, of the cases in this period. Most cases were in persons 25-44 years (24%) followed by adults 45-64 years (22%) and over 65 years (19%) old. There was no difference between genders. Travel information was available for 71% cases and of these, the majority (67%) were domestically acquired. Thailand, India, and Egypt accounted for 24%, 19% and 7%, respectively, of the travel-associated cases. ”

During these five years, two weak-evidence food-borne outbreaks caused by **S. Mbandaka** were reported by Spain in 2016 and Slovakia in 2018. The reported food vehicles were '**Unknown**'. In total, 13 human cases were reported (11 cases in Spain and two in Slovakia). One non-EU country (Serbia), reported one strong-evidence food-borne outbreak in 2018. The reported food vehicle was '**Eggs and egg products**'. In total there were eight cases, no hospitalised patients, and no deaths. ”

During these five years, 101 units positive for **S. Mbandaka** out of 59 599 total units tested (0.16%) were reported to EFSA for the matrix '**Food RTE and non-RTE**' by 18 EU Member States (Austria, Belgium, Bulgaria, Croatia, Czechia, Denmark, Estonia, France, Greece, Hungary, Italy, Latvia, the Netherlands, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, and Spain) and by two non-EU Member States (Switzerland and the United Kingdom).

The two units positive for **S. Mbandaka** out of the 233 total units tested (0.85%) for the matrix '**Food RTE**' were reported to EFSA by one EU Member State (Hungary) and belonged to '**Coconut - coconut products**' (reported in 2015) and '**Other processed food products and prepared dishes**' (reported in 2017).

The 91 units positive for **S. Mbandaka** out of the 58 799 total units tested (0.15%) for the matrix '**Food non-RTE**' belonged to the following matrices: '**Eggs and egg products**' (two units reported by Hungary in 2015, one unit by Spain in 2015, and one unit Portugal in 2015); '**Meat from bovine animals**' (one unit reported by Romania in 2015, one unit by Estonia in 2018, and two units by France in 2019); '**Meat from broilers (*Gallus gallus*)**' (two units from Austria in 2018 and 2019, 26 units from Belgium from 2015 to 2019, four units from Croatia in 2018 and 2019, three units from Czechia in 2015 and in 2018, one unit from Latvia in 2019, seven units from the Netherlands in 2017, 2018, and 2019, seven units from Poland in 2018, one unit from Romania in 2015, and one unit from Slovakia in 2017); '**Meat from duck**' (two units reported by Denmark and Hungary in 2019 and 2017, respectively); '**Meat from other animal species or not specified**' (one unit reported by Croatia in 2018 and three by Italy in 2017, 2018, and 2019); '**Meat from pig**' (one unit by Bulgaria in 2018, one unit by Demark in 2019, three units by Estonia in 2015 and 2016, two units by France in 2019, one unit by Italy in 2018, one unit by Romania in 2015); '**Meat from poultry, unspecified**' (two units by Belgium in 2015 and one unit by Poland in 2019); '**Meat from spent hens**' (eight units reported by Belgium in 2015 and 2018); '**Meat, mixed meat**' (one unit reported by Romania in 2015); '**Other processed food products and prepared dishes**' (two units reported by the Netherlands in 2017); and '**seeds, dried**' (two units reported by Greece in 2015).

In addition, eight units positive for **S. Mbandaka** out of 567 total units tested for the matrix '**Food non-RTE**' were reported to EFSA by the two non-EU countries (Switzerland and the United Kingdom). and belonged to the following matrices: '**Meat from broilers (*Gallus gallus*)**' (two units reported by Switzerland in 2015 and one ”

Цитати от годишните доклади на EFSA и ECDC относно разпространението на Salmonella серовар Mbandaka

Употребата на антибиотици по цялата агрохранителна верига осигурява основен принос за цялостният проблем с антибиотичната резистентност. Поради широкото използване на антимицробни средства в животновъдството, резистентни щамове *Salmonella* все по-често се срещат при продуктивните животни. WGS е отлична техника за прогнозиране на АМР поради високата информативност, бързите резултати и все по-увеличаващата се достъпност. Доказано е, че той е успешен метод за прогнозиране на генотипна АМР в патогени, включително *Salmonella*. Проучвания

гр. София, 1618, бул. ”Цар Борис III” № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056

върху ефективността на WGS също така показват **висока чувствителност и специфичност за сравнение на генотипно прогнозирана - с фенотипна резистентност** към повечето антимикуробни средства.

