

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE
KATEDRA ZA MIKROBIOLOGIJU



Ferenc F. Kiškarolj, DVM

**PRIMENA SEROLOŠKIH METODA, MULTIPLEKS
LAN ANE REAKCIJE POLIMERAZE I SEKVENCIRANJA
GENA ZA 16S RIBOZOMALNU RNK U IDENTIFIKACIJI
SEROVARIJETETA VRSTE *Salmonella enterica*
PODVRSTE *enterica***

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT FOR MICROBIOLOGY



Ferenc F. Kiskaroly, DVM

**APPLICATION OF SEROTYPING, MULTIPLEX
POLYMERASE CHAIN REACTION AND SEQUENCING
OF THE GENE FOR 16S RIBOSOMAL RNA
IN IDENTIFICATION OF SEROVARS OF
Salmonella enterica SUBSPECIES *enterica***

Doktoral disertation

Belgrade, 2019.

Mentori:

dr Dušan Mišić, vanredni profesor,

Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu

dr Lidija Šenerović, viši naučni saradnik,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Sonja Radojčić, redovni profesor,

Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela,
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

dr Marina Radojčić, vanredni profesor,

Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu

dr Dubravka Milanov, viši naučni saradnik,

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

Datum odbrane:

*Posvećeno supruzi Eržebet
i sinovima Gergelju i Gelertu*

ZAHVALNOST

Pri završetku doktorske disertacije osećam veliku dužnost da se zahvalim svima koji su mi pomogli na dugom putu koji je vodio do ovog ostvarenja.

Želim da izrazim zahvalnost svojim uvažanim mentorima Prof dr Dušanu Mišiću i dr Lidiji Šenerović, a uz njih moram pomenuti i dr Ivanu Morić. Ove osobe su me podržavali tokom izrade ove doktorske disertacije od samog izbora njene teme, preko izvođenja eksperimenata pa do njenog stavljanja u konačnu formu. Njihovo angažovanje je daleko prevazišlo okvire obične mentorske i stručne podrške.

Zahvalan sam, takođe, rukovodstvu Veterinarskog specijalističkog instituta na stipendiranju i obezbeđenju uslova za pohađanje doktorskih akademskih studija, kao i za izradu svoje disertacije. Dr Jožef Horvat, tada direktor instituta, mi je ponudio mogućnost za ovaj oblik stručnog usavršavanja. U funkciju direktora instituta kasnije je došao Petar Rudinski, zatim dr Ljubomir Milić koji su dalje podržali moje studije. Zahvaljujem se takođe Laslu Matkoviću, aktuelnom direktoru svoje matične kuće, ko mi je pružio svu potrebnu podršku za uspešno okončanje ovog poduhvata.

Zahvalan sam prof. dr Beli Nađu iz Instituta za veterinarsko-medicinska istraživanja Mađarske akademije nauka na ustupljenoj DNK S. Infantis.

Zahvaljujem se prof. dr Danijeli Kirovski, dragom kolegi Petru Sikimiću i doc. dr Žoltu Bečkeiju na njihovoj nesebičnoj pomoći.

Želim izraziti svoju zahvalnost prof. dr Ružici Ašanin zbog podrške tokom početnog dela mojih doktorskih studija, kao i zbog stručnog znanja koje mi je prenela još prethodno tokom mojih specijalističkih studija.

Posebno se zahvaljujem Dr Danijelu Milosavljeviću, Dr Goranu Đuroviću, Dr Gordani Inštitoris Pribić, Dr Lorantu Mađaru i Snežani Marković. bez čije pomoći takođe ne bih mogao da završim doktorske studije.

Zahvaljujem se svojoj majci što je omogućila moje školovanje.

Na kraju, neizmernu zahvalnost izražavam svojoj supruzi i sinovima zbog njihovog strpljenja, istrajnosti i beskrajne ljubavi prema meni.

**Primena seroloških metoda, multipleks lančane reakcije
polimeraze i sekvenciranja gena za 16S ribozomalnu RNK
u identifikaciji serovarijeteta vrste
Salmonella enterica podvrste *enterica***

Kratak sadržaj

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitana mogućnost primene simpleks i multipleks PCR protokola sa prethodno opisanim prajmerima za preciznu identifikaciju najčešće izolovanih serovarijeteta *Salmonella* vrsta na teritoriji Vojvodine. Takođe je ispitana efikasnost primene metode sekvenciranja gena za 16S rRNK u preciznoj identifikaciji salmonela. Ispitano je 107 izolata *Salmonella enterica* ssp. *enterica* identifikovanih klasičnom serotipizacijom kao: *Infantis* (52), *Enteritidis* (33), *Tennessee* (5), *Mbandaka* (4), *Montevideo* (3), *Havana* (2), *Lille* (2), *Senftenberg* (2), *Typhimurium* (1), *Agona* (1), *Derby* (1) i *Livingstone* (1). Korišćena je tripleks PCR reakcija u detekciji *bcfC*, *steB* i *sdf* lokusa, optimizovana tokom preliminarnih ispitivanja. Primenom tripleks PCR, samo *S. Enteritidis* je mogla precizno da bude razlikovana od drugih serovarijeteta, dok su ostali serovarijeteti na osnovu rezultata tripleks PCR svrstavani u dve grupe (Grupa 1 i Grupa2). *S. Infantis*, najzastupljeniji serovarijetet među ispitanim izolatima nije mogao biti precizno identifikovan jer se primenom tripleks PCR nije razlikovao od ostalih članova Grupe 2. Za njegovu konačnu identifikaciju je primenjen simpleks PCR za umnožavanje segmenta *fljB* koji je karakterističan samo za *S. Infantis*. Sekvenciranje gena za 16S rRNK je primenjeno u identifikaciji izolata devet različitih serovarijeteta. Poredjenjem rezultata dobijenih u klasičnoj serotipizaciji i u PCR, uočeno je slaganje u 91 slučaju od ukupno 107 (85%). Od 33 izolata *S. Enteritidis* njih 31 (94%) je dao očekivan PCR profil. U slučaju *S. Infantis* PCR je potvrdila identifikaciju u samo 75% (39 od 52) slučajeva. Ostali ispitani serovarijeteti dali su očekivane PCR profile. Sekvenciranje gena za 16S rRNK je bilo pouzdano samo u određivanju pripadnosti ispitanih izolata rodu *Salmonella*.

Ključne reči: *Salmonella enterica*, serovarijetet, serotipizacija, multipleks PCR, sekvenciranje gena za 16S rRNK

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

UDK brojevi: 579.62:577.2(043.3)

579.84:619(043.3)

**Application of serotyping, multiplex polymerase chain reaction
and sequencing of the gene for 16S ribosomal RNA in
identification of serovars of *Salmonella enterica*
subspecies *enterica***

Abstract

Aim of this doctoral thesis was to test the applicability of published primers for the identification of serovars isolated most frequently in the north part of our country using multiplex and simplex PCR reactions. The efficacy of sequencing of gene for 16S ribosomal RNA for identification of *Salmonella* strains was also checked.

The study was conducted on 107 serotyped *Salmonella enterica* ssp. *enterica* isolates. Strains belonged to the following serovars: Infantis (52), Enteritidis (33), Tennessee (5), Mbandaka (4), Montevideo (3), Havana (2), Lille (2), Senftenberg (2), Typhimurium (1), Agona (1), Derby (1) i Livingstone (1).

A triplex PCR protocol (bcfC, steB, sdf) optimized during preliminary investigations was used. This reaction separated *S. Enteritidis* from other strains, while the remaining serovars divided in two distinct groups (Group 1 and Group 2). As the used PCR protocol could not differentiate *S. Infantis*, the most numerous serovar among isolates, from other members of the Group 2, its identification was completed using a simplex PCR reaction targeting *fljB* specific for *S. Infantis*.

Comparison of the results of serotyping and PCR protocols revealed a concordance in 91 cases from the total of 107 (85%). From 33 strains serotyped as *S. Enteritidis* 31 (94%) had the predicted PCR profile. Regarding *S. Infantis*, identification based on genomic markers confirmed this serovar only in 75% of cases (39 from 52). Other serovars showed their typical PCR profiles.

Sequencing of gene for 16S ribosomal RNA could reliably determine only that tested isolates are the members of the genus *Salmonella*.

Key words: *Salmonella enterica*, serovar, serotyping, multiplex PCR, sequencing of gene for 16S rRNA

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Microbiology

UDK numbers: 579.62:577.2(043.3)

579.84:619(043.3)

SADRŽAJ:

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | UVOD | 1 |
| 2 | PREGLED LITERATURE | 3 |
| 2.1 | Familija Enterobacteriaceae | 3 |
| 2.2 | Istorijat, nomenklatura i taksonomija roda <i>Salmonella</i> | 4 |
| 2.3 | Morfološka svojstva salmonela | 10 |
| 2.3.1 | <i>Površinske strukture salmonela</i> | 10 |
| 2.4 | Specifičnosti genoma roda <i>Salmonella</i> | 17 |
| 2.4.1 | <i>Određivanje suštinskog i akcesornog dela genoma salmonela</i> | 18 |
| 2.4.2 | <i>Gubitak funkcionalnosti gena</i> | 19 |
| 2.4.3 | <i>Varijabilan deo genoma i njegovo poreklo kod salmonela</i> | 21 |
| 2.4.4 | <i>Primenljivost genomike salmonela u epizootiološkim istraživanjima</i> | 22 |
| 2.5. | <i>Preživljavanje salmonela u spoljašnjoj sredini</i> | 23 |
| 2.8 | Epidemiologija salmoneloze..... | 33 |
| 2.9 | Laboratorijska identifikacija salmonela..... | 34 |
| 2.9.1 | <i>Postojeći i novi pristupi tipizaciji (određivanju serovarijeteta) salmonela</i> | 35 |
| 2.9.2 | <i>Postojeći pristupi i metode za tipizaciju salmonela</i> | 36 |
| 2.9.3 | <i>Molekularne metode sekundarne (drugostepene) tipizacije Salmonella</i> | 44 |
| 2.9.4 | <i>Primena molekularnih metoda za prvostepenu tipizaciju Salmonella</i> | 50 |
| 2.9.5 | <i>Novi pristupi pri molekularnoj tipizaciji salmonela</i> | 52 |
| 2.9.6 | <i>Molekularna serotipizacija bazirana na direktnom određivanju i karakterisanju gena koji kodiraju H antigene i biosintetske puteve O antigena</i> | 53 |
| 3 | CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA | 56 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | MATERIJAL I METODE | 58 |
| 4.1 | Izolacija i identifikacija salmonela primenom klasičnih mikrobioloških metoda | 58 |
| 4.1.1 | <i>Kultivacija ispitivanih sojeva salmonela radi izolacije DNK</i> | 64 |
| 4.2 | Molekularne metode | 64 |
| 4.2.1 | <i>Izolovanje genomske DNK</i> | 64 |
| 4.2.2 | <i>Umnožavanje odabranih gena u reakciji lančane polimerizacije (PCR metoda)</i> | 65 |
| 4.2.3 | <i>Horizontalna elektroforeza u agarozu</i> | 68 |
| 4.2.4 | <i>In silico analiza</i> | 68 |
| 4.3 | Sekvenciranje gena za 16S rRNK | 69 |
| 4.3.1 | <i>Umnožavanje dela gena za 16S rRNK</i> | 69 |
| 4.3.2 | <i>Prečišćavanje PCR proizvoda</i> | 70 |
| 4.3.3 | <i>Određivanje koncentracije DNK</i> | 71 |
| 4.3.4 | <i>Sekvenciranje umnoženog gena za 16S rRNK</i> | 71 |
| 5 | REZULTATI | 73 |
| 5.1 | Klasična identifikacija serovarijeteta <i>Salmonella enterica</i> | 73 |
| 5.2 | Molekularno-biološka ispitivanja | 75 |
| 5.2.1 | <i>Izolacija genomske DNK</i> | 75 |
| 5.2.2 | <i>Rezultati umnožavanja ciljnih sekvenci gena i lokusa u pojedinačnim PCR reakcijama i in silico analiza</i> | 76 |
| 5.2.3 | <i>Definisanje očekivanih PCR profila</i> | 81 |
| 5.2.4 | <i>Optimizacija multipleks PCR reakcije</i> | 82 |
| 5.2.5 | <i>PCR identifikacija S. Infantis</i> | 84 |
| 5.2.6 | <i>Rezultati identifikacije ispitanih izolata multipleks PCR reakcijom</i> | 84 |
| 5.2.7 | <i>Rezultati pojedinačne PCR reakcije specifične na identifikaciju S. Infantis</i> | 85 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2.8 | <i>Poređenje rezultata klasične serotipizacije i PCR reakcija.....</i> | 85 |
| 5.3 | Rezultati sekvenciranja gena za 16S rRNK..... | 94 |
| 5.3.1 | <i>Rezultati umnozavanja dela 16SrRNK gena u PCR reakciji</i> | 94 |
| 5.3.2 | <i>Identifikacija izolata na osnovu sekvenci gena za 16S rRNK.....</i> | 95 |
| 6 | DISKUSIJA..... | 97 |
| 7 | ZAKLJUČCI..... | 110 |
| 8 | SPISAK LITERATURE..... | 112 |

1 UVOD

Rod *Salmonella* pripada porodici Enterobacteriaceae u koju se svrstaju oksidaza negativni, Gram negativni štapi i sposobni da fermentišu glukozu i koji su rezistentni na prisustvo žuči i soli. Za razliku od ostalih pripadnika porodice Enterobacteriaceae, svi pripadnici roda *Salmonella* smatraju se striktnim patogenima, samim tim salmonelle imaju izuzetan značaj u veterinarskoj i humanoj medicini. Do danas je otkriveno više od 2600 serovarijeta salmonela. Epizootiološki i epidemiološki značaj svih ovih serovarijeta, međutim, nije jednak. Postoje serovarijete koji su specifično adaptirani samo na jednu vrstu domaćina i nisu sposobni da izazovu infekciju kod ostalih vrsta. Tipični primeri su tifus ljudi (*S. Typhi*) ili beli proliv pilića (*S. Gallinarum*). Najveći broj serovarijeta, ipak, ima sposobnost da izazove oboljenja kod različitih vrsta životinja, pa čak i ljudi, većinom u obliku akutnog enteritisa sa profuznim prolivima (7, 53, 64, 156). Od izuzetnog je značaja pri tome konzumacija hrane životinjskog porekla kontaminirane salmonelama. Štaviše, salmoneloze se ubrajaju među najestablije alimentarne infekcije ljudi na svetu.

Iako je dokazano da se salmonelle mogu naći u svim vrstama namirnica biljnog i životinjskog porekla, jaja se smatraju najčešćim izvorom salmonela za ljude, pored toga meso i proizvodi od mesa takođe predstavljaju rizik po tom pitanju (74,156).

Prema tome postoji razlika u stepenu zoonotskog potencijala različitih serovarijeta. Ove razlike su iskazane i u zakonskoj regulativi kako u našoj zemlji, tako i u Evropskoj Uniji, a na osnovu tih zakonskih klauzula preduzimaju se različite mere suzbijanja kod pojedinih serovarijeta *Salmonella* zavisno od njihovog značaja po javno zdravlje (39,182).

Samim tim, pored utvrđivanja prisustva salmonela u ispitanim uzorcima poreklom od životinja, podjednako je bitna i tačna identifikacija prisutnog serovarijeta (7,32).

Klasične metode za izolaciju i serotipizaciju salmonela su dugotrajne: sama izolacija zahteva do pet dana dok za preciznu identifikaciju nekada treba još nekoliko dana više. Sa pojavom molekularno-bioloških metoda objavljeno je sve više studija o ispitivanju primene ovih tehnika kako za dokazivanje salmonela direktno u uzorcima bez prethodne izolacije, tako i za međusobno razlikovanje pojedinih serovarijeta (12,17,94,130,178,244,257).

Upotreba PCR tehnike za umnožavanje sekvenci genomskih markera specifičnih za određeni serovarijetet se široko ispituje u cilju nalaženja alternative za klasičnu serotipizaciju. PCR je manje zahtevna metodologija od drugih molekularno-bioloških metoda, kao što je gel elektroforeza u pulsirajućem strujnom polju (PFGE) ili tipizacija sekvenciranjem više lokusa (MLST). U tom smislu PCR se, za razliku od drugih navedenih metoda lakše može implementirati u rutinski rad mikrobiološke laboratorije (94,130,).

Ranija iskustva primene PCR-a za tipizaciju salmonela pokazuju da baza podataka sekvenciranih genoma dostupna pri odabiru ciljnih sekvenci i dizajniranju upotrebljenih prajmera znatno utiče na specifičnost metode (12, 17). Trenutno je objavljeno malo podataka o iskustvima o korišćenju PCR tehnike u cilju diferencijacije različitih serovarijeteta salmonela u Republici Srbiji. (156). Ispitivanje autohtonih izolata, prema tome može znatno olakšati pravilnu procenu upotrebljivosti određenog PCR protokola na ovim prostorima (92, 156, 178).

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Familija Enterobacteriaceae

U ovu grupu bakterija se svrstaju fakultativno anaerobni, oksidaza negativni i katalaza pozitivni Gram negativni štapići. Nesmetano rastu na MacConkey agaru zbog svoje rezistencije na prisustvo žučnih soli. Ova poslednje navedena karakteristika omogućava im preživljavanje u njihovom osnovnom staništu u digestivnom traktu ljudi i životinja. To odražava i naziv familije, koji potiče iz starogrčke reči *enteron*, koja označava crevo.

Taksonomska podela ove porodice sa raznolikim i izrazito brojnim članovima, obuhvata preko 170 vrsta svrstanih u 53 roda. Predstavnici ove familije su prisutne na svim geografskom područjima i sastavni su deo svakog lanca ishrane u prirodi. Ova grupa bakterija, shodno tome, izlučuje se putem izmeta i kontaminira tlo, vodu i hranu. Prema tome, njihovo prisustvo u spoljašnjoj sredini se smatra indikatorom fekalne kontaminacije.

Navedena kompleksnost se odražava i na nomenklaturu familije *Enterobacteriaceae*. Ranije su se podele isključivo vršile na osnovu rezultata ispitivanja biohemijskih i antigenskih karakteristika, metodama koje su tada bile na raspolaganju. Razvojem metodologije molekularne biologije, od kojih je prva značajna za ovu oblast je bila DNK hibridizacija, došlo je i do brojnih promena u klasifikaciji ovog taksona.

Neki od njenih rodova su izraziti patogeni i izazivači velikog broja različitih oboljenja kod ljudi i životinja, koji se mogu manifestovati kao septikemija, pneumonija, meningitis, infekcije urinarnog trakta, infekcije organa za varenje i dr. Drugi predstavnici porodice predstavljaju oportunističke patogene ili saprofite. Bakterije iz ove porodice se nalaze u crevnoj flori, genitalnim organima, usnoj i nosnoj šupljini, na koži i drugim delovima organizma ljudi i životinja. Veliki broj patogenih bakterija proizvodi toksine koji su opasni za metabolizam ćelije domaćina. Među patogenim bakterijama u ovoj familiji svakako najznačajnije su, prema uticaju na zdravlje životinja i ljudi, vrste u okviru roda *Salmonella* (184, 185, 250).

2.2 Istorijat, nomenklatura i taksonomija roda *Salmonella*

Prvi podaci o infekciji salmonelama potiču od engleskog lekara William-a Budd-a kada je 1873. godine opisao tok tifusne groznice kod jednog pacijenta. Kao izvor uzročnika je već tada pomenuta eventualna uloga kontaminirane vode. Eberth mikroskopskim pregledom isečaka pravljenim od slezine čoveka umrlog od tifusa je uočio bacile 1880. godine. Prva uspešna kultivacija tifusnog bacila 1884. godine iz uzoraka slezine i mezenterijalnih limfnih čvorova pacijenta preminulog od tifusa se veže za rad Gaffky-ja. Bakteriju sada poznatu kao *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis je prvi put izolovao Teobald Smith 1885. godine iz unutrašnjih organa svinja, i tada ju je smatrao uzročnikom klasične kuge svinja. Razočaran time što izolovana bakterija ipak nije uzročnik ove bolesti, Teobald Smit je prepustio svoje otkriće svom šefu, inače doktoru veterinarske medicine Dejvidu Salmonu koji je zvanično objavio naučni rad na ovu temu i po kome je tada novootkrivena vrsta dobila ime, *Salmonella*. Widal je 1896 godine otkrio da serum čoveka obolelog od tifusa dovodi do aglutinacije tifoidnih bacila, i razvio je serodijagnostički test koji je i danas u upotrebi i nosi njegovo ime. Narednih godina sojevi salmonela su izolovani u slučaju različitih kliničkih stanja i iz mnoštva domaćina. U mnogo slučajeva ovi izolati smatrani su zasebnim vrstama, samim tim i dobijali različita imena najčešće na osnovu simptoma bolesti ili vrste domaćina. S vremenom se ipak prepoznala određena srodnost ovih bakterija, tako da uspostavljen je taksonomije i nomenklature ove mnogočlane grupe je od početka predstavljalo izazov za istraživače. Samim tim, razvoj ovih oblasti nije se odvijao linearno od vremena otkrića salmonela pa do današnjih dana, već se može podeliti u četiri međusobno preklapajuće faze (8, 203, 253).

Prva etapa obuhvatala je malopre pomenute početne pokušaje za grupisanje ranih izolata. S vremenom je postalo jasno, da infekcija istom bakterijom može da se ispolji različitim simptomima kod različitih domaćina, tako da davanje naziva na osnovu domaćina ili znakova bolesti se moralo napustiti u najvećem broju slučajeva (203).

Tokom druge faze taksoni su organizovani na osnovu antigenskih specifičnosti bakterija. Početna serološka istraživanja White-a 1926. godine pružali su osnovu za rad Kauffmann-a, koji je uspostavio Kauffmann-White šemu, koja je već 1941. obuhvatio priličan broj serovarijeteta (125). Površinske strukture ćelija salmonela koje su omogućile ovu sistematizaciju predstavljaju specifični O antigeni u sastavu ćelijskog zida i H-, to jest flagelarni antigeni. Većina sojeva naizmenično ispoljava dva tipa flagelarnih antigena, dok nekoliko salmonela poseduje i dodatni kapsularni Vi antigen. Antigenska struktura serovarijeteta predstavlja jedinstvenu kombinaciju ovih antigena koja, kada se napiše u formi O:H1:H2, zove se njegovom antigenskom formulom. Na primer, u slučaju serovarijeteta Typhimurium ova formula ima sledeći oblik: 1,4,5,12:i:1,2. Četiri broja ispred prve dvotačke označavaju da O antigen ima četiri antigenskih faktora, malo slovo „i“ predstavlja antigenski faktor flagelarnog antigena prve faze, dok 1,2 su antigenski faktori druge flagelarne faze. U ono vreme svaki serovarijetet se smatrao posebnom vrstom, tako da je ova antigenska formula tada određivala vrstu *Salmonella typhimurium* (203). U ovom periodu otkriveni serovarijeteti su većinom dobijali nazive prema mestu prve izolacije: na primer *S. london*, *S. montevideo* i tako dalje. Međutim, povećanjem broja opisanih serovarijeteta preko određene granice koncept „jedan serovarijetet – jedna vrsta“ je postao neodrživ.

Treća faza je počela, kada su istraživači za određivanje različitih taksonomskih jedinica salmonela uveli u upotrebu ispitivanja biohemijskih svojstava ovih bakterija u odnosu na sposobnost fermentacije različitih ugljenih hidrata, rasta u prisustvu organskih kiselina i niza drugih jedinjenja. Borman i saradnici (22) su na osnovu ovih podataka odredili tri vrste: *S. choleraesuis*, *S. typhosa* i *S. kauffmannii*. *S. kauffmannii* je obuhvatila praktično sve serovarijetete osim prva dva. Kauffmann i Edwards (1952) (126) su dali sličan predlog, s' tim što umesto naziva *S. kauffmannii* predložili *S. enterica*, dok kasnije Ewing (1972) (68) ovu složenu vrstu preimenovao u *S. enteritidis*. Nakon toga Kauffmann je podelio rod *Salmonella* prema biohemijskim karakteristikama na četiri podrodova označenih rimskim brojevima I-IV, ali i dalje je tretirao

svaki serovarijetet kao posebnu vrstu. Le Minor i saradnici (1970) (137) su ove podrodove smatrali vrstama sa nazivima *S. kauffmannii*, *S. salame*, *S. arizonae* i *S. houtenae* za redom.

Četvrtom fazom smatra se savremeni pristup taksonomiji na osnovu sličnosti nukleinskih kiselina pojedinih izolata. Ispitivanja DNK-DNK hibridizacijom su pokazala da svi serovarijeteti salmonela spadaju u istu hibridizacionu grupu, u okviru koje sličnost među sojevima iznosi 70-100 %. Ovaj genus na osnovu toga se jasno odvaja od drugih rodova porodice *Enterobacteriaceae*. Testiranjem toplotne stabilnosti DNK-DNK hibrida ovaj skup je podeljen na pet podgrupa (42). Ove podgrupe su se u mnogome slagale sa podrodovima koje je odredio Kauffmann na osnovu biohemijskih karakteristika, s tim što podrod III je bio podeljen na dva dela. Kasnije su opisane još dve podgrupe. Le Minor i saradnici (1982) u svetlu ovih rezultata su predložili tipsku vrstu *S. choleraesuis* koja obuhvata sedam podvrsta. Ubrzo je postalo očigledno da naziv *choleraesuis* može dovesti do zabune, jer ujedno označava jedinu vrstu u okviru roda *Salmonella*, kao i jednog od serovarijeteta unutar jedne od podvrsta. Zbog tog razloga naziv tipske vrste 1987. godine je promenjen u *S. enterica*, ime koje je predložio Edwards ranije, a koje je i u međuvremenu bilo u delimičnoj upotrebi (203). Reeves i saradnici (1989) (193) su na osnovu rezultata dobijenih multilokusnom enzimskom elektroforezom predložili odvajanje podvrste V kao posebnu vrstu, označenu kao *S. bongori*. Kasnije ispitivanja primenom tehnika AFLP, MLST, kao i sekvenciranja celog genoma jasno je pokazala da *S. bongori*, za razliku od *S. enterica*, obrazuje definisan klaster genetski veoma bliskih serovarijeteta, koji se jasno odvaja od većine ostalih salmonela (9).

Trenutno se smatra da rod *Salmonella* obuhvata dve vrste: *enterica* i *bongori*. Vrsta *S. enterica* se dalje deli na šest podvrsta: *enterica* (podvrsta I), *salamae* (podvrsta II), *arizonae* (podvrsta IIIa), *diarizonae* (podvrsta IIIb), *houtenae* (podvrsta IV) i *indica* (podvrsta VI) (Tabela 1) (83, 203). Sa aspekta zdravlja ljudi i domaćih životinja najveći značaj imaju pripadnici podvrste *S. enterica* ssp.

enterica, jer su odgovorni za 99% slučajeva salmoneloza (87). Predstavnicima ostalih podvrsta *S. enterica* i vrste *S. bongori* se nalaze pretežno kod hladnokrvnih životinja i u spoljašnjoj sredini.

Tabela 1: Tipične biohemijske reakcije za diferencijaciju vrsta i podvrsta roda *Salmonella* (preuzeto iz reference 83).

| Vrsta | <i>Salmonella enterica</i> | | | | | | <i>S. bongori</i> |
|------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| Podvrsta | I (<i>enterica</i>) | II (<i>salamae</i>) | IIIa (<i>arizonae</i>) | IIIb (<i>diarizonae</i>) | IV (<i>houtenae</i>) | VI (<i>indica</i>) | V |
| Dulcitol | + | + | - | - | - | d | + |
| Laktoza | - | - | - (75%) | + (75%) | - | d | - |
| ONPG | - | - | + | + | - | d | - |
| Salicin | - | - | - | - | - | - | - |
| Sorbitol | + | + | + | + | + | - | + |
| Malonat | - | + | + | + | - | - | - |
| Sluz | + | + | + | d | - | + | + |
| Želatin | - | + | + | + | + | + | - |
| Rast u KCN | - | - | - | - | + | - | + |

Dopunjujući taksonomsku klasifikaciju do nivoa podvrsta, salmonele su dalje podeljene u serovarijetete na osnovu dve grupe površinskih antigena: O antigen u okviru lipopolisaharida ćelijskog zida i flagelarni, odnosno H antigen, u stvari prema sistemu svojevremeno predloženoj od strane Kauffmana. Ova podela se danas naziva šema po White-Kauffmann-Le Minor. Prema najnovijim podacima opisano je 67 O antigena i 117 H antigena. Kombinacija vrste, podvrste, zatim različitih O grupnih i H flagelarnih antigena određuju sve poznate serovarijetete salmonela, čiji broj danas već prelazi 2600 (83, 86, 116) (Tabela 2).

Na osnovu aktuelne nomenklature salmonela posebni nazivi su zadržani samo u slučaju serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Serovarijeteti ostalih podvrsta vrste *S. enterica*, kao i serovarijeteti vrste *S. bongori* se označavaju samo njihovom antigenskom formulom. Pravila za ispravno izražavanje naziva različitih serovarijeteta su prikazana u Tabeli 3. Prema tome pun naziv, na primer, serovarijeteta Enteritidis je *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis. Ipak u stručnoj i naučnoj komunikaciji nazive

serovarijeteta *Salmonella enterica* subspecies *enterica* dozvoljeno je pisati u skraćenom obliku kao *Salmonella* Enteritidis, odnosno *S. Enteritidis*, dok u slučaju *S. bongori* i ostalih podvrsta *S. enterica* se uvek obavezno navodi pun naziv (106). S obzirom na činjenicu, da predmet istraživanja ove disertacije predstavljaju isključivo serovarijeteti *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, u daljem tekstu će se, zbog praktičnih razloga, koristiti njihovi skraćeni nazivi.

Tabela 2: Broj serovarijeteta u okviru vrsta i podvrsta roda *Salmonella* identifikovanih do kraja 2010. godine (preuzeto iz reference 116).

| Vrste i podvrste | Broj serovarijeteta |
|---------------------------------|---------------------|
| <i>S. enterica</i> | |
| subsp. <i>Enterica</i> (I) | 1586 |
| subsp. <i>salamae</i> (II) | 522 |
| subsp. <i>arizonae</i> (IIIa) | 102 |
| subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb) | 338 |
| subsp. <i>houtenae</i> (IV) | 76 |
| subsp. <i>indica</i> (VI) | 13 |
| <i>S. bongori</i> (V) | 22 |
| Ukupno | 2659 |

Serovarijeteti salmonele na osnovu stepena njihove adaptiranosti za određenog domaćina grubo se svrstaju u 3 grupe (3):

1. Salmonele striktno adaptirane samo na ljude i više primata: na primer *S. Typhi*, *S. Paratyphi A.*, *S. Paratyphi B*, *S. Paratyphi C* i *S. Sendai*.

2. Serovarijeteti potpuno ili u najvećoj meri adaptirani na za određene životinjske vrste: *S. Gallinarum* (živina), *S. Dublin* (goveda), *S. Abortusequi* (konji), *S. Abortusovis* (ovce) i *S. Choleraesuis* (svinje). Serovarijeteti iz ove grupe mogu retko da dovedu do oboljenja ljudi putem kontaminirane hrane.

3. Serovarijeteti koji nisu adaptirani na određenog domaćina, izazivaju infekcije kako kod ljudi, tako i kod niza različitih vrsta životinja. U ovoj grupi salmonela nalazi se većina serovarijeteta koji se prenose putem hrane. Glavni primeri su *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*.

Tabela 3: Aktuelna pravila nomenklature roda *Salmonella*: taksonomski entiteti i propisan format za pravopis njihovih naziva (prema ref. 3 i 83).

| Rod (veliko početno slovo, kurziv) | Vrsta (malo početno sovo, kurziv) | Podvrsta (malo početno sovo, kurziv) | Serovarijetet - primer (veliko početno slovo, uspravna slova) |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|---|
| <i>Salmonella</i> | <i>enterica</i> | <i>enterica</i> (subspecies I) | Choleraesuis, Enteritidis, Paratyphi, Typhi, Typhimurium |
| | | <i>salamae</i> (subspecies II) | 9,46:z:z39 |
| | | <i>arizonae</i> (subspecies IIIa) | 43:z29:- |
| | | <i>diarizonae</i> (subspecies IIIb) | 6,7:1,v:1,5,7 |
| | | <i>houtenae</i> (subspecies IV) | 21:m,t:- |
| | | <i>indica</i> (subspecies VI) | 59:z36:- |
| | <i>bongori</i> | (subspecies V) | 13,22:z39:- |

Aktuelna taksonomska podela salmonela (83) uvela je izmene i u status određenih serovarijeteta. Iz aspekta zdravlja životinja najbitnija promena je da Gallinarum i Pullorum, koji su ranije smatrani posebnim serovarijetetima, sad su označeni kao pojedini biotipovi jednog serovarijeteta *Salmonella enterica* ssp. *Enterica* serovar Gallinarum. Ovaj serovarijetet je visoko adaptiran na ptice i biotip Gallinarum izaziva tifus živine, dok biotip Pullorum beli proliv pilića. (37, 257). Ovi oblici salmoneloze su veoma značajni za živinarsku proizvodnju jer izazivaju velike gubitke. Sama činjenica, međutim, da se radi o vrsta specifičnim uzročnicima omogućavao je da se u velikom broju država doslednom primenom biosigurnosnih mera postigne njihovo iskorenjivanje iz intenzivnog uzgoja živine (156).

Sa druge strane, smatra se da upravo nestanak serovarijeteta Gallinarum je olakšao povećanje prevalencije drugih serovarijeteta kod živine. Posebno se naglašava ta mogućnost u slučaju Enteritidis, Hadar, Infantis i Senftenberg, koji se danas u znatno većem broju izoluju iz uzoraka poreklom od živine nego pre nekoliko decenija. Shodno ovim promenama porastao i značaj jaja i živinskog mesa kao potencijalnog izvora alimentarnih infekcija ljudi (37, 156).

2.3 Morfološka svojstva salmonela

Kao pripadnici familije *Enterobacteriaceae*, Salmonele su Gram-negativne bakterije štapićastog oblika (dužine 2-5 μm i širine 0,7-1,5 μm). Uglavnom su pokretni mikroorganizmi (sem *S. Gallinarum*), peritriho obrasli flagelama. Neke formiraju kapsulu. Salmonele su asporogeni fakultativno anaerobni mikroorganizmi. Na običnim hranljivim podlogama obrazuju velike, okrugle, sjajne kolonije pravilnih ivica (202).

Kao i kod ostalih Gram negativnih bakterija struktura njihovog spoljašnjeg omotača obuhvata tri dela: citoplazmina, odnosno unutrašnja membrana (UM), spoljašnja membrana (SM), a deo između dve navedene membrane u kojem se nalazi peptidoglikanski sloj, označava se kao periplazmatski prostor. UM predstavlja ćelijsku membranu sličnog sastava kao i kod pripadnika drugih rodova *Enterobacteriaceae*. SM kod velikog broja rodova Gram negativnih bakterija (na primer *Escherichia*, *Klebsiella* ili *Pasturella*) pokriven i zaštićen polisaharidnom kapsulom. Salmonele po tom pitanju predstavljaju izuzetak u okviru Gram negativne crevne flore životinja, jer polisaharidni molekuli izloženi na površini ćelijskog zida su O bočni lanci molekula lipopolisaharida (LPS). Samo pojedini izolati određenih serovarijeteta ekspimiraju pravu polisaharidnu kapsulu.

2.3.1 Površinske strukture salmonela

Površinske strukture salmonela, kao njihovi najpristupačniji i veoma varijabilni elementi, posebno su bitne kao faktori virulence pri interakciji sa ćelijama domaćina, zatim i u *in vitro* dijagnostici pri međusobnom razlikovanju pojedinih serovarijeteta.

2.3.1.1 Struktura i funkcija LPS-a salmonela

Molekuli LPS se nalaze na površini Gram negativnih bakterija. Predstavlja amfipatično jedinjenje: sadrži kako hidrofилne, tako i hidrofobne komponente. Molekul obuhvata tri regije: lipid A, osnovni oligosaharid i bočni lanac O koji se sastoji od ponavljajućih oligosaharidnih jedinica. Lipid A, to jest hidrofobni kraj

molekula LPS je sastavni deo spoljašnjeg lista SM. Polisaharidni deo, koji je hidrofilan, se proseže ka spoljašnjoj sredini.

Kolonije divljih sojeva *Salmonella* su obično glatke i sjajne, i označavaju se kao S forma (*eng.*: smooth=gladak). Ova njihova karakteristika potiče od prisustva O bočnih lanaca u punoj dužini. Mutanti koji su izgubili svoje O lance, bilo među prirodnim uslovima ili namernom mutagenezom u laboratoriji, najčešće formiraju kolonije sa nepravilnim ivicama sa mat površinom - R forme (*eng.*: rough = rapav). Dok se smatra da je struktura lipida A krajnje konzervirana među serovarijetetima *Salmonella enterica*, O lanac LPS-a je veoma varijabilan.

Lipid A je nosilac endotoksične funkcije LPS-a. Imunski sistem životinja je veoma osetljiv na ovo jedinjenje kao markera infekcije. Dugo je poznato da lipid A dovodi do patofizioloških promena u vidu endotoksičnog šoka, povećanja telesne temperature, aktivacije komplementa, koagulacije i promene hemodinamike. Imunološki efekti, kao što je mitogeno dejstvo na B-limfocite i aktivacija makrofaga, su takođe ranije opisani. Sam mehanizam ovih promena, međutim, razjašnjen je tek na kraju 1990-ih godina, kada je otkriveno da ova struktura predstavlja molekularni obrazac asociiran sa patogenom (pathogen-associated molecular pattern - PAMP). Vezivanje LPS-a za tolični receptor 4 (Toll-like receptor 4 - TLR 4) prouzrokuje proinflammatory promene u ekspresiji genoma ćelije domaćina koje se ostvaruju preko aktivnosti različitih citokina poreklom od monocita i makrofaga stimuliranih preko TLR4-MD2-CD14 puta. Na osnovu ovih otkrića LPS se smatra potentnim modulatorom imunog sistema i kroz ove aktivnosti doprinosi patogenoj aktivnosti Gram negativnih bakterija.

Osnovni oligosaharid sastoji se od neponavljajuće grupe od šest do osam molekula šećera, a za lipid A se vezuje preko jedinstvenog šećernog molekula od osam ugljenikovih atoma: 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulozonične kiseline. U slučaju *salmonella* tip oligosaharida je sačuvan na nivou genusa. Sastoji se od osam šećernih jedinica.

„O“ bočni lanac predstavlja antigenski dominantan i visoko varijabilan deo LPS-a. Hidrofilne je prirode i pruža se u mikrosredinu bakterijske ćelije. Sastoji se od niza ponavljajućih tetra- ili pentasaharida sa inkluzijom deoksi- i dideoksiheksoza. Broj ponavljajućih oligosaharidnih jedinica se razlikuje među sojevima, a zavisi i od uslova rasta. Obično se nalazi između 25 i 40 jedinica u nizu. Ponavljajuća oligosaharidna jedinica u okviru izolata B grupe, na primer, sadrži četiri ili pet šećernih molekula. U slučaju lanca serogrupa A, D i E1 osovu lanca predstavljaju isti šećeri: manoza (Man), ramnoza (Rha) i galaktoza (Gal), dok kod C2 grupe raspored je sledeći: Rha-Man-Man-Gal. U grupi B manoza je zamenjena abekvozom, (koja predstavlja 3,6-didedoksi-galaktozu i odgovoran je za O:4 antigenski faktor), a na mestu galaktoze se nalazi glukoza. Abekvoza je O-acetilovana: ova promena daje O:5 antigen. Kod ostalih grupa hidroksiheksozna komponenta se razlikuje: A grupa ima paratozu, abekvoza prisutna je pored grupe B i kod grupe C2, tivelozna je kod grupe D, a kod grupe E1 takve komponente nema.

Serološka identifikacija serovarijeteta salmonela na osnovu White-Kauffmann-Le Minor šeme zasniva se na grupisanju izolata na osnovu strukture antigena polisaharida O bočnih lanaca koga prati određivanje serološke specifičnosti H, odnosno flagelarnih antigena. Pojedini O antigeni se označavaju brojevima, a njihovi antigenski faktori su određeni sa vrstama šećernih komponenti u sastavu O bočnog lanca. Tako na primer *S. Typhimurium* poseduje O antigensku formulu 1,4,5,12. antigeni 4 i 12 se nalaze kod svih serovarijeteta u okviru B grupe, mada faktor broj 12 se nalazi i kod drugih grupa. Faktor 1 i 5 su dodatni faktori, koji potvrđuju dokazivanje serološke specifičnosti *S. Typhimurium* (202).

Geni potrebni za biosintezu O bočnog lanca se razlikuju među serovarijetetima iz razloga što svaki sadrži različite šećerne molekule i hemijske veze u sastavu lanca ponavljajućih oligosaharida. Ipak postoje i sličnosti u genima ispitanih serovarijeteta. Grupa čiji su proizvodi uključeni u ove biohemijske reakcije sadrži dvadesetak gena u okviru *rfb* lokusa (202).

„O“ antigenska komponenta ima bitnu ulogu i u interakciji sa organizmom domaćina tokom patogeneze bolesti. Struktura i imunogenost O lanca bitno utiče na sposobnost humoralnog imunskog sistema da razvije odgovor tokom infekcije, kao i na interakciju sa fagocitnim ćelijama (202).

Uloga LPS-a u virulenciji salmonela i pri njihovom preživljavanju u svom prirodnom staništu je poznata dugo vreme. LPS je potreban za kolonizaciju creva, rezistenciju na komplement u serumu, kao i za invaziju i preživljavanje bakterija u makrofagima. Gubitak O antigena kod rapavih sojeva dovodi do smanjenja virulence. Mutanti sa defektnim spoljašnjim delom unutrašnjeg oligosaharida i O antigena su pokazali veću osetljivost na deterdžente (žučne soli), polimiksin B i komplement u serumu nego divlji sojevi (132).

Odstupanja u virulenciji različitih serovarijeteta kod pojedinih vrsta životinja su dobro poznate, a varijabilnost O antigena dokazano igra ulogu u tome. Izvedeno je niz eksperimenata zamene gena metodom transdukcije pri čemu je izmenjen soj *S. Typhimurium* (serovarijetet O:4,12) da nosi O antigen *S. Enteritidis* (O:9,12) i *S. Montevideo* (O:6,7). Soj sa antigenima O:6,7 imao najmanju virulenciju, a virulencija bakterije sa O-9,12 antigenima je bila srednjeg intenziteta u odnosu na izvorni soj (233).

2.3.1.2 Struktura i funkcija polisaharidne kapsule kod salmonela

Jedini pravi kapsularni polisaharid kod salmonela je Vi antigen. Otkriven je 1934. godine i naziv je dobio zbog njegove veze sa virulencijom. Predstavlja negranajući homopolimer α -1,4-(2-deoksi)-2-N-acetilgalaktozaminuronske kiseline. Geni potrebni za njegovu sintezu se nalaze na *visB* regionu genoma u okviru ostrva patogenosti salmonela broj 7 (*eng.*: *Salmonella* pathogenicity island – SPI) koji je odsutan kod većine serovarijeteta salmonela. Proizvode ga isključivo sojevi *S. Typhi* i *S. Paratyphi C*, kao i određeni izolati *S. Dublin* i *Citrobacter freundii* (202).

Salmonele koje poseduju ovaj antigen, mogu da ne aglutiniraju sa „O“ antiserumom. Aglutinacija na pločici sa „O“ antiserumom može da se uspešno

izvodi isključivo nakon zagrevanja suspenzije salmonela 60 minuta na 100 °C, pri čemu se otkrije specifičan „O“ antigen koji se inače nalazi ispod kapsularnog (184). Pri infekciji Vi polisaharid smanjuje opsonizaciju sprečavanjem vezivanja C3b komponente komplekta (249).

2.3.1.3 *Fimbrije salmonela*

Ekspresija fimbrija kod salmonela opisana je sredinom XX veka (121).

Fimbrije učestvuju u procesu kolonizacije creva i preživljavanja salmonela intracelularno (121). Osnovna funkcija im je početna adhezija za membranu enterocita, koja prethodi čvršćem vezivanju posredstvom sekrecionog sistema tipa tri (TTSS-3). Dok se vezivanje preko fimbrija može smatrati reverzibilnim, kontakt koji uspostavlja TTSS-3 je ireverzibilan (158)

Raznolikost ovih površinskih struktura je pobudila interesovanje istraživača i za razvijanje metoda za detekciju fimbrija u cilju identifikacije ovih bakterija. Na primer običan lateks aglutinacioni test za detekciju fimbrije SEF 14 pokazao se uspešnim u detekciji serokonverzije pilića zaraženih serovarijetetom Enteritidis (152). Brzi razvoj molekularnih tehnika nakon tog perioda, međutim, potisnuo je dalja istraživanja na ovom polju.