Плазмидите са едно от основните средства за разпространение на AMP гени. Резистентни гени се струпват върху плазмиди като масиви чрез транспониране и специфични за обекта рекомбинационни механизми. Преди всичко **продуктивните животни и хранителните продукти, са докладвани като основни източници на плазмиди**, отговорни за AMP. Прогнозирани са **26 различни плазмиди в 403 секвенирани генома на *Salmonella ser. Mbandaka***, от които най-често идентифицираните са **плазмидите *IncHI2***. Наличието на *IncHI2* плазмиди в резистентни изолати салмонела, както и тяхната връзка с MDR при *Salmonella*, е докладвано и преди това. В допълнение, са открити **хромозомни мутации, свързани с хинолонова резистентност (*gyrA D87Y* и *S83Y*) и резистентност към колистин (*pmrB*)**, антибиотик, който може да се използва срещу карбапенемаза продуциращи *Enterobacteriaceae* като последна опция за лечение. Това показва потенциалната способност на тези мобилни генетични елементи да разпространяват AMP сред *Salmonella*.

Прогнозата за детерминанти на вирулентността в *Salmonella ser. Mbandaka* разкрива **силно присъствие на вирулентни гени във всички изследвани геноми**. В допълнение към факторите на вирулентност, са използвани също генотипни прогнозни модели, базирани на WGS, за да бъде изяснено разпределението на патогенните острови, големи отделни региони в хромозомите, които съдържат гени на вирулентност. От 23-те докладвани по-рано SPI в *Salmonella*, седем са открити само при изолатите от едно проучване, включително *C63PI*. Факторите на вирулентност на *Salmonella* са отговорни за патогенността на *Salmonella*, която включва оцеляване в екстремната киселинна среда на стомаха на гостоприемника, инвазия на клетките на гостоприемника и оцеляване на реакцията на имунните клетки на гостоприемника (макрофаги).

Повече данни за разпространението на *Salmonella* сероварите може да бъде намерена и в интернет страницата на Референтна лаборатория на Европейския съюз за салмонела - Том 26, Декември 2020 г., ISSN 2211-6877.

В заключение, всички разгледани проучвания доказват генетичното и еволюционно разнообразие на *Salmonella enterica* серовар Mbandaka, което показва този серовар като **потенциална заплаха за общественото здраве**. Освен това, наличието на изолати с резистентност към повече от три класа антимикуробни средства също буди притеснение. В допълнение според последните доклади на CDC хранителните инфекции, причинени от *Salmonella*, са важен световен проблем, като, **общата честота на епидемията от *Salmonella* остава непроменена през последните няколко години, но сценарият на заболяемост при различните серовари се е променил**. Някои от сероварите, които преди това не са повод за безпокойство, започнаха да се превръщат в **обезпокоителен причинител на наскоро появили се хранителни взривове като *S. Mbandaka***, който причини интернационални огнища на салмонела при хора през 2013 г. и 2016 г. **Говедата, пилетата и свинете са най-честият гостоприемник на *S. Mbandaka*** и много от тях са асимптоматични носители. Серовар Mbandaka също така е изолиран от различни източници, включително фуражи, растителни и месни хранителни продукти, както и от проби от околната среда.