2.3.1.4 *Flagele salmonela*

Protein flagelina predstavlja H antigen u okviru Kaufmann-White-Le Minor šeme za serotipizaciju salmonela. Osnovno telašce i zglobovi flagele su znatno složenije strukture kod salmonela nego kod ostalih bakterija (121).

Dužina flagela kod salmonela iznosi od 16 do 22 μm (157). Filament flagele je osetljiv na nizak pH, ureu i druga sredstva koja dovode do denaturacije. Svi ovi faktori dovode do njegove brze disocijacije.

Bazalni zglobovi se nalaze pri osnovi flagele, a u njegov sastav ulazi takođe jedna proteinska subjedinica čija molekularna masa kod salmonela iznosi 42 000. Fizičko-hemijske osobine polimera zgloba, kako i same subjedinice se razlikuju od svojstava flagelina, ovi molekuli ispoljavaju mnogo veću rezistenciju ka denaturirajućim agensima i niskim pH vrednostima. Bazalno

telašce flagela je najsloženiji deo organele i sastoji se od različitih delova (104). Slično zglobu, bazalno telašce je srazmerno otporno na disocijaciju i lako se može odvojiti od filameta (224).

Genetska osnova strukture i funkcije flagela

Analizom genoma *S. Typhimurium* otkriveno je da najmanje 50 gena su uključeni u formiranje strukture flagele i njihov veći deo se nalaze na tri područja hromozoma označenih rimskim brojevima I, II i III. Geni povezani sa faznom varijacijom stoje odvojeni u H2 regiji genoma (121).

Ekspresija flagela kod salmonela je proces koordinisan brojnim sistemima regulacije. Geni koji pripadaju takozvanoj klasi I su glavni regulacioni geni (*flhDC*), a geni koji aktiviraju strukturne gene bazalnog telašca i zgloba flagela pripadaju klasi II. Među produktima grupe II postoji i alternativni sigma faktor FlgM koji koči aktivaciju gena III grupe. Nakon završetka svoje izgradnje kompleks zglob-bazalno telašce funkcioniše kao sekrecioni sistem koji omogućava izlazak molekula FlgM iz ćelije, čime se otvara put pred faktorom FliA koji pokreće transkripciju strukturnih gena klase III pod kontrolom kompleksa *CAP cAMP*, to je operon koji je potreban za kontrolu svih ostalih flagelarnih operona (165). Prema tome stvaranje flagela predstavlja samoregulirajući proces, koji zavisi od izgradnje bazalnog telašca i zgloba, koja mora da prethodi slaganju filameta.

Pored autoregulacije, na sintezu flagela utiču i spoljni faktori. Žučne soli i fosfolipidi dovode do aktivnosti brojnih gena salmonela, koji su povezani sa eksprimiranjem i funkcijom flagela (183, 223).

Ekspresija flagelina je smanjena kod oba biotipa serovarijeteta Gallinarum (Gallinarum i Pullorum) specifično adaptiranih na ptice, a to je posledica delecije u ključnim genetskim komponentama (227). Razlog ovog gubitka nije potpuno jasan, ali se zna da je u vezi sa izbegavanjem imunskog sistema domaćina. Osim toga rezultati ispitivanja ukazuju na činjenicu da je nedostatak ovih organela povezan sa tifoidnom formom bolesti koji ovaj serovarijetet

karakteristično izaziva kod ptica. Naime, nedostatak flagelina smanjuje inicijalno zapaljenje i prepoznavanje patogena, a time favorizuje razvoj sistemske infekcije (35).

Ekspresija flagela nije ista kod različitih serovarijeteta salmonela. Kod većine serovarijeteta koje eksprimiraju ove organele postoji dva različita flagelarnih antigena označenih sa H1 i H2, koji su vezani za flagelarnu fazu 1 i 2 (121). Flagelarni antigeni bifaznih serovarijeteta *S. enterica* su fazno promenljivi. Ovu pojavu je prvi opisao Andrewes 1922. godine nakon zapažanja dve antigenski različite populacije pri serološkoj ispitivanju bakterija poreklom od istog izolata. Lederberg i Iino (138) su kasnije dokazali da antigeni odgovorni za ovu različitost su upravo flagelarni, a frekvencija promene između dve faze iznosi oko 10^{-3} - 10^{-5} bakterija po generaciji. Monofazne salmonele ne pokazuju ovo svojstvo. Predstavnici bifaznih serovarijeteta su sposobne da menjaju ekspresiju gena između subjedinica flagelina *fliC* (faza 1) i *fljB* (faza 2). Proces se sprovodi pomoću *fljA* i *hin* gena koji se nalaze sa jedne i druge strane *fljB* obezbeđujući regulacioni sistem koji radi po principu preklopnika. Ovaj mehanizam omogućava naizmeničnu ekspresiju flagelarnog antigena faze 1 i faze 2, što znači da na površini jedne bakterijske ćelije u određenom trenutku su prisutne samo flagele jedne faze (225).

Antigenske razlike flagela potiču iz promena u sekvenci aminokiselina u predelu flagelina koja je okrenuta ka spolja u sastavu flagele, dok distalni kraj peptida, koji je odgovoran za međusobnu vezu subjedinica, ostaje sačuvan, jer bi se inače poremetili izgradnja i oblik filamenta (121).

Imunski odgovor domaćina na flagele

Flagele su najzastupljeniji i najpristupačniji antigeni na površini salmonela. Samim tim lako se prepoznaju od strane imunskog sistema domaćina. Predstavljaju glavni antigen za aktivirane CD4+ T limfocite miševa i živine (207). Flagelin salmonela je jak stimulator imunskog sistema i snažno aktivira medijatore zapaljenske reakcije, kako *in vivo* tako i *in vitro* kod sisara i ptica (255). Flagelin, u svom monomernom obliku, predstavlja molekulski obrazac asociran sa patogenima (*pathogen associated molecular pattern* - PAMP), koji se vezivanjem za TLR-5 direktno pokreće imunski odgovor (89, 255).

2.4 Specifičnosti genoma roda *Salmonella*

Pretpostavlja se da su se salmonele razdvojile od zajedničkog pretka - *Esherichia coli* pre oko 100 miliona godina. Uporedna ispitivanja njihovih genoma pokazala su značajni stepen sličnosti, čak i velika podudarajuća područja. Ipak, konzervirani delovi genoma su isprekidani sekvencama jedinstvenim za jednu ili drugu vrstu. Na osnovu ovih zapažanja geni u okviru genoma ovih bakterija dele se na suštinske (*eng.*: core), suštinsko-varijabilne (*eng.*: core-variable) i one varijabilne sa akcesornim funkcijama. Suštinske funkcije su zajedničke za vrstu i njene bliske srodnike (u ovom slučaju za dva roda u okviru iste familije bakterija). Smatra se da u ovu grupu spadaju funkcije značajne za rast i replikaciju. Suštinsko-varijabilne funkcije su bitne za određenu vrstu ili filogenetsku liniju u datoj ekološkoj niši, ali ne moraju biti prisutni kod svih taksona. Akcesorne funkcije obezbeđuju prednost pojedinom izolatu u njegovom specifičnom staništu. Većina gena, koji kodiraju akcesorne funkcije, dospeva u genome bakterija posredstvom lizogenih faga i prenosivih plazmida i zbog toga kako ih bakterija brzo dobije, tako brzo mogu iz nje nestati (9).

Kod roda *Salmonella* veliki broj specifičnih gena se nalaze na velikim, jasno ograničenim genomskim predelima, koji sadrže profagne elemente i specijalizovane lokuse nazvane „ostrva patogenosti salmonela“ (*eng.*: *Salmonella*

pathogenicity islands - SPIs) (149). Ovi geni specifični za salmonele obezbeđuju razne funkcije potrebne za ispoljavanje virulencije (12).

2.4.1 Određivanje suštinskog i akcesornog dela genoma salmonela

Upoređivanjem *S. Typhimurium* LT2, *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* opisano je da konzervirani geni među serotivarijetetima salmonele pokazuju približno 99% poklapanje na nivou nukleotida. Kada je komparacija vršena sa *S. bongori*, odnosno sa *E. coli* podudarnost je opala na 91%, odnosno 80% (75, 179). Ispitivanjem sekvenci koje se razlikuju između pojedinih bakterija postalo je moguće odrediti skup zajedničkih, to jest suštinskih gena, a takođe su otkriveni i geni koji su specifični za određeni izolat, prema tome smatraju se akcesornim. Na osnovu rezultata istraživanja koje je obuhvatilo 35 serovarijeteta *Salmonella*, procenjuje se da skup suštinskih gena uključuje 2811 gena, dok se celokupni genom sastoji od više od 10000 gena (43). Čak i u slučaju izolata istog ili veoma srodnih serovarijeteta postoji od 1 do 5% gena koji su specifični za dati soj. Navedeni podaci ukazuju na prilično konzervirani genom salmonela, naročito ako se uporede sa istim pokazateljima vrste *E. coli*, čiji genom je slične veličine kao kod *Salmonella* (~4.5-5.7 Mb), a kod koje je suštinski genom uključuje samo 1472 do 2200 gena, dok celokupni genom sadrži preko 13000 gena (9).

Analizom genoma salmonela, *E. coli* i *Shigella*, urađen je pokušaj rekonstrukcije horizontalnih prenosa gena u filogenetskom stablu ovih vrsta. Određen je verovatan sled događaja koji su doveli do nastanka trenutnog sastava genoma *Salmonella*. Najinteresantnije je bilo, posmatrajući funkcije delova DNK za koje se pretpostavlja da su dospeli u genom putem horizontalnog transfera (*eng.*: putative horizontally acquired - PHT), da je tokom novijih etapa njihove evolucije preovladavala integracija bakteriofaga, dok su u ranijim fazama njihove evolucije dominirali procesi prisvajanja gena odgovornih za metaboličke funkcije i faktore virulencije. Svakako treba uzeti u obzir da u genomu ostaju sačuvani samo oni geni čije su funkcije od prednosti za salmonele (176, 236).

Geni u okviru suštinskog dela genoma su odgovorni za većinu metaboličkih puteva i omogućavaju kolonizaciju crevnog trakta i iskorišćavanje hranljivih sastojaka dostupnih u datom ekosistemu.

Upoređivanjem *S. bongori* i *S. Typhi*, koji se smatraju genetski najudaljenijim predstavnicima roda, nađeno je malo razlika u metaboličkim putevima. Interesantna razlika među njima je sposobnost biosinteze vitamina B₁₂ kod *S. Typhi*, dok *S. bongori* nema ovu sposobnost. Značaj vitamina B₁₂ endogenog porekla je dokazan pri preživljavanju *S. Typhi* u makrofagima, sredini u kojoj *S. bongori* ne može opstati (131). Suprotno, *S. bongori* poseduje sposobnost razlaganja laktoze. Kompletan *lac* operon je među salmonelama još prisutan samo kod *S. enterica* ssp. *arizonae* i *diarizonae*, mada slaba konzervacija gena i njihovo mesto insercije kod njih ukazuju na to, da su tu osobinu stekli nezavisno od *S. bongori* (88).

2.4.2 Gubitak funkcionalnosti gena

Pored sticanja novog genetskog materijala, gubitak samih gena, odnosno njihove funkcionalnosti takođe doprinosi fleksibilnosti genoma salmonela. Značaj ove pojave kod bakterija se istražuje ispitivanjem prisustva i prirode pseudogena. Pseudogen predstavlja entitet u okviru genoma kod kojeg je, u delu koji kodira polipeptidni lanac, prisutan prerani stop kodon- mutacija (interna delecija, insercija) zbog koga transkripcija ili translacija tog gena nije moguća.

Analizom genoma *S. Typhi*, serovarijeteta striktno adaptiranog na ljude, otkriveno je prisustvo preko 200 pseudogena. Kod *S. Typhimurium* taj broj iznosi samo oko 25 (Tabela 4, preuzeto iz reference 9). Raspored pseudogena u genomu *S. Typhi*, pri tome, nije slučajan. Veliki broj gena koji su izgubili funkcionalnost kod *S. Typhi*, nalazi se sa neoštećenom funkcijom kod salmonela sa širokim spektrom domaćina, kao što je *S. Typhimurium*, i nose važne funkcije virulencije ili su neophodni u interakciji sa ćelijama domaćina (149).

U istraživanjima je dokazano da je pojava pseudogena obično povezana sa smanjenjem broja različitih vrsta domaćina i sa izazivanjem invazivne forme bolesti. *S. Paratyphi* uzrokuje oboljenje slično tifusu i ima brojne pseudogene među kojima su i mutirani geni koji kodiraju proteine efektore sekrecionog sistema tipa III (type 3 secretion sistem – T3SS) koji ima važnu funkciju u razvoju proliva ili sistemske bolesti (122).

Slična kombinacija gubitaka gena se zapaža i kod *S. Choleraesuis*, koja retko dovodi do dijareje, zatim kod *S. Gallinarum* uzročnika kokošijeg tifa. U ovim slučajevima svoje funkcije su lišeni geni uključeni u kolonizaciju creva (122, 149).

Tabela 4: Uporedni prikaz opštih karakteristika genoma odabranih predstavnika *S. enterica* subsp. *enterica* i *S. bongori* (9).

| Naziv | <i>S. bongori</i> | <i>S. Typhi</i> | <i>S. Typhi-murium</i> | <i>S. Enteritidis</i> | <i>S. Gallinarum</i> | <i>S. Choleraesuis</i> | <i>S. Paratyphi A</i> |
|---------------------------------|-------------------|-----------------|------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| Podvrsta | V | I | I | I | I | I | I |
| Soj | 12419 | CT18 | LT2 | P125109 (PT4) | 287/91 | SC-B67 | SARB42 |
| Veličina genoma u kb | 4460 | 4809 | 4857 | 4685 | 4658 | 4755 | 4585 |
| G+C sadržaj u % | 51,33 | 52,09 | 52,22 | 52,17 | 52,20 | 52,11 | 53,00 |
| Kodirajući regioni DNK | 3945 | 4599 | 4451 | 4320 | 4274 | 4445 | 4263 |
| Pseudogeni | 78 | 204 | 25 | 112 | 309 | 151 | 173 |
| Gustina kodirajućih regiona u % | 86.0 | 87.6 | 86.8 | 85.5 | 79.9 | 83.9 | 82.5 |
| Broj tRNK | 84 | 78 | 85 | 84 | 75 | 85 | 82 |
| Profagi | 5 | 7 | 6 | 1(5) | 0(2) | 5 | 3 |

Nisu samo geni virulencije obuhvaćeni ovom pojavom. *S. Typhi*, *S. Paratyphi* i *S. Gallinarum* nose nezavisne mutacije na genima sa funkcijama u osnovnom metabolizmu, kao što je sinteza vitamina B₁₂, korišćenje propandiola i respiracija pomoću tetracionata (97, 150, 227). Salmonele mogu proizvesti endogeni B₁₂, koji ima ulogu kofaktora pri energetski efikasnom razgradnjom

1,2-propandiola, a to u nastavku omogućava korišćenje tetracionata kao krajnjeg akceptora elektrona (199). Kod *S. Typhimurium* 1,2-propandiol predstavlja važan izvor energije. Mutanti ovog serovarijeteta koji ne mogu da ga koriste imaju znatno smanjenu sposobnost rasta u makrofagima(131).

Štaviše, sposobnost iskorišćenja tetracionata nastalog prirodno u lumenu creva tokom zapaljenskog procesa dokazano obezbeđuje kompetitivnu prednost *S. Typhimurium* pri nadržavanju drugih prisutnih mikroorganizama. Respiracija pomoću tetracionata u ovoj situaciji čak omogućuje upotrebu etanolamina kao izvora hranljivih materija. Etanolamin slabo pospešuje fermentativan rast, ali je uvek prisutan u crevima zdrave teladi, tako da ovaj metabolički put olakšava *S. Typhimurium* da kolonizuje ovo stanište (226).

2.4.3 Varijabilan deo genoma i njegovo poreklo kod salmonela

2.4.3.1 Ostrva patogenosti salmonela (SPI)

Genetska ostrva koja nose gene virulencije kod salmonela se tradicionalno zovu ostrvima patogenosti salmonela (*eng.*: Salmonella pathogenicity islands – SPIs) (245). Primetno je da je većina ovih regija postala deo genoma salmonela tokom rane evolucije *S. enterica* (10, 208)

2.4.3.2 Profagi i drugi varijabilni elementi

Određeni bakteriofagi nakon što inficiraju bakteriju domaćina, ugradnjom u njen genom, prelaze u lizogeno stanje i zatim se stabilno održavaju tokom mnogo generacija domaćina. Svi do sada sekvencirani genomi salmonela su polilizogeni, sadrže 3-5 ugrađenih bakteriofaga koji se nazivaju profagima. Pored njihove uloge u uopštenoj genetskoj raznolikosti salmonela, bakteriofagi često služe i kao vektori za prenošenje gena koji utiču direktno na virulenciju inficirane bakterije, procesom takozvane lizogene konverzije (251). *S. Typhimurium* nosi nekoliko lizogenih bakteriofaga (71). Na primer, gen *sopE*, koji kodira jedan T3SS efektor protein, kao i *sodC* koji je izvor jedne periplazmatske superoksid dismutaze sa sadržajem Cu i Zn, koja štiti bakteriju od oksidativnog stresa, poreklom su od bakteriofaga. U slučaju velikog broja

gena prenesenih fagima je dokazan njihov uticaj na povećanje patogenosti i u *in vitro* uslovima, i na mišjim i goveđim modelima (9, 71). Kratkoročni uticaj bakteriofaga na funkcije domaćina je ispitan na divljim sojevima salmonela. Tokom osamdesetih i devedesetih godina prošlog veka pojavio se *S. Typhimurium* definitivni fagotip 104 (DT104) kod goveda koji je bio virulentniji nego „običan“ soj *S. Typhimurium* i koji je bio rezistentan na nekoliko klasa antibiotika i koji se sa goveda proširio na ljude najpre u Engleskoj a potom i u gotovo svim ostalim državama EU. Od 2000. godine MDR (multidrug resistant, multirezistentna) *S. Newport* rezistentan na cefalosporine predstavlja 90% izolata ovog serovarijeteta kod goveda. Komparacijom genoma MDR sojeva salmonela i sojeva salmonela koji su osetljivi na sve antibiotike, otkriveni su specifični gene i genski lokusi koji potiču sa bakteriofaga (41, 173, 206).

2.4.4 Primenjivost genomike salmonela u epizootiološkim istraživanjima

Poslednjih godina postoje mnogobrojni pokušaji da se saznanja o karakteristikama genoma salmonela primene i u identifikaciji serovarijeteta salmonela.

Prvi primer predstavlja ispitivanje sojeva *S. Enteritidis* (fagotipovi PT30 i PT9c) koji su izolovani tokom tri različite epidemije salmoneloze uzrokovane presnim bademima u SAD, Kanadi i Švedskoj (150). Sprovedena molekularna karakterizacija izolata dobijenih iz uzoraka badema i kliničkih izolata pokazala su određene razlike između različitih fagotipova, ali ne i među sojevima istog fagotipa. Mada su genotipski svi izolati koji su pripadali fagotipu PT30 bili identični, analizom njihovih metaboličkih svojstava utvrđeno je, da su klinički izolati efikasnije koristili neke aminokiseline od predstavnika istog fagotipa poreklom iz badema. Tokom druge studije (101) vršeno je poređenje genotipova 148 sojeva serovarijeteta *S. enterica* ssp. *enterica* serovar 4,(5),12:i:- izolovanih iz svinja, svinjskog mesa i uzoraka poreklom od obolelih ljudi. Identični PFGE profili pokazali su visoku srodnost ovih izolata različitog porekla, što potvrđuje njihovo prenošenje duž lanca ishrane.

DNK micročipovi su zbog njihove prilično jednostavne upotrebe zgodni i za obradu velikog broja uzoraka, na primer u serotipizaciji salmonela. Trenutno najveći broj referentnih laboratorija za salmonele vrše podelu salmonela na serovarijetete prema antigenim formulama White-Kauffmann-Le Minor šeme, koje se baziraju na serološkoj varijaciji površinskog O-antigena lipopolisaharidne komponente spoljašnje membrane i na ekspresiji flagelin antigena faze 1 i 2. Pri konstruisanju DNK mikročipova za grupisanje sojeva po istoj šemi korišćena je varijabilnost unutar *rfb* klastera gena, *fljB* i *fliC* gena i kapsularnog polisaharidnog antigena Vi. Autori su imali cilj da se zameni klasična serotipizacija sa molekularnom sero-genotipizacijom 100 najprevalentnijih salmonela serovarijeteta u Severnoj Americi i Evropi (76).

Sekvenciranje celog genoma upotrebom molekularnih metoda nove generacije (*eng.*: next generation sequencing - NGS) visokog kapaciteta postaje sve uobičajenije kako mu se troškovi smanjuju. Ove tehnike pružaju izvanredne mogućnosti za istraživanje porekla i evolucije bakterijskih patogena u slučajevima pojave infekcije. Ovaj pristup je korišćen, na primer, za praćenje *S. Typhi* u Indoneziji, pri čemu pomoću poznatog polimorfizma nukleotida raspoređenog po genomu ovog, inače u osnovi izrazito klonalnog patogena određen je haplotip 140 izolata (16).

2.5.Preživljavanje salmonela u spoljašnjoj sredini

Stepen preživljavanja salmonela u spoljašnjoj sredini zavisi od stepena isušivanja, prisustva i razlaganja organskih materija, prisustva dezinficijensa, itd. Salmonele reaguju na razne načine na fizički, hemijski i biološki stres, odnosno na nedostatak hrane. Kod salmonela, slično mnogim drugim bakterijama, jedan od generalnih odgovora na stres predstavlja njihova takozvana „SOS“ reakcija (65). Osnovni efekat ove reakcije je odlaganje deobe ćelije, pri čemu se istovremeno pojačavaju funkcije vezane za replikaciju i ispravku oštećene DNK. Pri ovoj reakciji, na primer kod salmonela u hrani, zbog izostanka deobe zapažen je razvoj filamentoznih oblika bakterija. Kada se

uslovi sredine poboljšaju, u ovim formama se pojavljuju pregrade i bakterije se brzo dele, što dovodi do naglog povećanja ukupnog broja bakterija (103).

Aktivnost vode, osmotski stres i isušivanje

Zaštita od osmotskog stresa prvenstveno obuhvata nakupljanje kalijumovih jona u ćeliji posredstvom glutamata. Ako ovo nije moguće, zbog aktuelne koncentracije kalijuma u sredini, bakterije unose ili sintetišu jedinjenja kao što su trehaloza, trimetilglicin ili prolin i dolazi do promena na porinima u spoljašnjoj membrani čime bakterija reguliše poremećeni osmotski pritisak (201).

Kada se aktivnost vode (a_w) smanjuje na 0,92-0,95 salmonele prestanu da se dele i obrazuju filamentozne oblike u hranljivom bujonu. Smanjena aktivnost vode štiti salmonele od visokih temperatura i oksidativnog stresa (129).

U slučaju *S. Enteritidis* za preživljavanje u uslovima isušivanja opisan je značaj O-antigena kapsule, čija hemijska struktura je ista kao kod somatskog „O“ antigena (28, 80, 237). Naročito se povećava termorezistencija *S. Typhimurium* nakon sporog isušivanja. Salmonele opstaju duže na suvim, hladnim mestima zaštićenim od svetla. Obrnuto, vlažnost, visoka temperatura i prisutna druga mikroflora otežavaju njihovo preživljavanje.

Termički stres

Na podlogama salmonele rastu u temperaturnom opsegu od 5 do 47 °C, a optimalna temperatura im je 37°C. Na njihovu osetljivost na termički stres znatno utiču uslovi sredine. Na primer vreme decimalne redukcije (D vrednost) salmonela na 71 °C iznosi nekoliko sekundi u tečnoj podlozi ali u hrani za životinje kreće se čak između 4,5 i 6,6 minuta (19). U matriksima bogatim mastima i belančevinama ova vrednost je takođe veća, što je razlog pojave infekcije putem hrane u onim slučajevima, kada se termička obrada smatrala adekvatnom (77). Na salmonele nepovoljan uticaj ima kolebanje temperature, posebno zamrzavanje i odmrzavanje, što dovodi do brzog smanjenja broja salmonela. Smrzavanje neće uništiti salmonele, mada može da ih ošteti, što po

odmrzavanju uslovljava odložen ili usporen rast. Iste efekte može da ima i zagrevanje na subletalnim temperaturama. U izmetu slabije preživljavaju na -20 °C nego na -80 °C (231) .

Podaci o preživljavanju salmonela u različitim uslovima sredine prikazani su sumarno u Tabeli 5.

Tabela 5.: Preživljavanje određenih serovarijeteta *Salmonella* u ili na raznim matriksima pod različitim uslovima sredine (prema referenci 240).

| Matrix | Serovarijetet | Uslovi | Nivo kontaminacije | Preživljavanje | Napomena |
|-------------------------|---------------|--|--|--|---|
| Agar | Typhi | Sobna temperatura, zatvorene epruvete | | Preko 40 godina | |
| Triptozni bujon | Typhimurium | 58 °C | $1-3 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ | D vrednost 0.48-0.59 min. (10 sojeva) | Stacionarna faza rasta |
| Bujon - srčana infuzija | Typhimurium | 60 °C | 10^7 ml^{-1} | D vrednost 0.2-0.9 min. (14 sojeva) | Resuspendovana stacionarna faza |
| Čokolada | Typhimurium | 20 °C, a_w 0.37 | $1.1 \times 10^5 \text{ 100 g}^{-1}$ | 83 dana | |
| | Typhimurium | 70 i 90 °C | | D vrednost (min) 70 °C: 720; 90 °C: 75 | Mediana D vrednosti |
| Kolostrum krave | Typhimurium | 30 °C (pH 6,4-4,4) | 10^7 cfu ml^{-1} | >35 dana | Naglo smanjenje broja ispod pH 4.45 |
| | Dublin | 30 °C (pH 6,4-4,3) | | >5, < 14 dana | |
| Celo sveže jaje | Enteritidis | 4 i 25 °C | Oko 10^7 cfu | 4 °C: >270, <365 dana ; 25 °C: >365 dana | |
| | Typhimurium | 4 i 25 °C | Oko 10^7 cfu | 4 °C: >180, <270 dana ; 25 °C: >365 dana | |
| Izmet živine | Typhimurium | Svež, 19 °C (pH 8,9) i 5-8,9 °C (pH 8,1-8,9) | 10^8 cfu ml^{-1} | 19 °C: < 6 dana; 5-8,9 °C: >12, < 25 dana, | Svila umočena u suspenziju salmonela i stavljena u izmet. |
| Goveđi izmet | Typhimurium | 18-20°C | Suspenzija kolonije u količini od jedne omče | Svež: < 6 dana; autoklaviran 152 dana | |
| | | Sasušeno | | ≥ 1000 dana | |

Tabela 5. nastavak

| Matrix | Serovarijetet | Uslovi | Nivo kontaminacije | Preživljavanje | Napomena |
|------------------------------|---------------|---------------------------|--|---|---|
| Izmet glodara | | | | 148 dana | |
| Smeša za ćurke | Enteritidis | 82°C, 15% vlage | | Smanjenje broja za 3 log tokom 47 s | Veštačka kontaminacija |
| Staklo | Schottmulleri | 4 i 45°C, sasušeno | Oko 5×10^7 cfu | 4°C: 99 dana; 45°C: 56 dana | S. Typhi preživela mnogo kraće |
| Paperje pilića iz inkubatora | Senftenberg | Sobna temperatura | Prirodna kontaminacija | ≥ 1484 dana | Skladišteno u polietilenskim kesama |
| Sladoled | Typhimurium | -28 °C | $8,2 \times 10^3$ g ⁻¹ | Smanjenje broja za 1.3 log nakon 35 meseci | |
| Parafinsko ulje | Typhimurium | 25 °C | | 2 godine 6 meseci | Čvrsta podloga pokrivena uljem |
| Pašnjak | Typhimurium | Leto u Novom Zelandu | 2×10^7 cfu 25cm ⁻² | >70, < 84 dana | Postavljen u obliku suspenzije u fecesu |
| Pšenični griz | Typhimurium | 25 °C, sasušeno | 23 cfu g ⁻¹ | ≥ 360 dana | Veštačka kontaminacija |
| Goveđa osoka | Typhimurium | 1-6 °C i 18-20 °C, pH 7.0 | 3×10^7 ml ⁻¹ | 1-6 °C: 70-84 dana 18-20 °C: 140-154 dana | |
| Svinjska osoka | Typhimurium | 1-6 °C i 18-20 °C, pH 7.0 | 3×10^7 ml ⁻¹ | 1-6 °C: 150-364 dana 18-20 °C: 182-196 dana | |
| Prašina na metli | | | | 300 dana | |
| Različito povrće i površine | Typhimurium | i sobna temperatura | Oko 8×10^4 cfu cm ⁻² | Frižider 35-77, mediana 49 dana Sobna t.; 21-49, mediana 28 dana | |

a_w = aktivnost vode; cfu = colony-forming unit; D vrednost = vreme decimalne redukcije, min = minut; s= sekunda

Uticao hemijskih sredstava

U eksperimentalnim uslovima bakterije se najčešće štite od hemijskih stresora oksidativnim reakcijama posredstvom hlora. Rezistencija, koju ovaj proces razvija povezana je i sa otpornošću na druge nepovoljne uslove sredine, kao što su oksidativni stres i nedostatak nutrienata (129). Jaka oksidativna zaštita salmonela smatra se posledicom njihove adaptacije za preživljavanje intracelularno u makrofagima (90). Stvaranje biofilma dokazano štiti salmonele od nepovoljnog delovanja hlornih preparata (135).

Radijacija

Mada UV zraci imaju štetniji direktni uticao na bakterije od vidljivog spektra, u prirodnim uslovima vidljiva svetlost dovodi do značajnijeg smanjenja broja salmonela u odnosu na UV. Upotreba UV zračenja je uobičajena praksa u tretiranju vazduha i pijaće vode u cilju uništavanja bakterija (95). U veštačkim uslovima UV zraci i pulsirajuća vidljiva svetlost visokog intenziteta imaju veoma negativno dejstvo na salmonele, tako da su pogodni za dekontaminaciju bistrih tečnosti i površine jaja i mesa (136, 172).

Nedostatak nutrienata

Gladovanje kod salmonela dovodi do prelaska u takozvano vijabilno, ali nekulturable (eng.: Viable but non-culturable - VBNC) stanje, kada bakterijske ćelije sačuvaju svoje vitalne funkcije, ali njihovo prisustvo se ne može utvrditi kultivacijom na klasičnim hranljivim podlogama. Postoje, međutim dokazi za njihov aktivni metabolizam u vidu izduživanja ćelije pri prisustvu adekvatnih hranljivih materija, zatim odvijanje respiracije se takođe može utvrditi. U ovom stanju otpornost salmonela na nepovoljne uslove sredine je značajno povećana (118, 151).

Predatorstvo i kompeticija

Preživljavanje salmonela u mnogome zavisi od mikrobiološke flore prisutne u datoj mikrosredini. Kako postoji rivalitet među bakterijama u iskorišćavanju kiseonika i hranljivih materija, dolazi i do lučenja štetnih materija, na primer

organskih kiselina, antibiotika i bakteriocina koji za cilj imaju ubijanje konkurenata u datom okruženju. Litički bakteriofagi takođe smanjuju broj salmonela u uzorcima poreklom iz životne sredine (120). Na značaj drugih bakterija i virusa za preživljavanje salmonela u određenoj sredini ukazuju i ispitivanja preživljavanja salmonele u uzorcima zemljišta: najkraće su opstale salmonele u zemlji obogaćenog stajskim đubrivom, nešto duže one u netretiranom uzorku, dok salmonele najduže opstaju u sterilisanom zemljištu (77). Ipak, pored negativnog efekta mikrobiote u sredini opisana je i pojava da salmonele preživljavaju unutar ameba i trepljastih protozoa što znatno povećava njihove šanse za opstanak (25). Salmonele duže preživljavaju u prašini nego u izmetu ili stelji. Zbog toga prašina iz objekta je često najadekvatniji matriks za dokazivanje prisustva ovih bakterija u jatru živine. Ova činjenica je u velikoj meri rezultat bolje sposobnosti salmonela za preživljavanje u suvoj prašini od ostalih mikroorganizama (252). U slučaju fabrika stočne hrane prašina je takođe najbolji uzorak za otkrivanje kontaminacije salmonelama. Pored pomenutog razloga, u ovom slučaju je od značaja i to, da prašina predstavlja, u stvari, zbirni uzorak svih sirovina, koje prolaze kroz proizvodnu liniju. Dokazano je, na primer, da intenzivno uzorkovanje i prašine, pored ostalih komponenata može da otkrije kontaminaciju koja je bi se previdela rutinskim monitoringom (45, 240).

2.6 Uloga vektora i rezervoara u održavanju i prenošenju salmonela

Glodari

Glodari su od potencijalne opasnosti po javno zdravlje, a njihovo prisustvo se smatra znakom nezadovoljavajućih higijenskih uslova. U gotovo svim slučajevima kada je salmonela nađena na farmama živine, isti serovarijetet je izolovan iz većine miševa nađenih na kontaminiranoj farmi (84). Eksperimentalno je dokazano da miševi koji su uneli u svoj organizam *S. Enteritidis* u broju od 10^3 CFU, postaju kliconoše tj. izlučuju salmonele pet

nedelja nakon infekcije, dok ako se infektivna doza poveća na 10^5 CFU kliconoštvo može trajati i osam meseci (186).

Uspešna deratizacija je veoma značajna mera pri eliminisanju salmonela iz objekata za uzgoj životinja, naročito živine (33).

Artropode

Insekti i akaride imaju ulogu kratkoročnih vektora u prenošenju salmonela. Na ovu njihovu ulogu ukazuju zapažanja pri ispitivanju eksterne i interne kontaminacije muva, tvrdokrilaca i njihovih larvi na farmama, zatim i eksperimentalno hranjenje pilića hranom koja prethodno bila kontaminirana zaraženim artropodama. Vektorska uloga insekata opisana je kod neposrednog prenošenja između objekata koji su locirani blizu jedni drugih, kao i pri prenošenju salmonela na veće udaljenosti posredstvom ptica, koje se hrane artropodama (241). Tvrdokrilci koji nastanjuju stelju u objektima posebno su značajni u širenju salmonela na farmama brojlerskih pilića i ćuraka, gde su turnusi učestali, a sa druge strane suzbijanje ovih artropoda je otežano (217). U Australiji je dokazano da je broj muva na farmama tovnih junadi u korelaciji sa ekskrecijom salmonele kod tovnih životinja (234).

Kod bubašvaba je takođe utvrđeno prisustvo salmonela (70), a njihova uloga je u kontaminaciji ljuske jaja, pri čemu se bubašvabe smatraju mehaničkim vektorom.

Dermanisus gallinae predstavlja biološki rezervoar salmonela. Ove vaši mogu da nose *S. Enteritidis* i do 14 dana, tokom kog vremena prenose infekciju na kokoške (232). U slučaju *S. Gallinarum* biovar *Gallinarum* taj period iznosi čak četiri meseca (171), tako da u ovom slučaju vaši predstavljaju značajan faktor u cirkulaciji ovog biotipa u jatima živine.

Ptice

Divlje ptice, pre svega insektivorne, uključene su u širenje salmonela na farmama domaćih životinja putem kontaminacije vode i hrane. Njihova uloga u prenošenju monofaznog serovarijeteta *S. Typhimurium* (S. 4,(5),12:i:-) sa farme

svinja na goveda i živinu je zapaženo u više navrata (46). Galebovi su opisani kao unosioци salmonela u pogone za proizvodnju ribljeg brašna (162), pri čemu ove ptice mogu preneti salmonele i na veće udaljenosti.

S. Typhimurium može dovesti do oboljevanja i uginuća ptica pevačica, pri čemu molekularna tipizacija izolata ukazuje na to da se radi o soju adaptiranom na ove domačine (102).

2.7. Kliničke manifestacije salmoneloza

Salmonelozni gastroenteritis

Većina serovarijeteta salmonela uzrokuje gastroenteritis kod ljudi, koji je ograničen na distalni deo ileuma, kolon i mezentrijalne limfne čvorove (188, 222, 256). Naseljavanje bakterija u ovim organima dovodi do pojavljivanja zapaljenske infiltracije u kojoj dominiraju neutrofilni granulociti. Ulazak neutrofila u pomenute delove creva dovodi do nekroze gornjeg sloja sluzokože i prisustva ovih ćelija u izmetu. Razvijanje karakterističnih simptoma tokom infekcije je većinom posledica zapaljenske reakcije kod domaćina. Dolazi do proliva, mučnine, povraćanja, grčeva u crevima i povećanja telesne temperature. Ovi znaci se pojavljuju veoma brzo nakon peroralnog unošenja uzročnika, prosečni inkubacioni period je manji od 24 časova (222).

Lokalizovane infekcije slične gastroenteritisu ljudi se javljaju i kod velikih životinja, goveda i konja. Serovarijeteti salmonela, za koje je karakterističan opisani vid bolesti, prenose se fekalno-oralnim putem, kako direktno, tako i putem zagađene hrane i vode (188).

Sistemske salmoneloze

a) Trbušni tifus ljudi

Manji broj serovarijeteta salmonela je sposoban za izazivanje sistemskih oboljenja u imunokompetentnom domaćinu. Među njima je najbolje opisana patogeneza tifusa ljudi, koji je jedan od najstrašnijih i najopasnijih bolesti u ovoj grupi. Mortalitet može da dostigne i 10% ako se ne leči. Uzročnik je serovarijetet *S. Typhi* koji je adaptiran isključivo na ljude. Nakon unošenja, uzročnik

naseljava sluzokožu tankih creva, a period inkubacije je prilično dug i iznosi prosečno čak dve nedelje (190).

Patološke promene u crevima se sastoje od sporog razvijanja infiltrata u kome dominiraju mononuklearne ćelije: makrofagi i dendritične ćelije, dok je broj neutrofilnih granulocita oskudan (163). Dospevanje uzročnika u žučnu kesu ili mokraćnu bešiku može dovesti do hroničnog kliconoštva, značajnog pri širenju bolesti sa čoveka na čoveka. Znaci trbušnog tifusa su najčešće nespecifični: povećanje telesne temperature, bradikardija. Splenomegalija, hepatomegalija i crveni osip se javljaju ređe. Proliv se javlja samo kod oko trećine obolelih i pojavi se kasnije, tek nakon nastupanja groznice.

S. Paratyphi A, zatim u ređim slučajevima *S. Paratyphi B* i *Paratyphi C*, izazivaju paratifus, bolest sličan trbušnom tifusu samo blažeg toka. Ova četiri serovarijeteta se nazivaju i tifoidnim salmonelama (222).

b) Bakterijemija kod ljudi

Dva netifoidna serovarijeteta, *S. Dublin* i *S. Choleraesuis*, izazivaju sistemsku infekciju kod imunokompetentnih osoba koja se može klinički razlikovati od trbušnog tifusa i naziva se bakterijemijom. Ovo oboljenje se takođe može javiti bez dijareje (69).

U slučaju osoba sa oštećenim imunskim sistemom bakterijemija predstavlja uobičajenu komplikaciju infekcija sa netifoidnim serovarijetetima salmonela koji inače kod imunokompetentnih ljudi obično izazivaju gastroenteritis (81). Najčešći uzročnici su i u ovom slučaju *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*.

c) Sistemske infekcije kod drugih vrsta

Kod imunokompetentnih životinja samo nekoliko serovarijeteta mogu izazvati sistemske infekcije. Među njima su *S. Gallinarum*, koji se može dalje podeliti u biotipove *Gallinarum* i *Pullorum* koji izazivaju sistemske infekcije kod živine: tif kokoši, odnosno beli proliv pilića (214). Sistemske infekcije kod svinja uzrokuje *S. Choleraesuis*, dok kod goveda *S. Dublin*. U slučaju konja *S. Abortusequi*, a kod ovaca *S. Abortusovis*, Pored navedenih serovarijeteta

poseban fagotip *S. Typhimurium*, koji se razlikuje od sojeva koji izazivaju gastroenteritis kod čoveka, dovodi do sistemske infekcije golubova (187).

Iako genetska osnova prilagođavanja salmonela određenoj vrsti životinja slabo je razjašnjena, strategije koje ovi serovarijeteti koriste najverovatnije uključuju sposobnost savladavanja prepreke sluzokože creva, što omogućava njihovo dalje širenje po telu. Serovarijeteti uzročnici gastroenteritisa nemaju ove faktore virulence (222).

2.8 Epidemiologija salmoneloze

Tokom proteklih deset godina, u državama evropske unije je najpre bio zabeležen statistički značajan trend opadanja slučajeva salmoneloze ljudi, a zatim poslednjih nekoliko godina je izražena stagnacija broja obolelih, odnosno ukupnog broja registrovanih epidemija. Najčešće izolovani serovarijeteti su bili *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, serovarijetet 1,4,[5],12:i:-, zatim *S. Infantis*. (Tabela 6).

Tabela 6: Učestalost salmoneloza kod ljudi u Evropskoj Uniji tokom prošle decenije (na osnovu podataka iz referenci 55-64)

| Godina | Ukupno slučajeva kod ljudi | Broj slučajeva na 100000 stanovnika | Najčešće izolovani serovarijeteti | | | | | |
|--------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------|------------------------|----------|-------|---------|
| | | | Enteritidis | Typhimurium | Mono-fazni Typhimurium | Infantis | Derby | Newport |
| 2008 | 131468 | 26,4 | 58,0% | 21,9% | / | 1,1 | 0,5 | 0,7 |
| 2009 | 108614 | 23,7 | 52,3% | 23,3% | / | 1,6% | 0,7% | 0,7% |
| 2010 | 99020 | 21,5 | 44,2% | 25,7% | 1,7% | 2,2% | 0,8% | 1,0% |
| 2011 | 95548 | 20,7 | 44,6% | 24,8% | 4,6% | 2,2% | 0,9% | 1,0% |
| 2012 | 94278 | 21,9 | 41,2% | 22,2% | 7,2% | 2,4% | 0,9% | 0,9% |
| 2013 | 82694 | 20,3 | 39,5% | 20,2% | 8,6% | 3,0% | 1,1% | 1,0% |
| 2014 | 88715 | 20,7 | 44,4% | 17,4% | 7,8% | 2,5% | 1,0% | 1,0% |
| 2015 | 94625 | 20,9 | 45,6% | 15,8% | 8,3% | 2,3% | 0,9% | 1,0% |
| 2016 | 94530 | 20,4 | 48,5% | 13,4% | 8,4% | 2,4% | 0,9% | 1,1% |
| 2017 | 91662 | 19,7 | 49,1% | 13,4% | 8,0% | 2,3% | 0,8% | 1,2% |

U Republici Srbiji salmonele takođe predstavljaju najfrekventnije uzročnike alimentarnih epidemija. Na osnovu podataka Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ incidencija salmoneloza je ustaljena sa umerenim

oscilacijama iz godine u godinu. Serovarijetet S. Enteritidis i u Srbiji dominira u slučaju infekcija ljudi. (Tabela 7).