Сравнителен геномен анализ на глобалната колекция от 465 *S. Mbandaka* геномни секвенции изясняват структурата на популацията, интрасероварното разпределение на вирулентните фактори и гените на антимикробната резистентност на този серовар. Тъй като генотипът може не винаги да отразява фенотипното поведение на бактериите, **фенотипният анализ е силно препоръчителен като златен стандарт, за да се разбере функционалната връзка между изолатите от различни източници, особено клиничните и неклиничните.**

В този обзор е демонстриран **потенциала на инвазивност на изолатите *S. Mbandaka* и тяхната вирулентност, както и способността на този серовар да причинява значителни човешки заболявания.** Освен това е показан **потенциала на този серовар да се адаптира към среда с ниско рН и по този начин способността на този серовар да оцелее в хранителни стоки, както и да преодолее защитните бариери на гостоприемника като киселинната среда в стомаха.** Освен това наличието на **изолати с мулти-лекарствена резистентност, буди сериозна загриженост,** тъй като този серовар е по-разпространен при продуктивните животни.

Изградената мрежа за надзор е необходимо да включва постоянен контрол върху този серовар на *Salmonella*, тъй като стана ясно, че той е устойчив на много фактори и все по-често бива изолиран в Европа, като надзорът следва да се осъществява не само на ниво рискова или засегната зона или етап от производството, а в по-широки граници. Следва да се прилага **целогеномно секвениране или други иновативни молекулярно диагностични методи, с цел получаване на по-информативни данни, вземане на по-навременни и адекватни мерки и засилване на мерките за хигиенен контрол и дезинфекция на всеки един етап от агрохранителната верига.** Следва да има **непрестанна връзка между заинтересованите страни,** а именно – институциите, отговорни за здравето на животните и контрола качеството на храните, институциите, отговорни за човешкото здраве и тези, занимаващи се с околна среда и води, като потенциален източник на тези патогени. В подкрепа на казаното преди това, според експертите комбинирането на епидемиологичните данни за хора, животни и храни, с молекулярните данни и данните за генотипизиране осигурява ефективна методология за по-добро разбиране на екологията на този патоген на различни етапи от хранителната верига и ще подобри разследването на огнища на салмонелоза, засягащи една или повече държави членки (*ECDC, EFSA и ANSES, 2021*).

Профилактиката на заболяването следва да е насочена предимно към рисковите групи от населението – бременни жени, деца и хора с хронични, онкологични заболявания. Разработването на „Карта за епидемиологично проучване на салмонелоза” ще подпомогне събирането на информация за хранителните навици и предразполагащите фактори за заразяване.

В дисертационен труд на д-р Светла Михова Станева, Медицински университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов“, Варна, на тема проучване и контрол на листериозата в България са дадени **ценни насоки за етапите при оценка на риска от възникване и разпространение на листериозата, които биха могли да бъдат приложени и за салмонелозните огнища и хранителни взривове.** В този труд в началния етап е разгледано значението на животните като източник на инфекция, които отделят листериите в околната среда. Като **основен елемент в модела на разпространение на**

инфекциите, причинени от листерии е изтъкната **околната среда**, отчитайки изключителното ѝ значение за запазването и разпространението на листериите. След това се описва пътят на микроорганизмите, които попаднали във вода започват самостоятелен сапрофитен цикъл, което определя **значението на водите и околната среда**. Чрез водата микроорганизмите могат да попаднат по плодовете и зеленчуците и директно да станат **фактор на заразяване при хората**. Животинските продукти преминават през **различни технологични процеси**, за да достигнат готов за консумация продукт. Този етап е **ключов и от изключително значение за предаването и циркулацията на тези патогенни бактерии**, включващ хранителните продукти и производствените съоръжения. По този начин се показва значението на суровините, на елементите на производствената среда и възможностите за кръстосано замърсяване при обработката и търговия с готови за консумация хранителни продукти. Те са и най-честият фактор на заразяване с *L. Monocytogenes* или *Salmonella*. Показана е и възможността човек да бъде източник на инфекция при вертикалното предаване на заразата. Освен това, се засягат важни моменти, свързани с мониторинга над листерийната инфекция, имащ за цел да обхване всички аспекти на епидемиологичната циркулация на *L. monocytogenes*. В предложената рамка за провеждане на такъв мониторинг се отделя внимание на контрола на разпространението на *L. monocytogenes* в работната среда на различни обекти за производство и търговия с храни. Този контрол следва да се планира в системите за самоконтрол на всеки обект, да се извършва **системно и да се следи от компетентните органи за контрол на храните**. Необходимо е и **обучение на извършващите контрол**, за да се обхванат всички екологични ниши, където може да има условия за размножаване на тези хранителни патогени. За тази цел, би следвало да се акцентира на следното: **Определяне на критичните точки за разпространение на микроорганизма; средствата и начините за дезинфекция с цел недопускане образуване на биофилм; подходящите технологични решения за подтискане растежа на тези бактерии в готовите за консумация храни; правилното пробонабиране и методите на изследване за обективизиране на контрола**. Тази част от мониторинга подлежи на планиране, провеждане, обезпечаване и оценка от структурите на Министерство на земеделието. Относно мониторинга на циркулацията на *L. Monocytogenes* или *Salmonella* сред хората, под контрола на Министерство на здравеопазването са необходими: **повишаване готовността на лечебните заведения за своевременна диагностика и адекватно лечение на болелите и разработване и прилагане на скрининг за рисковите групи от населението**, както и не на последно място **повишаване на здравното образование на хората с акцент към тези с повишен риск**.