Tabela 7: Podaci o salmonelozama ljudi u Srbiji (podaci su prikupljeni iz referenci 105 - 114).

| Godina | Ukupno slučajeva kod ljudi | Broj slučajeva na 100000 stanovnika | Najčešći uzročnik alimentarnih epidemija | |
|--------|----------------------------|-------------------------------------|--|--------------------|
| | | | Serovarijetet | Njegova učestalost |
| 2008 | 1766 | 23,91 | Enteritidis | 36,0% |
| 2009 | 2046 | 27,8 | Enteritidis | 70,0% |
| 2010 | 1722 | 23,5 | Enteritidis | 50,5% |
| 2011 | 1904 | 26,1 | Enteritidis | 60,3% |
| 2012 | 1550 | 21,6 | Enteritidis | 64,9% |
| 2013 | 1571 | 21,9 | Enteritidis | 65,8% |
| 2014 | 1512 | 21,1 | Enteritidis | 72,8% |
| 2015 | 1712 | 24,0 | Enteritidis | 43,8% |
| 2016 | 1589 | 22,5 | Enteritidis | 47,9% |
| 2017 | 1850 | 26,3 | Enteritidis | 62,5% |

2.9 Laboratorijska identifikacija salmonela

Poznato je da se protokoli za konvencionalnu izolaciju salmonela razlikuju od uobičajenih protokola izolacije većine drugih pripadnika porodice Enterobacteriaceae. Razlog za to je činjenica da se salmonele nalaze u relativno malom i teško detektabilnom broju u uzorcima poreklom od bolesnih životinja i ljudi. Stoga je neophodno najpre umnožiti salmonele iz ispitivanih uzoraka, odnosno, pristupiti takozvanom selektivnom obogaćenju salmonela. Pre faze selektivnog obogaćenja, salmonele se umnožavaju u takozvanoj puferizovanoj peptonskoj vodi u cilju njihove revitalizacije (u slučaju da je uzorak nepropisno čuvan i da je došlo do propadanja prisutnih salmonela). Nakon ove faze pristupa se selektivnom obogaćenju. Tokom proteklih decenija u mikrobiološkim priručnicima i standardima preporučivane su različite selektivne podloge za ovu fazu izolacije salmonela (Selenit F bujon, Tetrinationat bujon, Miler-Kaufman-Tetrinationat bujon, Selenit cistein bujon), ali danas su

gotovo sve preporuke jednoglasne u zahtevu za se za selektivno obogaćenje salmonela koristi Rapaport Vasilijadis bujon ili Rapaport Vasilijadis polučvrsti agar sa dodatkom novobiocina koji je pokazao najbolje rezultate. Treća faza izolacije salmonela je njihovo umnožavanje na diferencijalnim podlogama i za ovu fazu rada se u većini mikrobioloških standarda insistira na korišćenju XLD agara (ksiloza-lizin-dezoksiholat-dekstrozni agar), mada je dozvoljena primena i drugih diferencijalnih podloga (Mekonki agar, SS agar, Hektoen enterik agar itd). Četvrta faza izolacije salmonela jeste dokazivanje da izolovani soj pripada rodu *Salmonella* na osnovu biohemijskih karakteristika izolovanog soja i u tom cilju koristi se u najvećem broju slučajeva neki od polautomatskih identifikacionih sistema (API bioMerieux, BBL Crystal Bnecten Dickinson) ili neke savremene metode kao što su MALDI – TOF ili PCR. Nakon ove faze, kada se potvrdi da je izolovani soj pripadnik roda *Salmonella*, pristupa se petoj fazi a to je serološka tipizacija salmonela u cilju određivanja serovarijeteta. U tom cilju primenjuje se metoda brze aglutinacije na pločici uz upotrebu specifičnih dijagnostičkih seruma različitih proizvođača.

2.9.1 Postojeći i novi pristupi tipizaciji (određivanju serovarijeteta) salmonela

Tipizacija salmonela je nezaobilazni postupak pri praćenju epizootioloških i epidemioloških parametara, zatim u cilju istraživanju izvora infekcija prenesenih hranom. Pored klasične serotipizacije, od početka devedesetih godina prošlog veka intenzivno se istražuju mogućnosti grupisanja izolata na osnovu njihove genetske raznolikosti. U početku su posmatrane uglavnom klonalne karakteristike na osnovu rezultata multi lokusne enzimske elektroforeze (218, 219, 220) koja, kao fenotipska metoda, nije pružala podatke o razlikama u okviru genoma. Zatim, informacije obezbeđene tipizacijom multi lokusnim sekvenciranjem (MLST) (fragmenti 7 gena), detekcijom polimorfizma pojedinačnih nukleotida (SNP) na 200 gena, nakon toga sekvencionom tipizacijom uzorkovanjem približno 10% osnovnog (eng.: *core*) genoma (51, 133) ukazale su na prisustvo rekombinacija među različitim serovarijetetima, ili čak unutar pojedinih serovarijeteta *S. enterica* subsp. *enterica*. Prema tome rod

Salmonella obuhvata stabilne filogenetske linije, nastale genetskim driftom, koje predstavljaju uopšteni klonalni okvir, a fleksibilnije varijacije koje su nastale horizontalnim prenosom gena i stvorile su razlike među sojevima istih grupa (239).

2.9.2 Postojeći pristupi i metode za tipizaciju salmonela

Tabela 8 prikazuje pregled trenutno dostupnih načina tipizacije salmonela. Sledeći delovi razmatraju metode koje se za sada koriste za konačnu identifikaciju, zatim kako se one kombinuju sa molekularnim metodama pri sastavljanju strategija za tipizaciju.

2.9.2.1 Serotipizacija

White-Kauffmann-Le Minor šema predstavlja klasičnu metodu za označavanje serovarijeteta (50,116). Ovom fenotipskom metodom se vrši detekcija površinskih antigena aglutinacijom bakterijskih ćelija polivalentnim antiserumima (209). Prema ovoj šemi serptip se određuje na osnovu somatskih (O), flagelarnih (H) i kapsularnog (Vi) antigena koji se nalaze na površini ćelije salmonela. Somatski antigen je polisaharidne prirode i nalazi se u lipopolisaharidu (LPS) bakterijskog zida (194) i određuje serološku grupu u koju dati izolat salmonele pripada (83). White-Kauffmann-Le Minor šema sadrži 46 različitih somatskih i 114 različitih flagelarnih antigena, koji u različitim kombinacijama daju više od 2600 serovarijeteta (116). Većina salmonela poseduje dva flagelarna antigena označenih kao faza I (H1) i faza II (H2) (155). Ekspresija H1 i H2 flagelarnih antigena je koordinisana mehanizmom fazne varijacije (21,215,254). Serovarijeteti koji ekspimiraju dva tipa flagelina nazivaju se difaznim, dok oni sa samo jednim tipom flagelarnog antigena monofaznim (155) Tri *Salmonella enterica* podvrste (podvrste IIIa, IV, VII), kao i vrsta *Salmonella bongori* ne poseduju H2 antigen i smatraju se monofaznim, dok kod ostalih podvrsta kod kojih je većina serovarijeteta difazna postoje pojedini jednofazni serovarijeteti: na primer *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovarijetet 4,5,12:i:-, zatim serovarijetet Enteritidis (153). Opisani su i trifazni serotipovi koji su veoma retki: na primer serovarijeteti Rubislaw i

Saliatis (166, 218). Nekoliko serovarijeteta, kao što je na primer Typhi i Dublin prisutan je i kapsularni Vi antigen i predstavlja faktor virulencije (117).

Laboratorija osposobljena da vrši samostalno klasičnu serotipizaciju svih serovarijeteta treba da poseduje više od 250 različitih antiseruma za tipizaciju, kao i 350 antigena za proizvodnju i kontrolu kvaliteta tih antiseruma. Pored toga antiserumi za retke antigene obično nisu komercijalno dostupni ili im je kvalitet neujednačen (73,154). Izvođenje klasične serotipizacije zahteva puno manuelnog rada i dugotrajno je. Potrebno je minimum tri dana za tipizaciju jednog izolata, a u slučaju kompleksnijih i retkih serovarijeteta čak i mnogo više (130). Drugi nedostaci klasične serotipizacije je mogući izostanak ekspresije antigena potrebnog za serotipizaciju. Na primer R sojevi ne ispoljavaju O antigen, samim tim ne reaguju sa O antiserumima. Pored toga sluzavi sojevi proizvode kapsulu oko svojih ćelija koja sprečava detekciju O antigena. Nepokretni sojevi ne ekspimiraju svoje flagelarne antigene (72). Klasična serotipizacija pored toga što je dugotrajan proces iziskuje i angažovanje posebno obučenog osoblja. Svi ovi razlozi su doprineli tome da se interesovanje naučnog sveta povećalo za razvijanje pouzdanih molekularnih metoda za određivanje ili pak predviđanje serovarijeteta salmonela, čiji rezultati su uporedivi sa White-Kauffmann-Le Minor šemom (212).

Tabela 8. Postojeće fenotipske metode za tipizacije *Salmonella*

| Tehnika | Kratak opis | Prednosti | Upotreba | Nedostaci | Referenca |
|--------------------|--|---|--|---|-----------|
| Sero-tipizacija | Aglutinacija somatskih "O" i flagelarnih „H“ antigena. Zahteva promenu faze za određivanje konačnog serovarijeteta | Priručna metoda, lako se izvodi. Predstavlja opšte poznatu metodu. Pogodna je kako za skrining tako i za serotipizaciju. | Većinom za tipizaciju <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> | Osnovana je proizvoljno izabranim markerima, samim tim ne reflektuje pravu klasifikaciju. Potreban je veliki broj prilično skupih antiseruma | (83) |
| Fago-tipizacija | Osetljivost soja bakterije na panel bakteriofaga | Razrađena i može biti veoma brza. Obezbeđuje korisne, biološke relevantne i epidemiološke podatke | Serovarijeteti: Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B, Java, Typhimurium, Enteritidis, Agona, Virchow, Hadar, Gallinarum, Thompson | Nije široko dostupno, rade je samo referentne laboratorije zbog potrebe uslova za održavanje fagova. Molekularni mehanizmi nisu kod svih serovarijeteta utvrđeni. | (123) |
| Rezisto-tipizacija | Osetljivost na različite antibiotike | Jeftin je metod i lako se izvodi. Razlikuje izolate <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> iz različitih epidemioloških područja | Sve salmonele | Isti panel rezistencije može da bude rezultat različitih genetskih mehanizama. Rezistencija se brzo može promeniti. | (229) |
| MALDI-TOF | Masena spektrometrija cele ubijene ćelije bakterije | Brz i jeftin ako se posmatra cena koštanja po uzorku, izuzetno skup ako se posmatra cena koštanja opreme | <i>S enterica</i> | Može precizno da identifikuje rod. Diskriminaciona moć nije dovoljna za razlikovanje podvrsta i serovarijeteta. | (239) |

Tabela 9: Postojeće genotipske metode za tipizacije *Salmonella* (prvi deo)

| Tehnika | Kratak opis | Prednosti | Upotreba | Nedostaci | Referenca |
|---------------------------------|---|--|------------------------|---|-------------------------|
| RAPD | Amplifikacija pomoću nasumično odabranih prajmera | Lako se izvodi. Može biti koristan pri epidemiološkim istragama | Sve salmonele | Nije reproducibilna metoda, njena upotreba nije raširena | (52) |
| PCR - specifični geni i lokusi | PCR za gene rezistencije, faktore virulencije ili metaboličke markere | Primena je jednostavna u slučaju izolata sa poznatim genetskim razlikama | Većina sero-varijeteta | Identifikacija i validacija gena poreklom od izolata može biti komplikovana. Ne postoji standardizacija. Pogodna uglavnom za identifikaciju roda salmonela, u pojedinim slučajevima i podvrste. | (130) |
| Plazmidni profil | Analiza plazmida koji se nalaze kod izolata | Koristan je pri epidemiološkim istragama | Sve salmonele | Pojedini izolati lako prisvajaju i gube plazmide. Ne predstavlja pravu identifikaciju salmonela | (40) |
| Restrikciona digestija plazmida | Digestija plazmidske DNK restrikcionim enzimima | Korisna je za opisivanja širenja plazmida sa genima rezistencije ili virulencije | Sve salmonele | Upotrebljiva je samo kod izolata sa sličnim plazmidima. | (248) |
| PFGE | Restrikciona digestija genomske DNK zatim separacija dobijenih segmenata na gelu agaroze u pulsirajućem električnom polju | Izvršena je standardizacija međulaboratorijskim uporednim ispitivanjima | Sve salmonele | Potrebna je skupa oprema i softver za komparaciju rezultata. Koristi se u referentnim i istraživačkim laboratorijama. Obuhvata manje od 1% varijacije sekvence genoma salmonela | (13, 18, 168, 210, 228) |

Tabela 9 nastavak: Postojeće genotipske metode za tipizacije *Salmonella* (drugi deo)

| Tehnika | Kratak opis | Prednosti | Upotreba | Nedostaci | Referenca |
|-------------------------------------|---|---|---|---|------------------|
| AFLP/F ALFP | Modifikacija PFGE baziran na PCR tehnici. Korišćeni su fluorescentni markeri za bolju rezoluciju fragmenata | Robusniji je od PFGE i ima veću diskriminativnu moć. Dobijeni klasteri podudaraju sa serovarijetetima | Sve salmonele | Potrebna je skupa oprema, obuhvata samo mali deo genoma oko mesta delovanja enzima. Primenjen je već kod salmonele ali trenutno se ne koristi | (11) |
| MLVA - VNTR | Veličina PCR produkata reprezentuje broj kratkih ponavljajućih sekvenci | Robustan je i reproducibilan, može da se automatizuje. Korišćen je za ispitivanje <i>S. Typhi</i> i <i>S. Typhimurium</i> . | Serovarijetet i Typhimurium i Enteritidis | Potrebno je standardizovati metodu za svaki serovarijetet, pretpostavlja se da je diskriminativna moć manja nego kod PFGE | (230) |
| IS200 tipizacija ili ribotipizacija | Ispitivanje IS200 elemenata prisutnih u više kopija ili rRNK gena restrikcijom digestijom ili metodom Southern blot | IS200 (inercione sekvence) elementi su prilično postojani u prirodnim populacijama bakterija. Isprobana je već na nekoliko serovarijeteta | Sve salmonele | Nema veliku diskriminativnu moć među izolatima. Baza podataka nije sastavljena | (18) |
| MLEE | Razdvaja enzime i detektuje njihovu aktivnost i izoelektričnu tačku | Korisna je u globalnoj epidemiologiji | Sve salmonele | Predstavlja veoma komplikovanu metodu, koja ne može da se automatizuje | (220) |

Tabela 9 nastavak: Postojeće metode za tipizaciju *Salmonella* bazirane na sekvenciranju

| Tehnika | Kratak opis | Prednosti | Upotreba | Nedostaci | Referenca |
|--------------------------------------|---|--|-----------------|---|------------------|
| MLST | Upoređuje sekvencu sedam konstitutivnih gena (eng.: <i>housekeeping</i>) | Deli salmonele u filogenetske grupe, slične serovarijetetima. Obezbeđuje digitalne podatke i veoma je reproducibilna. Može da se postavi i kao SNP test za tipizaciju. | Sve salmonele | Ne razlikuje izolate istih serovarijeteta. Sekvenciranje je još prilično skup postupak, stoga se izvodi samo u istraživačkim i referentnim laboratorijama | (128) |
| DNK mikro-čipovi | DNK-DNK hibridizacija (Microarray) celog genoma sa čipom sa poznatim sekvencama. Određuje sadržaj gena | Prisustvo ili odsustvo gena se određuje duž celog genoma nekoliko izolata. Pogodan je za određivanje genetske raznolikosti. | Sve salmonele | Teško se detektuju tačkaste mutacije. Izuzetno skupa oprema i skupo je izvođenje metode. Može da detektuje samo karakteristike koje su ušle u sastav čipa, ne prepoznaje nove insercije i slično. | (179, 181, 243) |
| SNP typing | Različite varijante su u upotrebi | Reproducibilan, konačan i univerzalno primenljiv | <i>S. Typhi</i> | Pouzdanost zavisi od kolekcije izolata sekvenciranih u cilju uspostavljanja metode. | (200) |
| Sekvenciranje genoma nove generacije | Pokrivenost genoma i dubina analize su visoke. Pogodna je za određivanje konzervirane karakteristike genoma. Dužina čitanja još nije dovoljna za sastavljanje celog genoma. | Reproducibilan, konačan i univerzalno primenljiv | Sve salmonele | Interpretacija je trenutno na nivou istraživanja. Još nije uveden za salmonele ali su koristili pri praćenju infekcija sa <i>E. coli</i> . | (145) |

H antigeni su strukturni proteini na površini flagela bakterija. Za sada ih je kod salmonela opisano 114 vrsta. Postoji veza jedan gen—jedan protein za svakog od dva antigena: H1 kodira *fliC*, a H2 *fljB* gen. Njihova ekspresija se nalazi pod kontrolom mehanizma fazne promene, što znači da u čistoj kulturi preovladavajuća većina bakterija obično nosi flagele jedne faze, dok druga faza se nalazi kod malobrojnih preostalih ćelija. Step en ekspresije flagelarnog antigena ove druge grupe je najčešće ispod granice detekcije klasične serotipizacije. Zbog toga u cilju konačne serotipizacije izolata, koja naravno mora obuhvatiti određivanje oba flagelarna antigena, potrebna je indukcija promene faze. Ona se postiže inkubacijom ispitanog soja bakterije u prisustvu antitela usmerena ka već detektovanom antigenu. Vezivanje ovih antitela za flagele sprečava pomeranje bakterije, dok pokretljivost manjeg broja ćelija koje poseduju flagele druge faze ostaje očuvana. Ovaj princip se koristi u različitim formatima za selektivno obogaćenje bakterija koje eksprimiraju antigen faze koja je u početku bila u manjem obimu izražena. Nakon umnožavanja, količina prisutnog flagelarnog antigena već prelazi granicu detekcije metode, samim tim moguće je izvesti aglutinaciju sa odgovarajućim specifičnim antitelima. Ovaj postupak traje najmanje 2 dana, mada često zahteva čak više od jedne nedelje (239)

Kod salmonela postoji samo jedan kapsularni antigen označen kao Vi. Poseduje ga samo nekoliko serovarijeteta: S. Typhi, Paratyphi C i ređe Dublin (238, 15).

Ipak, serotipizacija kao najšire primenjivana metoda u identifikaciji serovarijeteta salmonela ima dosta nedostataka. Na primer, izolati S. Choleraesuis mogu se razdvojiti genetskom biotipizacijom u S. Choleraesuis, S. Decatur i S. Paratyphi C, od kojih svaki ima drugačiji klinički značaj. Biotip Choleraesuis se nalazi kod svinja, a izaziva invazivnu bolest samo kod ljudi sa kompromitovanim imunim sistemom, Paratyphi C je uzročnik invazivne bolesti čoveka, dok Decatur dovodi do gastroenteritisa ljudi (134). Ipak, sva tri biotipa

u klasičnoj serotipizaciji imaju istu antigensku formulu: 6,7:c:1,5. Njihovim ispitivanjem utvrđeno je, da poseduju istovetni LPS, ali flagelarni antigeni H1:c i H2:1,5 znatno variraju. U slučaju mnogo raširenijeg serovarijeteta *S. Enteritidis* situacija je potpuno drugačija. Ovaj serovarijetet eksprimira G flagelarni antigen koji predstavlja grupu nekoliko srodnih antigena. Kod različitih serovarijeteta se nalazi različiti G antigen (na primer *S. Dublin* ima g,p dok *S. Enteritidis* g,m). Kako se serotipizacija zasniva na detekciji LPS i flagelarnih antigena, gubitak bilo koje od ovih površinskih komponenti dovodi do pogrešne identifikacije. Posebno je važan slučaj epidemiološko značajne monofazne varijante *S. Typhimurium* sa antigenskom formulom 4,(5),12:i:-, koja se klasičnom serotipizacijom teško razlikuje od difaznog tipa. Poteškoće u pravilnom određivanju flagelarnog antigena druge faze i inače predstavljaju najčešće greške pri serotipizaciji (91)

Diskriminativna moć serotipizacije je nedovoljna pri epidemiološkim istragama, jer za 95% netifoidnih infekcija ljudi odgovorno je obično 10 najučestalijih serovarijeteta na datom geografskom području. Štaviše, najzastupljeniji serovarijeteti su *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* širom sveta (64). Uprkos ovim nedostacima metode klasične serotipizacije, klasifikacija koja je nastala zahvaljujući njoj je veoma značajna iz aspekta daljeg odlučivanja koje dodatne metode treba primeniti da se postigne željena rezolucija, dok u slučaju ređih serovarijeteta čak ni u slučaju epidemiološke istrage, osim serotipizacije, nisu potrebni dodatni testovi.

2.9.2.2 Fagotipizacija

Ranije, dok molekularne metode nisu bile dostupne, fagotipizacija je bila jedina metoda za utvrđivanje razlika među različitim izolatima istog serovarijeteta. U određenim slučajevima i danas se primenjuje pri epidemiološkim istragama. Prednosti ove metode su reproducibilnost, visoka rezolucija, niska cena korišćenog potrošnog materijala i brzina. Za određivanje fagotipa čiste kulture je potrebno samo 24 časova (239).

Ipak, obezbeđenje uslova za upotrebu ove tehnike je veoma zahtevno. Potrebno je umnožavanje i održavanje živih bakteriofaga i neophodno je visoko obučeno osoblje za izvođenje. Zbog toga trenutno u Evropi ovaj način tipizacije salmonela se koristi samo u nekoliko referentnih laboratorija. Sve ovo nije u skladu sa savremenim zahtevima, prema kojima se traga za načinima da se tipizacija izvodi lako izvodljivim testovima.

Fagotipizacija se izvodi samo na izolatima najučestalijih serovarijeteta. Ograničenje predstavlja činjenica da ovom metodom se u suštini vrši određivanje prisustva ili odsustva receptora za vezivanje određenih bakteriofaga na površini bakterije, a ova karakteristika može se promeniti primanjem ili gubljenjem mobilnih genetskih elemenata kao što su plazmidi (41).

2.9.3 Molekularne metode sekundarne (drugostepene) tipizacije *Salmonella*

Serotipizacija i fagotipizacija su prvostepene metode identifikacije salmonela, ali za upoznavanje detaljnijih povezanosti izolata tokom epidemioloških ispitivanja potrebne su molekularne metode. Pošto su za odabir najprikladnije i najsvrsishodnije molekularne metode najpre potrebni rezultati klasične serotipizacije, molekularnu tipizaciju nazivamo drugostepenom ili subtipizacijom.

Ne postoji metoda podjednako pogodna za svaki vid drugostepene tipizacije sojeva salmonela. Odabir metoda zavisi kako od serovarijetet/fagotip kombinacije, tako i od situacije u kome se izvodi tipizacija, nadalje i od njenog cilja.

2.9.3.1 Gel elektroforeza u pulsirajućem strujnom polju PFGE

PFGE (*Pulsed field electrophoresis*) je metoda koja se zasniva na polimorfizmu fragmenata DNK dobijenih prethodnom restrikcijom. DNK se tretira određenom restrikcionom endonukleazom, zatim se razdvaja u promenljivom električnom polju u fragmente dužine do 2000 kb (216). U poslednje vreme je

objavljeno više istraživanja koja su imala za cilj ispitivanje potencijala ove metode u određivanju serovarijeteta izolata salmonela.

Nde i saradnici (2006) (161) su uporedili PFGE profile 80 izolata salmonela, pripadnike šest serovarijeteta. Ukupno 49 od 80 sojeva su se grupisali prema svojim serovarijetetima na osnovu svojih *Xba*I PFGE profila. Izuzetak je bio jedan soj *S. Montevideo* koji je bio u istoj grupi sa tri izolata *S. Senftenberg*. Mada su se rezultati PFGE u visokom procentu podudarali sa podacima dobijenim klasičnom serotipizacijom, broj uključenih serovarijeteta je bio previše mali da bi se mogli doneti zaključci o široj upotrebljivosti ovog metodološkog pristupa u preciznoj identifikaciji serovarijeteta salmonela.

Gaul i saradnici (78) su uporedili PFGE profile 674 izolata salmonela pripadnika 12 serovarijeteta, pri čemu njih 573 je uspešno bilo grupisano u jasne grupe. Izuzeci su bili *S. Typhimurium* var *Copenhagen*, serovarijetet 4,(5),12:i- i *S. Typhimurium* koji su bili u istoj grupi, zatim *S. Putten* i *S. Agona* koji su takođe pripali zajedničkom klasteru.

Késrouanton i saradnici (127) su izveli obimniju studiju sa 1128 izolata 31 serovarijeteta. Tačnost određivanja serovarijeteta bila je 97%. Razlike u rezultatima identifikacije između PFGE i klasične serotipizacije javile su se kod izolata *S. Paratyphi B*, *S. Give*, *S. Saintpaul*, *S. Agona*, *S. Montevideo* i *S. Newport*.

Ipak, pri istraživanju Ranieri i saradnika (191) ispitivanjem PFGE profila 46 izolata *Salmonella* koji su predstavljali 40 serovarijeteta dobijeno je slaganje između PFGE i klasične serotipizacije samo kod 75% izolata. Serovarijeteti *S. Typhimurium* var *Copenhagen*, *S. 4,(5),12:i-* i *S. Saintpaul* su se podudarali sa *S. Typhimurium*, a PFGE profili osam izolata su se razlikovali od svih profila prisutnih u korišćenoj bazi podataka.

Pored toga što u prethodnim primerima postignuto prilično visoki procenat slaganja između rezultata PFGE i klasične serotipizacije (najmanje 75%) diverzitet ispitanih serovarijeteta nije bio adekvatan da se donesu uopšteni

zaključci o upotrebi ove metode za pouzdano određivanje serovarijeteta (212). Mada je PFGE korisna metoda za subtipizaciju salmonela za potrebe epidemioloških istraživanja (195), potrebna je dalja karakterizacija različitih kombinacija izolata da bi se uočila specifična ograničenja metode. Pored toga, detaljne baze podataka sa PFGE profilima najzastupljenih serovarijeteta su preduslov za širu upotrebu ove metode u cilju određivanja serovarijeteta salmonela (255).

Krajem devedesetih godina prošlog veka, uveden je visoko standardizovani PFGE protokol „SALM Gene-PFGE“. Sličan sistem u SAD je osnovan pod nazivom Pulsenet-USA. Ovi protokoli služe za molekularnu subtipizaciju salmonela primenom PFGE u epidemiološkim ispitivanjima-

2.9.3.2 Ribotipizacija

Ribotipizacija takođe spada u grupu metoda baziranih na polimorfizmu fragmenata DNK dobijenih enzimskom restrikcijom. Njenom primenom, izolati salmonela se dele u grupe označene kao ribotipovi (243), koji mogu odgovarati određenom serovarijetetu. Ribotipizacija je korišćena u nizu istraživanja za određivanje serovarijeteta salmonela (14,23,170,191,198), pri čemu je stepen podudaranja u odnosu na podatke dobijene klasičnom serotipizacijom iznosila 39-100%. Broj ispitanih serovarijeteta se kretao od 2 do nekoliko stotina, a na varijaciju rezultata u svim slučajevima uticala je i raznolikost testiranih serovarijeteta. Tačnost od 100% je postignuta je u onim slučajevima kada je broj ispitanih serovarijeteta bio vrlo mali. De Cesare i saradnici (2001) (48) ispitali su 112 izolata serovarijeteta Enteritidis i Typhimurium i restrikcionim enzimima EcoRI i PvuII metodom ribotipizacije su dobili identične rezultate kao i u klasičnoj serotipizaciji. Ispitivanje Estebana i saradnika (66), koje je obuhvatilo izolate tri različita serovarijeteta (Reading, Typhimurium i Senftenberg), takođe je pokazalo potpuno slaganje sa rezultatima klasične serotipizacije. Ipak u slučajevima sa većim brojem ispitanih serovarijeteta podudaranje dobijenih rezultata ribotipizacije i klasične serotipizacije je bila značajno manja. U jednoj

studiji iz 2007 godine, ribotipizacija 60 izolata *Salmonella* sa predstavnicima 9 serovarijeteta pokazala je tačne rezultate samo kod 43 izolata (72%) (30). Najnižu uspešnost u tačnom pogađanju serovarijeteta je imala studija izvedena 1998. godine na 117 izolata salmonela predstavnika 22 različitih serovarijeteta (170). Tada je otkriveno da određeni serovarijeteti imaju više različitih ribotipova: *S. Worthington* i *S. Hadar* ih je imao četiri, a *S. Mbandaka* i *S. Senftenberg* po tri. Takođe se pojavila i obrnuta situacija kada jedan ribotip sadržao više serovarijeteta. Na primer isti ribotip profil su pokazali *S. Typhimurium*, *S. Brandenburg*, *S. Cerro* i *S. Heidelberg* .

Ribotipizacija za razliku od PFGE generiše srazmerno mali broj traka (obično 5-10) (23), i dok to olakšava analizu profila, nedostatak mu je manja diskriminativna sposobnost što dovodi do greške u određivanju serovarijeteta. Sve to posebno dolazi do izražaja u slučaju srodnih serovarijeteta kao što su *S. Typhimurium* i 4,5,12:i- (14). Pored toga odabir baze podataka ribotip profila je veoma bitan faktor pri tumačenju rezultata (212).

2.9.3.3 PCR za nasumičnu amplifikaciju polimorfne DNK (eng.: *Random amplified polymorphic DNA-PCR - RAPD-PCR*)

Subtipizacija pomoću RAPD-PCR bazira se na nasumičnom umnožavanju delova bakterijskog genoma (211). Koriste se proizvoljni prajmeri dužine oko 10 bp, koji umnožavaju DNK pod fleksibilnim uslovima za PCR reakciju (247). Na diskriminativnu moć ove metode bitno utiče izbor prajmera i PCR uslovi, a ove okolnosti značajno smanjuju i ponovljivost metode (164). Ovu činjenicu potvrđuju i prilično kontradiktorni rezultati radova o upotrebi RAPD-PCR za određivanje serovarijeteta salmonela sa opsegom tačnosti pogađanja od 0-100%. Prilikom dva istraživanja iz 1998 i 2005 godine (29,197) ni jedan serovarijetet nije tačno identifikovan jer RAPD-PCR produkovao iste profile za sve različite serovarijetete. Drugi radovi, ipak, prikazuju procenat tačno klasifikovanih izolata od 91-100% (48,211,221). Zbog izuzetno velike razlike u dobijenim rezultatima RAPD nije cenjena metoda u serotipizaciji salmonela.

2.9.3.4 PCR ponavljajućih elemenata (eng.: Repetitive element PCR - Rep-PCR)

Rep-PCR služi za amplifikaciju fragmenta genoma pomoću prajmera koji su usmereni ka repetitivnim elementima DNK (196). Za subtipizaciju salmonela upotrebljavaju se uglavnom tri seta ponavljajućih sekvenci prisutnih u genomu *Enterobacteriaceae* (212). Ove sekvence su pogodne za diskriminaciju zbog svoje genetske stabilnosti, različite lokacije na hromozomu i zbog njihovog različitog broja kopija kod pojedinih sojeva (24). Slično kao u slučaju RAPD-PCR i kod ove metode ponovljivost je na niskom nivou, mada su se u poslednje vreme pojavili komercijalni kitovi sa poboljšanim karakteristikama (36).

Analizirajući deset radova u kojima je korišćen Rep-PCR za određivanje serovarijeteta salmonela, podudaranje dobijenih rezultata sa klasičnom serotipizacijom se kretalo između 64 i 100% (212), izuzev u istraživanju Burr i saradnika gde je podudarnost bila 0% (29). Najobimnije istraživanje u kome je primenjena ova metoda za ispitivanje izolata salmonela uključilo je 133 izolata, predstavnika 80 serovarijeteta (192). Podudarnost rezultata Rep-PCR metode sa podacima dobijenih klasičnom serotipizacijom je bila 92% (125 od 133). Izuzeci su bili *S. Typhimurium* var Copenhagen koji je bio u istoj grupi sa *S. Typhimurium*, *S. Infantis* u grupi sa *S. 6,7:r:-*, jedan izolat *S. Enteritidis* koji se nije mogao razlikovati od *S. 9:-:-* i jedna *S. Urbana* koja je bila u grupi zajedno sa *S. Sundsvall*. Za sada Rep PCR nije našao široku primenu.

2.9.3.5 PCR-polimorfizam različite dužine restrikcionih fragmenata (eng.:PCR-restriction fragment length polymorphism - PCR-RFLP)

PCR-RFLP se zasniva na vizualizaciji profila traka dobijenih restrikcionom digestijom DNK koja je prethodno umnožena primenom metode PCR (166). Da bi se PCR-RFLP mogao koristiti za subtipizaciju salmonela, potrebno je identifikovati ciljne sekvence pogodne za razlikovanje izolata sve do nivoa podvrsta. U slučaju određivanja serovarijeteta salmonela, kao target koristili su

se geni *fliC* i *fliB* odgovorni za H1 i H2 flagelarne antigene. Diskriminativna moć metode zavisi i od tipa korišćene restrikcione endonukleaze (242). Tačnost određivanja serovarijeteta primenom PCR-RFLP se kreće od 2-100% zavisno od ciljanog gena i korišćene endonukleaze. U istraživanju koje je obuhvatilo najveći broj izolata (n=112) i najviše serovarijeteta (n=52) korišćen je *fliC* i *fliB* PCR-RFLP i serovarijeteti su se tačno identifikovani u 71% slučajeva (37/52). Ipak neki od serovarijeteta bitnih sa aspekta javnog zdravlja, kao što je *S. Typhimurium*, *S. Dublin* i *S. Enteritidis*, nisu mogli biti precizno identifikovani na ovaj način (99).

Mada je PCR-RFLP metoda jednostavna za izvođenje, razvrstavanje izolata zavisi od varijacija na veoma malom regionu bakterijskog genoma, što smanjuje diskriminativnu moć i otežava tumačenje rezultata (167). Dok *fliC* i *fliB* PCR-RFLP može da razlikuje homologne serovarijetete (na primer *S. 4,5,12:i:-* od *S. Typhimurium*) diferencijacija O-antigen negativnih varijanata serovarijeteta nije moguća (na primer *S. Typhimurium* var. Copenhagen od *S. Typhimurium*), kao i serovarijeteta sa veoma sličnim antigenima (na primer *S. Enteritidis* od *S. Dublin*) (44). Na ograničene mogućnosti primene ove metode za određivanje serovarijeteta salmonela utiče i nedostatak odgovarajuće baze podataka PCR-RFLP profila (212).

2.9.3.6 Polimorfizam umnoženih fragmenata (eng.: Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP)

Pri ovoj metodi DNK se seče sa dva restrikciona enzima, a zatim se primenjuje takozvani adapter sekvence u obliku dvolančanih oligonukleotida koji se vežu za krajeve dobijenih fragmenata isečenih DNK molekula. Zatim slede dve PCR reakcije sa prajmerima specifičnim za adaptore. Na kraju PCR produkti se razdvajaju elektroforezom u gelu (216).

U nekoliko ispitivanja koja su koristila AFLP za određivanje serovarijeteta salmonela dobijeni su dobri rezultati. Aarts i saradnici(1) su ispitali 30 izolata 15 serovarijeteta, dok Peters i saradnici (174) 78 izolata koji su obuhvatali 62

serovarijeteta i u oba slučaja je diferencijacija bila 100% tačna. Obe grupe autora su našli jedinstvene AFLP profile za pojedine serovarijetete, ali potrebno je uzeti u obzir, da su ispitani serovarijeteti bili predstavljeni sa malim brojem izolata.

Niska ponovljivost metode predstavlja njen nedostatak.

2.9.3.7 MLVA (*Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*)

Iako je PFGE veoma uspešno korišćena u mnogim istraživanjima u cilju otkrivanja izvora infekcije, ona je vrlo zahtevna metoda što značajno ograničava njenu upotrebu. U nekim slučajevima čak ni njena rezolucija nije dovoljna, kao što je to slučaj sa *S. Typhimurium* DT104, koji je posebno važan zbog svoje multirezistencije na antibiotike (160).

Da bi se ovi problemi prevazišli, a u cilju obezbeđivanja rezultata koji se mogu uporediti između laboratorija, uvedena je MLVA koja je standardizovana metoda amplifikacije varijabilnog broja ponavljajućih sekvenci u hromozomu primenom PCR tehnike. Za sada su dostupni standardizovani MLVA protokoli za *S. Typhi* (144) i *S. Typhimurium* (140). Kao što je rečeno, pri ispitivanju određenog serovarijeteta posmatra više ponavljajućih sekvenci: na primer kod *S. Typhi* tri, a kod *S. Typhimurium* pet. Ova metoda je postala osnovna za drugostepenu tipizaciju *S. Typhimurium* u mnogo zemalja. Njen uspeh je dokazan čak i u slučaju veoma opsežnih epidemioloških istraga u epidemiji izazvanoj ovim serovarijetetom (67). Pored toga izvršena je validacija metode u slučaju *S. Enteritidis* (175), dok primenjivost ove tehnike je ispitana i u sekundarnoj tipizaciji *S. Newport* (47).

2.9.4 Primena molekularnih metoda za prvostepenu tipizaciju *Salmonella*

Serovarijeteti se određuju prepoznavanjem reakcije površinskih antigena salmonela sa antitelima, samim tim tačnost postupka zavisi od kvaliteta korišćenih antitela. Nabavka antitela dobrog kvaliteta nije uvek moguća, osim toga, antitela mogu biti veoma skupa. Istraživanja u cilju uspostavljanja načina

određivanja serovarijeteta salmonela na osnovu njihovih genotipskih karakteristika su stoga vrlo aktuelna u poslednjih 10 godina. Međutim, zbog horizontalnog transfera gena između salmonela koji se odvija uvek i u svim ekološkim nišama i koji dovodi do praktično stalnih promena u genomu, identifikacija salmonela primenom molekularnih metoda može biti neuspešna. Osim toga, različiti serovarijeteti mogu da imaju istu genetsku liniju – na primer *S. Sendai* i *S. Paratyphi A* (24).

2.9.4.1 Serotipizacija salmonela primenom PCR

S obzirom na to, da su geni koji kodiraju O i H antigene ranije opisani (147,189), prvi pristup molekularnoj serotipizaciji bio je umnožavanje ovih gena PCR tehnikom pomoću prajmera usmerenih ka njihovim varijabilnim delovima. Prvi PCR test ovog tipa predstavljao je multipleks sa tri para prajmera usmeren na *rfb* klaster gena za razlikovanje glavnih serogrupa A, B, C2 i D (146). U daljem toku, sve učestalijom primenom sekvenciranja celih genoma salmonela sastavljene su baze podataka pomoću kojih je postalo moguće nalaženje fragmenata DNK karakterističnih za pojedine serogrupe kao ciljne sekvence prajmera (143).

PCR metode su razvijene i za detekciju gena za flagelin. Analiza amplifikata je vršena RFLP metodom (99), zatim i metodama klasične PCR, pri čemu su rezultati tumačeni na osnovu broja i veličine PCR produkata (54,94). Razlikovanje određenih gena za flageline u okviru H:G kompleksa se pokazalo izuzetno teškim što je dovelo do problema u razlikovanju *S. Enteritidis* od drugih serovarijeteta iz ove grupe (94). Da bi se ovakve poteškoće prevazišle, bilo je potrebno uključiti u PCR protokol i gene koji nisu povezani sa antigenim determinantama ispitanim pri klasičnoj serotipizaciji. U slučaju *S. Enteritidis*, na primer, *sdf* lokus se pokazao pogodnim za to.

Opisana je i kompletna šema za tipizaciju H-antigena, koja uključuje multipleks PCR (155).

Cardona-Castro i saradnici (31) su primenili kombinaciju dve multipleks PCR reakcije. Multipleks sa pet pari prajmera ciljao je gene za sintezu LPS-a u cilju određivanja serološke grupe, a drugi multipleks sa 15 pari prajmera određivao je prisustvo različitih *fliC* i *fljB* alela. Ispitivanjem 386 izolata 96,5% je identifikovano istovetno sa serovarijetetom utvrđenim klasičnom serotipizacijom, a neslaganje kod preostalih se moglo objasniti greškama fenotipske metode.

2.9.5 Novi pristupi pri molekularnoj tipizaciji salmonela

2.9.5.1 Sekvenciranje uzorka (eng.: *sample sequencing*)

Ove metode obuhvataju sekvenciranje odabranih regija genoma bakterija. Ukoliko su izabrani delovi konzervirani, diskriminativna sposobnost postupka je mala, ali omogućena je procena međusobne srodnosti ispitanih izolata. Na ovom principu se bazira tipizacija na osnovu sekvence 16S ribosomalne RNK. Ako su, ipak, sekvencirani segmenti varijabilni rezolucija metode je veća ali na uštrb dobijanja jasnih informacija o srodnosti. Ovaj drugi slučaj predstavlja tipizaciju baziranu na faktorima virulencije, pri čemu na osnovu genotipa mogu da se predvide klinički aspekti pri infekciji određenim sojevima, ali bez podataka o njihovom položaju na filogenetskom stablu (239).

2.9.5.2 Tipizacija sekvenciranjem više lokusa (eng.: *multilocus sequence typing – MLST*)

MLST metoda se zasniva na određivanju sekvence nukleotida unutrašnjih regija niza, obično, konstitutivnih gena. Pri primeni za subtipizaciju ova metoda ima dve glavne prednosti: visoko je reproducibilna i rezultati različitih laboratorija se lako upoređuju. Samim tim je veoma pogodna za međunarodne i nacionalne programe nadzora. Pored toga postoje javno dostupne kvalitetne baze podataka MLST profila, sekvenci i softvera za analizu) (212).

Objavljeno je nekoliko istraživanja koja su bila usmerena na ispitivanje pogodnosti MLST za određivanje serovarijeteta salmonela primenjujući šeme za

MLST od 3,4 ili 7 konstitutivnih gena. Uspešnost pogađanja serovarijeteta se kretala od 88 do 100%. Liu i saradnici(142) su ispitali 25 izolata 7 serovarijeteta sa 92% tačnosti. Imali su problem samo sa dva serovarijeteta: *S. Pullorum* i *S. Heidelberg*. Drugo istraživanje sa 110 izolata i 25 serovarijeteta je izveštavalo o tačnosti od 98%. Izuzetak su bili *S. Goettingen* i *S. 9,12:l,v:-*, koji su delili isti tip sekvence (20). Do sada najobuhvatnije ispitivanje, pri čemu je ispitano 4257 izolata 554 serovarijeteta pokazalo je tačnost metode od 88% (2).

2.9.5.3 Masena spektrometrija

Masena spektrometrija primenom MALDI-TOF metode (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) pokazala se dobra u identifikaciji bakterija do nivoa vrsta. Značajno je smanjen udeo ljudskog rada i vreme potrebno za rukovanje sa velikim brojem izolata u kliničkim laboratorijama (246).

2.9.6 Molekularna serotipizacija bazirana na direktnom određivanju i karakterisanju gena koji kodiraju H antigene i biosintetske puteve O antigena

Direktnim metodama nazivamo molekularne tehnike koje su usmerene na detekciju gena koji kodiraju enzime uključene u sintezu somatskih antigena (O antigeni) i obično se nalaze u *rfb* klasteru (119), kao i gene koji kodiraju flagelarne antigene (H1 i H2), to jest *fliC* i *fliB* (87). Za serotipizaciju na osnovu ovih gena od molekularnih metoda se mogu koristiti sledeće: PCR, DNK mikročipovi i tehnike bazirane na sekvenciranju. 3) (212).

Rfb klaster se nalazi na hromosomu salmonela i obuhvata tri grupe gena (73):

- Gene koji kodiraju enzime za sintezu monosaharida
- Gene koji kodiraju tansferaze šećera
- Gene koji kodiraju polimeraze i transportere O antigena.

Kako je već navedeno salmonele poseduju dva flagelarna antigena označenih kao faza I (H1) i faza II (H2), ali je samo jedan eksprimiran u određenom trenutku (254). Ova pojava se naziva fazna varijacija. Flagelarne antigene H1 i H2 kodiraju geni *fliC* i *fliB*. Ovi geni se nalaze na različitim mestima na hromosomu i njihovu ekspresiju reguliše jedan zajednički operon (5). *fliC* i *fliB* geni sadrže visoko konzervirane sekvence na svojim 5' i 3' krajevima: ispitivanje 280 alela ovih gena pokazalo samo 6, odnosno 8 zamena među prvih 37 i zadnjih 30 nukleotida. Suprotno, srednji deo ovih gena je veoma varijabilan. Ova promenljiva sekvenca kodira varijabilni deo flagelnog filameta. Neki H antigeni se sastoje od više faktora; na primer flagelarni antigen H2:e,n,x obuhvata tri različita dela e, n i x (154). 114 različitih flagelarnih antigena su grupisani u komplekse na osnovu međusobne imunološke povezanosti. Na primer flagelarni antigenski faktori g, m ili t su članovi G kompleksa, antigeni koji ne sadrže ove faktore su članovi ne-G kompleksa (159). PCR metode usmerene na alele koji kodiraju O i H antigene

Hirose i saradnici (96) su tokom svojih inicijalnih ispitivanja 2002. godine pokušavali razlikovati *S. Typhi* i *S. Paratyphi A* od 19 drugih serovarijeteta. Rezultat je bio prilično slab sa tačnošću od 33%. Kasnije kako je postalo dostupno više sekvenci kako *rfb* klastera, tako i *fliC* i *fliB* gena poreklom od različitih serovarijeteta, vršena su dalja istraživanja primenom ovog pristupa. Herrera-Leon i saradnici (93) 2007. godine su vršili ispitivanja sa tri multipleks PCR reakcije: prva je bila usmerena na pet O antigena (O:4; O:7; O:8; O:9; O:3,10), druga je obuhvatila osam H1 antigena (i; r; l,v; e,h; z10; b; d; g kompleks), a treća sedam H2 antigena (1,2; 1,5; 1,6; 1,7; l,w; e,n,x; e,n,z15). Kombinacija multipleks PCR reakcija je testirana na 500 izolata 30 serovarijeteta sa tačnošću identifikacije od 85%.

Dok multipleks PCR može biti brza i jeftina alternativa klasičnoj serotipizaciji, ova tehnika ima i svoje nedostatke. Na primer ova metoda ne može da razlikuje varijante serovarijeteta nastale usled fazne konverzije koja u

određenim slučajevima dovodi do nekih antigenskih promena, ili usled tačkastih mutacija na H1 i H2 genima odgovornim za izostanak ekspresije flagela (98).