Препоръка към компетентните органи е **оптимизиране на надзора над тези зоонози и набелязване на основните моменти за контрол и профилактика, повишаване на диагностичната подготвеност и прилагане на съвременни и нови молкулярно диагностични подходи**, които да подпомогнат вземането на адекватни мерки и своевременни ръководни решения. Надзорът над разпространението на тези патогени трябва да обхваща всички съвременни екологоепидемиологични аспекти на циркулацията на тези бактериални причинители: **ранната диагностика на болелите, своевременната и пълна регистрация и лечение, подобряване, скрининг**

на рисковите суровини и готови храни, контрол над факторите на работната среда, контактни центрове, осигуряващи необходимата информация за производители и търговци на храни, както и за потребителите. **Необходимо е усъвременяване на Национална програма за профилактика и контрол на салмонели, обхващаща рисковете на заболяването.** Въз основа на всичко гореизложено, би могло да се обобщи, че *Salmonella enterica* е един много важен и подценяван хранителен патоген в наши дни, с голямо значение за човешкото здраве и особено за рисковите групи от населението. Устойчивостта на този патоген, в съчетание с високите нива на заболяемост, прави хигиенното манипулиране на храните първостепенен фактор за опазване на общественото здраве. **Изключително важно е и да се спазват добрите производствени и хигиенни практики и да се прилага ефективен контрол по цялата верига на производство, дистрибуция и съхранение на храните, включително и в домашни условия.** И не на последно място, **спазването на добра лична хигиена е ефективна мярка за намаляване на риска и от други заболявания, причинявани от различни патогени.**

В заключение: **профилактичните мерки и борбата срещу тази важна зооноза трябва да обхващат всички етапи от хранителната верига - от фермата с животни до обекта за производство на храни, през дистрибуцията на храните и накрая до масата на всеки консуматор!** ECDC насърчава държавите да проследяват подозрителни случаи за салмонелоза и възможните пътища на излагане на този патоген. Всяка нова информация за случаи при хора, следва да бъде докладвана в *EpiPulse*. ECDC може да предложи подкрепа на държавите с ограничен или никакъв капацитет за изпълнение на WGS. Уведомления в Системата за ранно предупреждение (RASFF) следва да се подават също своевременно. Освен това ECDC насърчава органите за обществено здравеопазване да си сътрудничат тясно с органите по безопасност на храните.

ЕОБХ насърчава държавите членки да извършват секвентен анализ на *S. Mbandaka* изолати от храни, и/или свързани с двата основни клъстера, или да използват микробиологични (серогрупа или ST), или епидемиологични методи, и да споделят тези последователности с ЕОБХ и EURL *Salmonella*.

Като финал, необходимо е внедряване на новите геномни техники, в частност пълния геномен секвентен анализ в диагностиката, с цел по-точна, по-навременна и по-акуратна оценка на риска и предприемане на навременни и адекватни мерки при евентуално възникване в Р. България на подобен хранителен взрив.