3 CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Precizna identifikacija izolata salmonele do nivoa serovarijeteta, koji su uprkos svim nastojanjima i dalje vodeći hranom prenosivi patogeni, polazna je osnova za svaki dalji napor u iznalaženju mera kontrole i profilakse salmoneleza.

S obzirom na značaj pojedinih serovarijeteta salmonela za zdravlje životinja i ljudi, a u skladu sa potrebom za korišćenje jednostavne, brze i pouzdane metode za njihovu identifikaciju, glavni cilj ovog rada jeste precizna identifikacija serovarijeteta salmonela koje su prisutne u uzorcima poreklom od domaćih životinja na području Severnobačkog i Severnobanatskog okruga u Vojvodini primenom molekularno-bioloških metoda i upoređivanje ovih rezultata sa rezultatima dobijenih klasičnim bakteriološkim i serološkim pristupom.

Krajnji rezultat istraživanja predstavlja procena efikasnosti odabranih savremenih i klasičnih metoda. Takođe se očekivalo utvrđivanje osnovnih preduslova za uvođenje molekularnih metoda u rutinsku proceduru identifikacije serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* podvrste *enterica* pri svakodnevnoj mikrobiološkoj dijagnostici.

Za identifikaciju izolovanih serovarijeteta salmonela primenile su se sledeće metode:

- 1) metode klasične aglutinacije na pločici;
- 2) multipleks i simpleks PCR metode;
- 3) metode sekvenciranja gena za 16S rRNK;
- 4) procena efikasnosti odabranih molekularnih i klasičnih metoda

Za ostvarivanje ovih ciljeva postavljeni su sledeći zadaci:

- 1 Prikupljanje izolata *Salmonella enterica ssp. enterica* tokom rutinskog rada u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta "Subotica" primenom klasičnih bakterioloških metoda.

- 2 Identifikacija izolata na osnovu njihovih morfoloških i biohemijskih karakteristika
- 3 Klasičnu serotipizaciju izolata salmonela
- 4 Primena PCR metoda za identifikaciju određenih serovarijeteta
- 5 Određivanje nivoa efikasnosti primene sekvenciranja gena za 16S rRNK u identifikaciji salmonela izolata
- 6 Upoređivanje rezultata klasične serotipizacije sa rezultatima molekularno-bioloških metoda

4 MATERIJAL I METODE

Istraživanjem je obuhvaćeno 107 izolata *Salmonella enterica* subsp. *enterica* izolovanih iz uzoraka poreklom od domaćih životinja, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje, koji su pristigli u mikrobiološku laboratoriju VSI „Subotica” sa njegovog epizootiološkog područja u periodu od 2013-2016. godine. U tabeli Tabela 10 je dat prikaz broja i porekla izolata korišćenih u ovom radu.

Tabela 10: Broj i poreklo ispitanih izolata *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

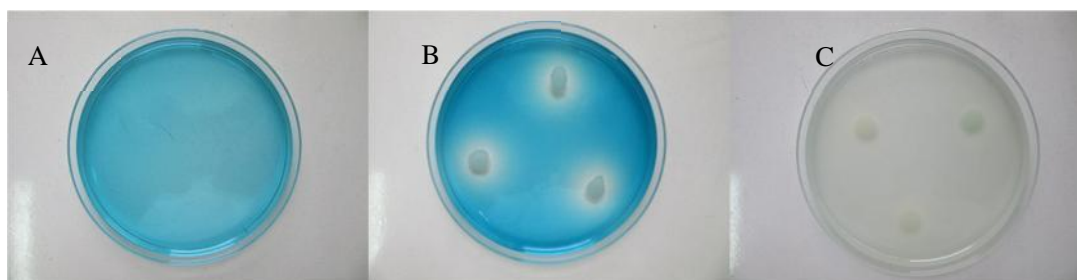
| Vrsta životinje | Vrsta uzorka | Broj izolata |
|--------------------|------------------------|--------------|
| Domaća kokoš | Feces | 66 |
| | Unutrašnji organi | 16 |
| | Trup zaklane životinje | 5 |
| | Bris iz objekta | 1 |
| Ćurka | Trup zaklane životinje | 3 |
| | Feces | 2 |
| Golub | Unutrašnji organi | 1 |
| Guska | Feces | 1 |
| Patka | Feces | 1 |
| Svinja | Feces | 1 |
| | Trup zaklane životinje | 1 |
| Tukan | Unutrašnji organi | 1 |
| Čovek | Stolica | 1 |
| Hrana za životinje | Hrana za životinje | 7 |
| Ukupno | | 107 |

4.1 Izolacija i identifikacija salmonela primenom klasičnih mikrobioloških metoda

Pri izolaciji *Salmonella enterica* subsp. *enterica* korišćene su različite metode u zavisnosti od vrste uzoraka.

U slučaju uzoraka fecesa i briseva iz objekata upotrebljena je metoda SRPS EN ISO 6579:2008, Prilog D - Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Otkrivanje *Salmonella* spp. u fecesu životinja i u uzorcima iz životne sredine u primarnoj fazi proizvodnje(115):

- a) Predobogaćenje uzorka je vršeno u puferisanoj peptonskoj vodi (BPW, proizvođač Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) inkubacijom na 37 ± 1 °C u periodu od 18 ± 2 časa.
- b) Obogaćenje na selektivnoj polučvrstoj podlozi – ukupno 100 µl kulture dobijene u BPW je presejano nakon inkubacije na ploče sa modifikovanim polučvrstim Rappaport-Vassiliadis agarom (MSRV, proizvođač Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) u obliku tri kapi na jednakom rastojanju (Slika 1). Ploče su inkubirane na temperaturi od $41,5\pm 1$ °C. Zasejane ploče su prvi put očitavane nakon 24-časovne inkubacije i u slučaju rasta karakterističnog za salmonela (Slika 1) vršeno je presejavanje na selektivne diferencijalne podloge. Negativne MSRV ploče su se vraćale na inkubaciju na $41,5\pm 1$ °C na dodatna 24 časa. U slučaju kad je ploča i nakon toga ostala negativna ispitani uzorak je proglašen slobodnim od salmonela, dok u slučaju pojave pozitivne reakcije nastavilo se sa selektivnom izolacijom.
- c) Selektivna izolacija: sa ivice karakterističnog rasta na MSRV podlozi zasejavale su se ploče ksiloza lizin dezoksiholatnog agara (XLD, proizvođač Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) i Rambach agara (proizvođač Merck Millipore, SAD).



Slika 1: Modifikovani polučvrsti Rappaport-Vassiliadis agar: A – nezasejana podloga; B – Rast na podlozi u slučaju negativnog uzorka; C – rast na podlozi kada je prisutna salmonela u uzorku (original).

Uzorci trupova zaklanih životinja i stočne hrane su ispitani metodom SRPS EN ISO 6579:2008 - Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna

metoda za otkrivanje *Salmonella spp.* (115):

- a) Predobogaćenje je vršeno na isti način kao kod prethodne metode.
- b) Selektivno obogaćenje u tečnim podlogama.

Kultura dobijena u fazi predobogaćenja zasejavana je na dve tečne podloge: količina kulture od 0,1 ml u 10 ml Rappaport-Vassiliadis bujona sa sojom (RVS bujon, proizvođač Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo), dok u količina od 1 ml u 10 ml Muller-Kauffmann tetracionat/novobiocin bujona (MKTT bujon, proizvođač Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo). Zasejani RVS bujon se inkubirao na $41,5 \pm 1$ °C 24 ± 3 tokom časa, a MKTT bujon na 37 ± 1 °C tokom 24 ± 3 časa.

- c) Selektivna izolacija: kulture iz obe selektivne tečne podloge su se presejavale na selektivne čvrste XLD i Rambach ploče opisane u prethodnoj metodi.

Pri ispitivanju uzoraka unutrašnjih organa životinja primenili smo metodu opisanu u poglavlju 2.9.9 priručnika OIE (148).

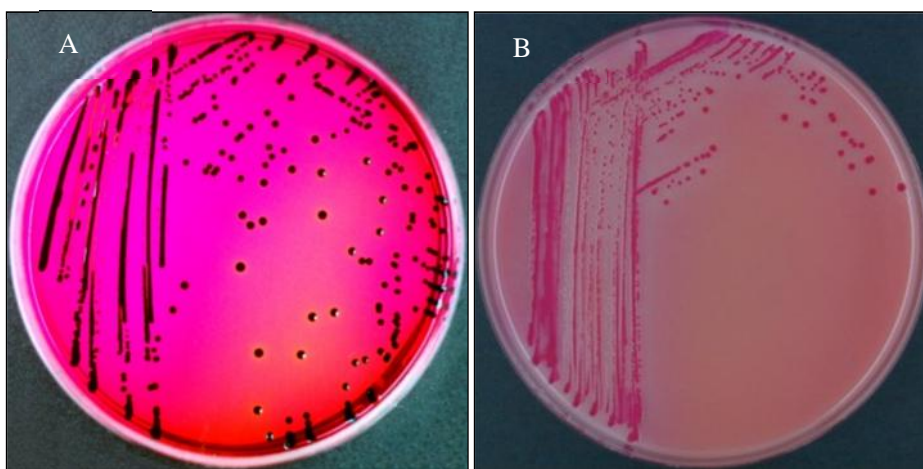
- a) Predobogaćenje je vršeno u BPW-u kao kod prethodnih uzoraka. Kod ove metode uzorci su i direktno zasejani na selektivno obogaćenje u selenit bujon (Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) koji je inkubiran na 37 ± 1 °C tokom 18 ± 2 časa.
- b) Kultura iz BPW nakon inkubacije je zasejavana na MSR/V agar na način kako je to opisano u metodi za ispitivanje fecesa. Druga selektivna podloga za obogaćenje koja je zasejana iz predobogaćene kulture je bio MKTT bujon. Inkubacija obe podloge je vršena kao što je gore opisano.
- c) Selektivna izolacija: sve tri podloge za selektivno obogaćivanje (Selenit bujon, MSR/V i MKTT) su presejane na selektivne čvrste XLD i Rambach ploče opisane u prethodnim metodama.

Kao što je izneto, selektivna izolacija se vrši kod sve tri metode na istim podlogama, samim tim i dalji tok izolacije salmonela se odvija kod svih uzoraka

na isti način.

Ploče XLD i Rambach agara nakon inkubacije na 37 ± 1 °C tokom 24 ± 3 časa, nakon čega su pregledavane na prisustvo kolonija karakterističnih za salmonele (Slika 2).

Karakteristične kolonije su se u cilju dobijanja čiste kulture, što je potrebno za potrebe dalje identifikacije, presejavale na ploču hranljivog agara (Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo) i inkubirane na 37 ± 1 °C 24 ± 3 časa.



Slika 2: Izgled tipičnih kolonija *Salmonella enterica* na čvrstim selektivnim podlogama.

A - XLD agar (slika je preuzeta sa internet stranice:

www.atlaS.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/plating_media/XLD)

B - Rambach agar (slika je preuzeta sa internet stranice:

www.atlaS.sund.ku.dk/microatlas/food/plating_mediaRambach)

Preliminarna biohemijska identifikacija je vršena zasejavanjem na trostruki šećer/gvožđe agar (Triple Sugar Iron Agar - TSI agar, Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo). Podloga je razlivena u epruvete na način da se obezbedi i dubina i kosina. Podloga se nakon zasejavanja inkubirala 37 ± 1 °C 24 ± 3 časa. Boja dubine, odnosno kosine podloge daje podatke o osnovnim biohemijskim karakteristikama rodova iz familije *Enterobacteriaceae*. U slučaju *Salmonella*

enterica nakon inkubacije kosina podloge je crvena jer ona ne razlaže laktozu, dok dubina je crna zbog stvaranja vodonik sulfida (Slika 3)



Slika 3 : Uporedan prikaz rasta nekoliko predstavnika familije *Enterobacteriaceae* na TSI agaru. S leva na desno *Salmonella* sp., *Proteus* sp., *E. coli*, *Enterobacter* sp. (original)

Za konačnu biohemijsku identifikaciju izolovanih sojeva salmonela korišćen je biohemijski niz opisan u metodi SRPS EN ISO 6579:2008 - Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp. (115): proizvodnja indola iz triptofana, metil crveno reakcija, Voges-Proskauer reakcija, razlaganje uree, dekarboksilacija lizina i razlaganje orto nitofenil β galaktozida.

Identifikacija odabranih sojeva salmonela potvrđen je i poluautomatskim identifikacionim sistemom API 20 E (bioMerieux, Francuska) prema uputstvu proizvođača. Kao kontrole ispitani su i referentne sojevi *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i *S. Infantis* ATCC 51741.

Korišćenjem ove metode identifikacija rodova odnosno vrsta iz familije *Enterobacteriaceae* se vrši na osnovu rezultata 20 biohemijskih reakcija: β -galaktozidaza (ONPG), arginin dihidrolaza (ADH), lizin dekarboksilaza (LDC),

ornitin dekarboksilaza (ODC), korišćenje citrata (CIT), stvaranje vodonik sulfida (H_2S), ureaza (URE), triptofan deaminaza (TDA), stvaranje indola (IND), Voges-Proskauer reakcija (VP), želatinaza (GEL), razlaganje glukoze (GLU), razlaganje manitola (MAN), razlaganje inozitola (INO), razlaganje sorbitola (SOR), razlaganje ramnoze (RHA), razlaganje saharoze (SAC), razlaganje melibioze (MEL), razlaganje amigdalina (AMY) i razlaganje arabinoze (ARA). Biohemijske reakcije su podeljene u grupe od po tri testa i pozitivne reakcije na svaki od njih nosi određeni broj bodova koji se sabiraju u okviru tih grupa. Na ovaj način se dobije kōd od sedam cifara koji se unosi u Apiveb™ bazu podataka i dobije se verovatnoća identifikacije datog izolata. Rezolucija identifikacije u slučaju salmonela je do nivoa roda. Za zasejavanje sistema uzeta je prekončna kultura izolata preliminarno identifikovanih kao salmonela sa hranljivog agara. (Slika 4).



Slika 4: Reakcije na poluautomatskom identifikacionom sistemu API 20 E.

Gornji red prikazuje pozitivne, dok donji red negativne reakcije (Slika preuzeta sa internet stranice: www.tgw1916.net/Tests/api.html).

U serološkoj tipizaciji salmonela bili su primenjeni specifični dijagnostički serumi za metodu brze aglutinacije na pločici (Statens Serum Institut, Danska i Bio-Rad, SAD), a određivanje serovarijeteta je izvršeno na osnovu White-Kauffmann-Le Minor šeme. Serotip određenih izolata je potvrđen i u Referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* i *Yersinia enterocolitica* Instituta za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut".

4.1.1 Kultivacija ispitivanih sojeva salmonela radi izolacije DNK

Radi izolacije DNK odabrani izolati bakterija su gajeni u tečnom Luria – Bertani medijumu (LB bujon, Becton Dickinson, Ujedinjeno Kraljevstvo), uz aeraciju 12-18 h na 37 °C, na horizontalnoj rotacionoj mešalici pri 180 obrtaja po minuti.

4.2 Molekularne metode

4.2.1 Izolovanje genomske DNK

Za izolaciju genomske DNK iz prekonoćnih bakterijskih kultura korišćen je *Quick-DNK Universal kit* (Zymo Research Corp., SAD) prema protokolu proizvođača. Ukratko, u 200 µl prekonoćne bakterijske kulture na LB bujonu, alikvotiranih u epruvetu zapremine 1,5 ml dodavano je po 200 µl *BioFluid 7 Cell Buffer-a* i 20 µl proteinaze K. Sadržaj epruvete je dobro promućkan, a potom inkubiran na 55 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemačka) u trajanju od 10 minuta. Po isteku vremena inkubacije u epruvetu je dodavan jedan volumen pufera za vezivanje genomske DNK (eng. *Genomic Binding Buffer*), tj. u uzorak čija je zapremina bila 420 µl dodavano je isto toliko pufera za vezivanje genomske DNK. U sledećem koraku ukupna zapremina smeše je prebacivana na kolonice za prečišćavanje (Zymo-Spin IIC-XL Column) koje su centrifugirane na 12000×g 1 minut (13000 obr./min; Centrifuge 5451 D, Eppendorf, Nemačka). Po završetku centrifugiranja, zajedno sa epruvetom za sakupljanje u kojoj se nalazila kolonica, odbacivan je sadržaj koji je prošao kroz kolonicu. U sledećem koraku je na kolonicu, koja je stavljena u novu epruvetu za sakupljanje, dodato 400 µl *DNA Pre-Wash Buffer-a*, zatim je kolonica centrifugirana pod istim uslovima kao u prethodnom koraku. Pošto je epruveta za sakupljanje ispražnjena i kolonica vraćena u nju, na samu kolonicu je nanoseno 700 µl *g-DNA Wash Buffer-a*, koja je potom centrifugirana (1 minut, 13000 obr/min). Sadržaj epruvete za sakupljanje je ispražnjen, a na kolonicu koja je vraćena u istu epruvetu dodato još 200 µl *g-DNA Wash Buffer-a*. Kolonica je još jednom centrifugirana pod istim uslovima, i po završetku kolonica je prebačena u čistu

epruvetu zapremine 1,5 ml. Dodavanjem $\geq 50 \mu\text{l}$ pufera za eluciju DNK (*DNA Elution Buffer*) i centrifugiranjem 1 minut na 13000 obr/min, pošto je kolonica inkubirana 5 minuta, genomska DNK je eluirana sa kolonice.

4.2.2 Umnožavanje odabranih gena u reakciji lančane polimerizacije (PCR metoda)

Tokom ove studije za umnožavanje odabranih gena u reakciji lančane polimerizacije kao matrica se koristila genomska DNK izolovana iz odabranih izolata. Korišćeno je sedam parova prajmera za identifikaciju serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Upotrebljeni oligonukleotidi preuzeti su iz publikacije Zhu i saradnika (257) i Kardos i saradnika (124). Podaci o sekvencama prajmera, segmentima DNK koje umnožavaju (gena i lokusa), pozicijama ovih segmenata u okviru genoma, i veličini očekivanih PCR produkata su prikazani u Tabeli 11. U radu su korišćeni prajmeri proizvođača Invitrogen iz SAD.

Sve PCR reakcije su izvođene u ukupnoj zapremini od 30 μl korišćenjem KAPA Taq PCR sistema (KAPA Biosystems Kit, USA). Sastav reakcione smeše pojedinačnih PCR reakcija je prikazan u Tabeli 12. Multipleks PCR reakcije su izvedene u smeši sastava opisanog u Tabeli 13.

Uslovi pod kojima su se odvijale PCR reakcije su bile identične i za pojedinačne i za multipleks PCR reakcije, a korišćeni temperaturni režim je naveden u Tabeli 14.

Tokom optimizacije PCR reakcija, zatim kasnije kao pozitivne kontrole pri izvođenju umnožavanja karakterističnih delova gena ili lokusa su korišćene su genomske DNK izolovane iz sledećih referentnih sojeva: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *S. Infantis* ATCC 51741, *S. Typhimurium* ATCC 14028 i *S. Pullorum* ATCC 13036. Kao negativna kontrola PCR reakcije korišćena je DNK *Escherichia coli* ATCC 25922. Sve PCR reakcije su izvedene u aparatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA). Vizualizacija PCR produkata je izvršena elektroforezom na gelu agaroze (1,2%).

Tabela 11: Lista upotrebljenih prajmera sa naznačenim ciljnim DNK sekvencama, veličinom PCR produkata, ciljnim serovarijetetima i Pristupni broj i pozicija nukleotida

| Prajmer | 5'-3' sekvenca | Ciljani gen ili lokus | Veličina PCR produkta | Ciljana vrsta / serovarijetet | Pristupni broj i pozicija nukleotida | Ref. |
|----------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|---|--------------------------------------|-------|
| bcfC-F | GGGTGGGCGGAA AACTATTTTC | <i>bcfC</i> ¹ | 993 bp | Sve <i>S. enterica</i> | AM933172 | (257) |
| bcfC-R | CGGCACGGCGGA ATAGAGCAC | | | | 25655-26657 | |
| heli-F | ACAGCCCGCTGTT TAATGGTG | heli ² | 782 bp | Heidelberg | CP005995 | |
| heli-R | CGCGTAATCGAGT AGTTGCC | | | | 3226024- 3226805 | |
| steB -F | TGTCGACTGGGAC CCGCCCGCCCGC | <i>steB</i> ³ | 636 bp | Enteritidis, Heidelberg, Kentucky, Gallinarum biotip Gallinarum, pripadnici Grupe 1 po referenci. | AM933173 | |
| steB-R | CCATCTTGTAGCG CACCAT | | | | 2976016-2976651 | |
| rhs-F | TCGTTTACGGCATT ACACAAGTA | rhs lokus | 402 bp | Gallinarum oba biotipa | AM933173 | |
| rhs -R | CAAACCCAGAGCC AATCTTATCT | | | | 334109-334510 | |
| sdf-F | TGTGTTTTATCTGA TGCAAGAG | sdf lokus | 293 bp | Enteritidis | AF370716 | |
| sdf-R | CGTTCTTCTGGTAC TTCAGATGAC | | | | 4950-3242 | |
| gly-F | TTCCAATTGAAAC GAGIGCGG | gly ⁴ | 170 bp | Kentucky | ABEI01000007 | |
| gly-R | ACTAACCGCTTGG GTTGTTGCTGT | | | | 116981-117150 | |
| 558f | AACAACGACAGCT TATGCCG | <i>fljB</i> ⁵ | 727 bp | Infantis | | (124) |
| 1275r | CCACCTGCGCAA CGCT | | | | | |

¹*bcfC* – gen proteina sa ulogom u biogenezi fimbrija.

²*heli* – otvoreni okvir čitanja predviđene, tj. hipotetičke helikaze.

³*steB* – gen fimbrijalnog proteina.

⁴*gly* – otvoreni okvir čitanja predviđenog, odnosno hipotetičkog membranskog proteina.

⁵*fljB* – gen flagelina druge faze.

Tabela 12: Sastav smeše pojedinačne PCR reakcije

| Komponenta | Finalna koncentracija |
|--------------------------------------|-----------------------|
| 10X KAPA Taq Pufer B | 1X |
| 10 mM dNTP Mix | 0,2 mM svaki |
| 10 μ M Prajmer F | 0,4 μ M |
| 10 μ M Prajmer R | 0,4 μ M |
| 5 U/ μ l KAPA Taq DNK Polimeraza | 1 U |
| DNK matrica | do 250 ng |

Tabela 13: Sastav smeše za optimizovanu multipleks PCR reakciju

| Komponenta | Finalna koncentracija |
|--------------------------------------|-----------------------|
| 10X KAPA Taq Pufer B | 1X |
| 10 mM dNTP Mix | 0,3 mM svaki |
| 10 μ M <i>bcfC</i> -F | 0,4 μ M |
| 10 μ M <i>bcfC</i> -R | 0,4 μ M |
| 10 μ M <i>steB</i> -F | 0,4 μ M |
| 10 μ M <i>steB</i> -R | 0,4 μ M |
| 10 μ M <i>sdf</i> -F | 0,4 μ M |
| 10 μ M <i>sdf</i> -R | 0,4 μ M |
| 5 U/ μ l KAPA Taq DNK Polimeraza | 2,5 U |
| DNK matrica | do 250 ng |

Kako pojedinačne, tako i multipleks PCR reakcije su izvedene pod istim uslovima. Primenjeni temperaturni režim je naveden u Tabeli 14.