Изготвил:

Красимира Захариева, главен експерт в дирекция ОРХВ, ЦОРХВ

Използвана литература:

- *Phenotypic and genotypic characterization of non-typhoidal Salmonella isolated from a Brazilian pork production chain - Cibeli Vianaa, Juliana Líbero Grossia, Mallu Jagnow Serenoa, Ricardo Seiti Yamatogia, Luciano dos Santos Bersot, Douglas Ruben Call, Luís Augusto Nero*
- *Salmonella Serovars and Antimicrobial Resistance Profiles in Commercial Layer Flocks - Çokal, Y., Günaydın, E., Goncagül, G., Önat, K. and Gökmen, T.G.*
- *Whole genome sequencing for routine identification, drug resistance detection and epidemiology of Salmonella: A revolution in public health microbiology - Satheesh Nair*
- *Retrospective use of whole genome sequencing to better understand an outbreak of Salmonella enterica serovar Mbandaka in New South Wales, Australia - Cassia Lindsay, James Flint, Kim Lilly, Kirsty Hope, Qinning Wang, Peter Howard, Vitali Sintchenko, and David N Durrheim*
- *Detection and Elimination of Salmonella Mbandaka from Naturally Contaminated Alfalfa Seed by Treatment with Heat or Calcium Hypochlorite - TREVOR V. SUSLOW, Jiangchun Wu, William F. Fett, and Linda J. Harris*
- *Activities of the NRL “Salmonella, campylobacter, staphylococci and antimicrobial resistance”, Bulgaria - EURL Salmonella Workshop, Zaandam, Netherlands - Dr. Gergana Mateva*
- *Phylogenetic and Associated Phenotypic Analysis of Salmonella Enterica Serovar Mbandaka - Linto Antony*
- *Genomic diversity of Salmonella enterica -The UoWUCC 10K genomes project - Mark Achtman, Zhemín Zhou, Nabil-Fareed Alikhan, William Tyne, Julian Parkhill, Martin Cormican, Chien-Shun Chiou, Mia Torpdahl, Eva Litrup, Deirdre M. Prendergast, John E. Moore, Sam Strain, Christian Kornschober, Richard Meinersmann, Alexandra Uesbeck, François-Xavier Weill, Aidan Coffey, Helene Andrews-Polymeris, Roy Curtiss 3rd, Séamus Fanning*
- *Genomic Characteristics of Colistin-Resistant Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Infantis from Poultry Farms in the Republic of Serbia - Branko Jovčić, Katarina Novović, Brankica Filipić, Maja Velhner, Dalibor Todorović, Kazimir Matović, Zoran Rašić, Sonja Nikolić, Ferenc Kiškarolj and Milan Kojić*
- *Endocarditis following Consumption of Cereal Associated with Salmonella enterica Subtype Mbandaka Outbreak - Jana K. Dickter, LiYing Cai, and David S. Snyder*
- *Population structure of Salmonella enterica serotype Mbandaka reveals similar virulence potential irrespective of source and phylogenomic stratification - Linto Antony, Gavin Fenske, Radhey S Kaushik, Tiruvor G Nagaraja, Milton Thomas, Joy Scaria*
- *Multi country outbreak of multiple Salmonella enterica serotypes linked to imported sesame based products -14 October 2021, JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT*

- *European Union Reference Laboratory for Salmonella Vol. 26 No. 4 December 2020, ISSN 2211-6877, Newsletter*
- *European Union Reference Laboratory for Salmonella Vol. 28 No. 2 June 2022, ISSN 2211-6877, Newsletter*
- *European Union Reference Laboratory for Salmonella Vol. 27 No. 1 March 2021, ISSN 2211-6877, Newsletter*
- *JOINT NOTIFICATION SUMMARY Multicountry outbreak of Salmonella Mbandaka ST413 - Working document EFSA and ECDC*
- *Dynamics of Salmonella enterica and antimicrobial resistance in the Brazilian poultry industry and global impacts on public health - Nabil-Fareed Alikhan, Luisa Zanolli Moreno, Luis Ricardo Castellanos, Marie Anne Chattaway, Jim McLauchlin, Martin Lodge, Justin O'Grady, Roxana Zamudio, Emma Doughty, Liljana Petrovska, Marcos Paulo, Vieira Cunha, Terezinha Kno"bl, Andrea Micke Moreno, Alison E. Mather*
- *Protracted, Intermittent Outbreak of Salmonella Mbandaka Linked to a Restaurant - Michigan, 2008–2019 - William D. Nettleton; Bethany Reimink; Katherine D. Arends; Douglas Potter; Justin J. Henderson; Stephen Dietrich; Mary Franks*
- *Multistate outbreak of Salmonella Mbandaka infections linked to sweetened puffed wheat cereal – United States, 2018 - Amelia A. Keaton, Colin A. Schwensohn, Joshua M. Brandenburg, Evelyn Pereira, Brandon Adcock, Selam Tecele, Rachel Hinnenkamp,*
- *Jeff Havens, Kim Bailey, Brad Applegate, Pamela Whitney, Deborah Gibson, Kathy Manion, Michelle Griffin, Joy Ritter, Carrie Biskupiak, Kadri Ajileye, Mugdha Golwalkar, Michael Gosciminski, Brendalee Viveiros, Genevieve Caron, Laine McCullough, Lori Smith, Eshaw Vidyaprakash, Matthew Doyle, Cerise Hardy, Elisa L. Elliot and Laura B. Gieraltowski*
- <https://ucfoodsafety.ucdavis.edu/low-moisture-foods/nuts-and-nut-pastes>
- *Fifteen years of successful spread of Salmonella enterica serovar Mbandaka clone ST413 in Poland and its public health consequences - Andrzej Hoszowski, Magdalena Zajac, Anna Lalak, Paweł Przemyski, Dariusz Wasyl*
- *Genetic changes are introduced by repeated exposure of Salmonella spiked in low water activity and high fat matrix to heat - Leen Baert, Johan Gimonet, Caroline Barretto, Coralie Fournier & Balamurugan Jagadeesan*
- *Salmonella in Livestock Production in GB, 2020 - September 2021, Animal and Plant Health Agency, UK*
- *Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry Mauro de Mesquita Souza Saraiva, Kelvin Lim, Daniel Farias Marinho do Monte, Patrícia Emília Naves Givisiez, Lucas Bocchini Rodrigues Alves, Oliveira Caetano de Freitas Neto, Samuel Kariuki, Angelo Berchieri Júnior, Celso José Bruno de Oliveira, Wondwossen Abebe Gebreyes*
- *Serotyping, MLST, and Core Genome MLST Analysis of Salmonella enterica From Different Sources in China During 2004-2019 - Yan S., Zhang W., Li C., Liu X., Zhu L., Chen L., Yang B.*

- *JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT - Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis sequence type (ST)11 infections linked to eggs and egg products – EFSA, ECDC*
- *The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020 - EFSA, ECDC, 29 March 2022, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>*
- *Prevalence and antimicrobial resistance profile in Salmonella spp. isolates from swine foodchain – Carlotta Lauteri, Anna Rita Festino, Mauro Conter, Alberto Vergara* *Post-Graduate Specialization Sc – Italian Journal of Food Safety 2022*
- *Animal feed contains diverse populations of Salmonella - Nikki W. Shariat, Bryan R. Larsen, Chery Schaeffer, Kurt E. Richardson*
- <https://wgsportal.efsa.europa.eu/home>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2021.EN-6922>
- *Global trends in antimicrobial use in food animals - Thomas P. Van Boeckel, Charles Brower, Marius Gilbert, Bryan T. Grenfell, Simon A. Levin, Timothy P. Robinson, Aude Teillant, and Ramanan Laxminarayan*
- *д-р Светла Михова Станева, Екологична епидемиология на листерийната инфекция в България, Автореферат на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ доктор “, Факултет по обществено здравеопазване, Медицински университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов “, Варна*