Tabela 14: Uslovi PCR reakcija za identifikaciju odabranih serovarijeteta salmonela

| Proces | Temperatura | Vreme |
|-------------------------|---------------|--------|
| Inicijalna denaturacija | 95°C | 10 min |
| 35 ciklusa | Denaturacija | 30 s |
| | Hibridizacija | 30 s |
| | Elongacija | 70 s |
| Finalna ekstenzija | 72°C | 3 min |
| Hlađenje | 4°C | ~ |

4.2.3 Horizontalna elektroforeza u agarozu

Kvalitet i uspešnost izolacije genomske DNK, kao i rezultati PCR reakcija su analizirani horizontalnom elektroforezom na agaroznim gelovima. Za pravljenje gela korišćen je 1,2 % rastvor agaroze (Serva, Nemačka) u 1× TBE puferu. Kao stok pufera korišćen je 10×TBE pufera sledećeg sastava: 109 g Tris, 55,6 g borne kiseline i 9,3 g EDTA u 1 l destilovane vode, pH 8. Agaroz je rastvarana zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja gela, ali pre nego gel očvrsne, dodavan je etidijum bromid u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml. Ovo jedinjenje interkalira u dvolančani molekul DNK i omogućuje vizualizaciju DNK pod UV svetlom. Uzorci DNK su mešani sa puferom za nanošenje uzorka na gel u odnosu 5:1 i dodavani u udubljenja koja ostaju u očvrsnom gelu nakon izvlačenja česljeva.

Veličina DNK fragmenata nakon PCR amplifikacije gena je procenjivana poređenjem sa elektroforetskom pokretljivošću standarda koji sadrži DNK fragmente poznatih dužina. Kao standard (eng. ladder) za procenu dužine PCR amplifikovanih fragmenata korišten je O'Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder i GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, SAD). Očekivane dužine DNK fragmenta nakon PCR amplifikacije gena su bile sledeće: ~1500 bp (16S rRNK), 993 bp (*bcfC*), 782 bp (heli ORF), 727 bp (*fljB*), 636 bp (*steB*), 402 bp (rhs lokus), 293 bp (sdf lokus) i 170 bp (gly ORF) (Tabela 20).

Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 9V po dužnom centimetru gela. Nakon završetka elektroforeze, detekcija fragmenata DNK je vršena pod UV svetlom talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Nemačka).

4.2.4 *In silico* analiza

U cilju dobijanja *in silico* PCR profila serovarijeteta *S. Derby*, *S. Havana*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka*, *S. Livingstone*, *S. Senftenberg*, *S. Tennessee*, *S. Lille* i

S. Virchow njihovi genomi su pretraženi na prisustvo DNK sekvenci koje se specifično umnožavaju primenom korišćenih prajmera. Poklapanje sekvenci je izvršeno koristeći BLAST algoritam (6). Podaci za sekvence svih genoma su obezbeđeni sa NCBI stranice (www.ncbi.nlm.nih.gov) i bili su sledeći: (GenBank: LAZB000000000.1) za *S. Derby*, (GenBank: JWQJ000000000.1) za *S. Havana*, (GenBank: LN649235.1) za *S. Infantis*, (GenBank: AMRS01000002) za *S. Mbandaka*, (GenBank: JZWK000000000.1) za *S. Livingstone*, (GenBank: CAGQ000000000.1) za *S. Senftenberg*, (GenBank: CP007505.1) za *S. Tennessee*, (GenBank: JQWF000000000.1) za *S. Lille* i (GenBank: MP000000000.1) za *S. Virchow*.

4.3 Sekvenciranje gena za 16S rRNK

4.3.1 Umnožavanje dela gena za 16S rRNK

Umnožavanje dela gena za 16S rRNK rađeno je lančanom reakcijom polimerizacije korišćenjem univerzalnih bakterijskih prajmera objavljenih u radu Weisburga i saradnika (244). Njihova sekvenca, ciljni gen i veličina očekivanog PCR produkta su navedeni u Tabeli 15. Reakciona smeša je pripremljena prema uputstvu proizvođača korišćenog KAPA Taq PCR Kit sistema. Njen sastav je prikazan u Tabeli 16. Kao DNK matrica korišćena je ukupna genomska DNK odabranih izolata salmonela izolovana na način opisan u delu „*Izolovanje genomske DNK*“.

Tabela 15: Sekvence prajmera korišćenih za umnožavanje gena za 16S rRNK.

| Prajmer | 5'-3' sekvenca | Ciljna sekvenca | Veličina PCR produkta (bp) | Ref. |
|---------|----------------------|-----------------|----------------------------|-------|
| 27f | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | gen za 16S rRNK | ~1500 bp | (244) |
| 1492r | CGGCTACCTTGTTACGACTT | | | |

Tabela 16: Sastav smeše PCR reakcije za umnožavanje gena za 16S rRNK.

| Komponenta | Finalna zaprema 50 μ l | Finalna koncentracija |
|---|----------------------------|-----------------------|
| PCR voda | Do 50 μ l | N/A |
| 10X KAPA Taq Pufer sa 25 mM MgCl ₂ | 5,0 μ l | 1X |
| 10 mM dNTP Mix | 1 μ l | 0,2 mM svaki |
| 10 μ M 27f | 2 μ l | 0,4 μ M |
| 10 μ M 1492r | 2 μ l | 0,4 μ M |
| 5 U/ μ l KAPA Taq DNK Polimeraza | 0,2 μ l | 1 U |
| DNK matrica | X μ l | ~ 50-250 ng |

Protokol za izvođenje lančane reakcije polimerizacije predstavljen je u Tabeli 17.

Tabela 17: PCR program za umnožavanje gena za 16S rRNK.

| Proces | Temperatura | Vreme |
|-------------------------|---------------|-------|
| Inicijalna denaturacija | 95°C | 3 min |
| 35 ciklusa | Denaturacija | 30 s |
| | Hibridizacija | 90 s |
| | Elongacija | 60 s |
| Finalna ekstenzija | 72°C | 3 min |
| Hlađenje | 4°C | ~ |

4.3.2 Prečišćavanje PCR proizvoda

Po završetku lančane reakcije polimerizacije, uzorci su analizirani horizontalnom gel elektroforezom na 1% agaroznom gelu. PCR proizvod je prečišćen primenom QIAquick® PCR Purification Kit sistema (Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, u PCR reakciju dodat je pufer za vezivanje (*Buffer PB*) u odnosu 1:5. Sadržaj epruvete je dobro promućkan. Ukupna zapremina smeše je prebacivana na kolonice za prečišćavanje (*QIAquick column*) koje su centrifugirane na 13000 obrtaja u minuti 1 minut (Centrifuge 5451 D, Eppendorf, Nemačka). Po završetku centrifugiranja, iz epruvete za sakupljanje je odbacivan sadržaj koji je prošao kroz kolonicu. U sledećem koraku je na kolonicu, koja je vraćena u istu epruvetu za sakupljanje,

dodato 750 μ l PE pufera, te je kolonica centrifugirana pod istim uslovima kao u prethodnom koraku i na taj način su uklonjene nečistoće kao što su neiskorišteni prajmeri, soli, neugrađeni nukleotidi i sl. Pošto je epruveta za sakupljanje ispražnjena i kolonica vraćena u nju centrifugiranje je ponovljeno pod istim uslovima, čime je uklonjen zaostali PE pufer. Potom je kolonica prebačena u čistu epruvetu od 1,5 ml. Dodavanjem 50 μ l pufera za eluciju (*Buffer PE*) na sredinu membrane kolonice za prečišćavanje i centrifugiranjem 1 minut na 13000 obrtaja u minuti prečišćena DNK je sakupljena.

4.3.3 Određivanje koncentracije DNK

Koncentracija DNK je proverena spot testom, nanošenjem 1 μ l izolovane DNK i DNK standardnih koncentracija (2, 5, 10 i 20 ng/ μ l λ DNK) na 1% agaroznu podlogu sa dodatkom 0,5 μ g/ml etidijum-bromida. Nakon 20 minuta inkubacije, koncentracija je određena osvetljavanjem UV svetlošću talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Nemačka).

4.3.4 Sekvenciranje umnoženog gena za 16S rRNK

Sekvenciranje umnoženih 16S rRNK gena rađeno je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Foster City, SAD), uz upotrebu komercijalnog kita za sekvenciranje BigDye Terminator v3.2 Cycle Sequencing kompanije Applied Biosystems (Foster City, SAD). Reakciona smeša za sekvenciranje sadržala je 3 μ l Ready Reaction Mix-a iz komercijalnog kita za sekvenciranje (BigDye Terminator v3.2 Cycle Sequencing kompanije Applied Biosystems, Foster Siti, SAD), 3,2 pmol prajmera (27f ili 1492r), 10 ng DNK matrice, i destilovane vode do finalne zapremine od 8 μ l. Program reakcije sekvenciranja prikazan je u Tabeli 18. Umnožavanje je rađeno u PCR aparatu Applied Biosystems 2720 Thermocycler (Foster City, SAD).

Tabela 18: Protokol za sekvenciranje.

| Proces | | Temperatura | Vreme |
|-------------------------|---------------|-------------|-------|
| Inicijalna denaturacija | | 96°C | 1 min |
| 25 ciklusa | Denaturacija | 96°C | 10 s |
| | Hibridizacija | 50°C | 5 s |
| | Elongacija | 60°C | 4 min |

Dobijeni produkti su prečišćavani dodavanjem 40 μ l rastvora A (1,2 ml 3M CH₃COONa, 25 ml etanola, 5,8 ml destilovane vode) i centrifugiranjem u trajanju od 10 min na 13000 obrtaja/min. Nakon odlivanja supernatanta talog je ispiran sa 200 μ l 70% etanola uz centrifugiranje pod istim uslovima. Ovaj korak je dva puta ponovljen. Talog je potom osušen i rastvoren u 25 μ l visoko dejonizovanom (Highly Deionised - HiDi) formamidu. Analiza sekvenci rađena je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer korišćenjem softverskog paketa SeqAnalyzer.

Dobijene sekvence 16S rRNK gena preklopljene su SeqMan alatom iz DNASTar softvera (Lasergene). Preklopljene sekvence 16S rRNK gena su poređene sa deponovanim sekvencama u GenBank bazi podataka upotrebom BLASTx 2.3.1 alatke (170).

5 REZULTATI

5.1 Klasična identifikacija serovarijeteta *Salmonella enterica*

Svih 107 izolata odabranih za potrebe ove studije su pokazali karakteristične biohemijske reakcije za *Salmonella enterica* subsp *enterica*: nisu proizvodili indol iz triptofana, metil crveno reakcija je bila pozitivna, Voges-Proskauer reakcija negativna, ureu nisu razlagali, vršili su dekarboksilaciju lizina, dok orto nitofenil β galaktozid nisu razlagali.

Potvrдна biohemijska identifikacija poluautomatskim identifikacionim sistemom API 20 E je izvršeno u slučaju 47 izolata predmeta ove studije, paralelno sa referentnim kulturama *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i *S. Infantis* ATCC 51741. Ispitivanja su generisala dvanaest različitih kōdova za identifikaciju: 4504752, 4704512, 6404552, 6504552, 6504712, 6504752, 6704112, 6704152, 6704512, 6704552, 6704712, 6704752 (Slika 5). Na osnovu toga verovatnoća da ispitani izolati pripadaju rodu *Salmonella* kretala se od 89,6 do 99,9 %. Prema kriterijumima korišćenog identifikacionog sistema ovi rezultati u sklopu sa serotipizacijom dokazuju da su svi ispitani sojevi predstavnici roda *Salmonella*.



Slika 5: Reakcija na API 20 E traci zasejanoj kulturom *S. Infantis* (izolat broj 30). Identifikacioni kōd je u ovom slučaju 6704752, što predstavlja verovatnoću od 99,9% da se radi o pripadniku roda *Salmonella* (original).

Klasičnom serotipizacijom od ispitanih 107 *Salmonella* izolata njih 52 su identifikovana kao *S. Infantis*, 33 kao *S. Enteritidis*, 5 kao *S. Tennessee*, 4 kao *S. Mbandaka*, 3 kao *S. Montevideo*, 2 kao *S. Havana*, 2 kao *S. Lille*, 2 kao *S. Senftenberg*, i po jedan od sledećih serovarijeteta: *S. Typhimurium*, *S. Agona*,

Tabela 19: Broj izolovanih serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* po vrstama ispitivanih uzoraka

| Serovarijetet | Vrsta uzorka | Broj izolata |
|--------------------|------------------------------------|--------------|
| Enteritidis | Feces pilića | 15 |
| | Feces koka nosilja | 8 |
| | Parenhimatozni organi pilića | 3 |
| | Parenhimatozni organi koke nosilje | 2 |
| | Izmet čoveka | 1 |
| | Pileće meso | 1 |
| | Uginuli embrioni pilića | 1 |
| | Bris sa trupa svinje | 1 |
| | Feces guske | 1 |
| Enteritidis | Ukupno | 33 |
| Infantis | Feces pilića | 34 |
| | Parenhimatozni organi pilića | 7 |
| | Trup zaklane živine | 4 |
| | Pileće meso | 2 |
| | Creva pilića | 2 |
| | Feces koka nosilja | 1 |
| | Feces ćurića | 1 |
| | Bris iz objekta | 1 |
| Infantis | Ukupno | 52 |
| Mbandaka | Feces pilića | 2 |
| | Parenhimatozni organi pilića | 1 |
| | Trup zaklane živine | 1 |
| Mbandaka | Ukupno | 4 |
| Montevideo | Parenhimatozni organi pilića | 1 |
| | Trup zaklane živine | 1 |
| | Hrana za životinje | 1 |
| Montevideo | Ukupno | 3 |
| Senftenberg | Feces pilića | 1 |
| | Feces patke | 1 |
| Senftenberg | Ukupno | 2 |
| Tennessee | Hrana za životinje | 4 |
| | Feces ćurića | 1 |
| Tennessee | Ukupno | 5 |
| Typhimurium | Parenhimatozni organi goluba | 1 |
| Havana | Feces koka nosilja | 2 |
| Lille | Hrana za životinje | 2 |
| Agona | Feces koka nosilja | 1 |
| Derby | Rektalni bris svinje | 1 |
| Livingstone | Feces koka nosilja | 1 |
| Svi | Ukupno | 107 |

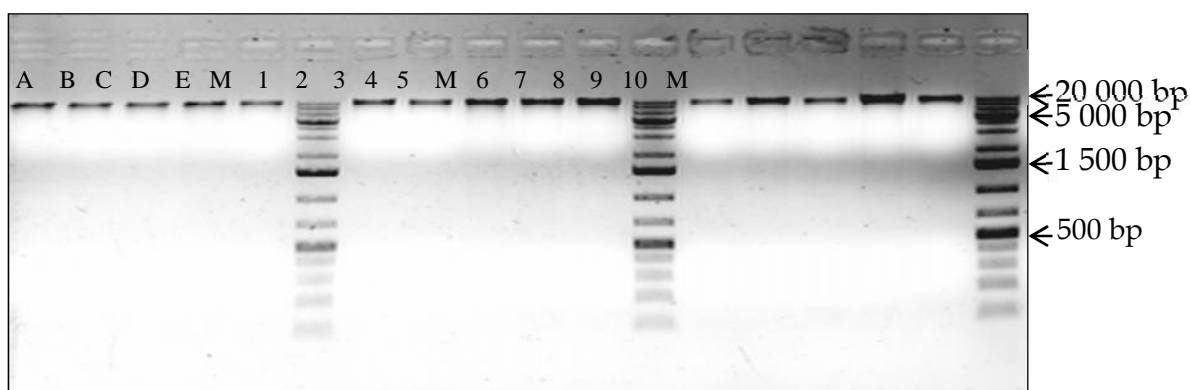
S. Derby, i *S. Livingstone*. Distribucija izolovanih serovarijeteta po vrstama ispitivanih uzoraka je prikazana u Tabeli 19.

Serotipizacija je potvrđena u Referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* i *Yersinia enterocolitica* Instituta za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut kod 27 sojeva. Konfirmacionim ispitivanjima je podvrgnuto osam sojeva serovarijeteta *Infantis*, tri *Tennessee*, po dva izolata serovarijeteta *Enteritidis*, *Mbandaka*, *Senftenberg*, *Lille*, *Havana* i *Montevideo*, kao i pojedinačni izolati *Typhimurium*, *Agona*, *Derby* i *Livingstone*.

5.2 Molekularno-biološka ispitivanja

5.2.1 Izolacija genomske DNK

Uspešnost ekstrakcije DNK ispitanih izolata je proveravana elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 6).



Slika 6. Izolacija DNK iz prekonocnih kultura bakterija

A - *E. coli* ATCC 25922; B - *S. Enteritidis* ATCC 13076; C - *S. Infantis* ATCC 51741; D - *S. Typhimurium* ATCC 14028; E - *S. Pullorum* ATCC 13036; 1-10 - genomska DNK deset odabranih izolata; M - marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, SAD).

5.2.2 Rezultati umnožavanja ciljnih sekvenci gena i lokusa u pojedinačnim PCR reakcijama i *in silico* analiza

Istražen je način za molekularnu tipizaciju salmonela upotrebom seta od šest prajmer parova koji su dizajnirali Zhu i saradnici (257) na bazi komparacije 3161 genomskih sekvenci 108 različitih *Salmonella enterica* serovarijeteta. Ovih šest parova prajmera su u originalnom radu stvorili jedinstvene profile traka omogućujući identifikaciju *S. Enteritidis* (pozitivan na *bcfC*, *steB*, *sdf*), *S. Heidelberg* (pozitivan na *bcfC*, *heli*, *steB*), *S. Kentucky* (pozitivan na *bcfC*, *steB*, *gly*), dva biotipa *S. Gallinarum* - *Gallinarum* (pozitivan na *bcfC*, *steB*, *rhs*) i *Pullorum* (pozitivan na *bcfC*, *rhs*) (257). Pored toga preostala 104 serovarijeteta *S. enterica*, čiji genomi su uzeti u obzir tokom dizajniranja prajmera, na osnovu svojih profila traka mogli su se razvrstati u dve grupe. Ova dva klastera su se označili kao Grupa 1 i Grupa 2 prema njihovim PCR profilima, koji se karakterišu sa amplifikacijom dva gena (*bcfC*, *steB*) ili samo *bcfC* gena, za redom. (Tabela 20).

Tabela 20: Identifikacija serovarijeteta salmonele sa setom od šest parova prajmera prema Zhu i sar.(257)

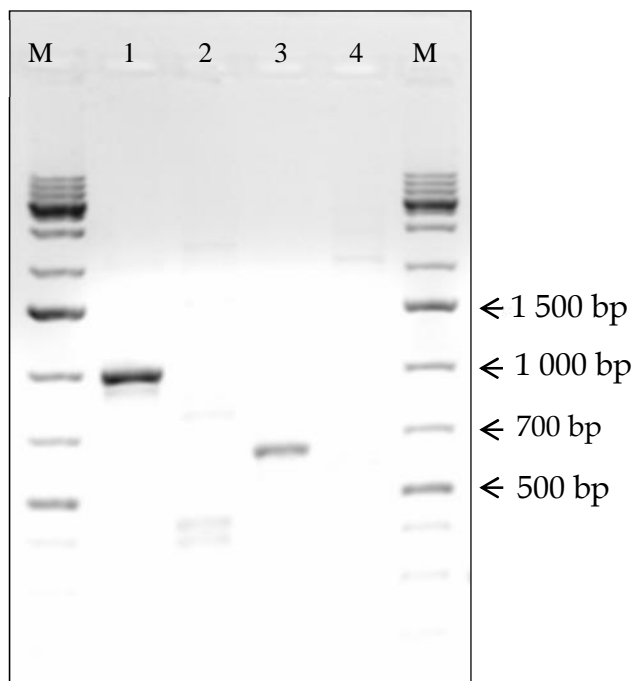
| Serovarijetet i biotip <i>S. enterica</i> | <i>bcfC</i> | <i>heli</i> | <i>steB</i> | <i>rhs</i> | <i>sdf</i> | <i>gly</i> |
|--|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| Enteritidis | + | - | + | - | + | - |
| Heidelberg | + | + | + | - | - | - |
| Kentucky | + | - | + | - | - | + |
| Gallinarum biotip Gallinarum | + | - | + | + | - | - |
| Gallinarum biotip Pullorum | + | - | - | + | - | - |
| Ostali serovarijeteti: | | | | | | |
| Grupa 1* | + | - | + | - | - | - |
| Grupa 2** | + | - | - | - | - | - |

*Ispitivani serovarijeteti predstavnici Grupe 1: Agona, Hadar, Paratyphi A, Paratyphi B var. Java, Abortusequi, Abortusovis, Saintpaul, Stanleyville, Typhisuis, Braenderup, Choleraesuis, Ohio, Thompson, Muenchen, Newport, Berta, Dublin, Panama, Typhi, Agoueve i Cerro.

**Ispitivani serovarijeteti predstavnici Grupe 2: Typhimurium, Montevideo, Schwarzengrund, Bareilly, Hartford, Oranienburg, Javiana, Mississippi i Pomona

5.2.2.1 Optimizacija pojedinačnih PCR reakcija za umnožavanje odabranih ciljnih sekvenci

Prvi korak pri izvođenju naše studije je bio uspostavljenje pojedinačnih PCR reakcija za svaki korišćeni par prajmera posebno. Optimizacija uslova za izvođenje ovih reakcija i verifikacija dužina PCR produkata vršene su na genomskoj DNK komercijalno pribavljenih ATCC sojeva *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, Typhimurium i Gallinarum biotip Pullorum. U svim reakcijama je korišćena DNK ATCC soja *Escherichia coli* u svojstvu negativne kontrole. Izgled karakterističnih traka za ciljne sekvence gena *bcfC* i *steB* je prikazan na Slici 7, dok Slika 8 prikazuje trake za *sdf* i *rhs* lokuse.

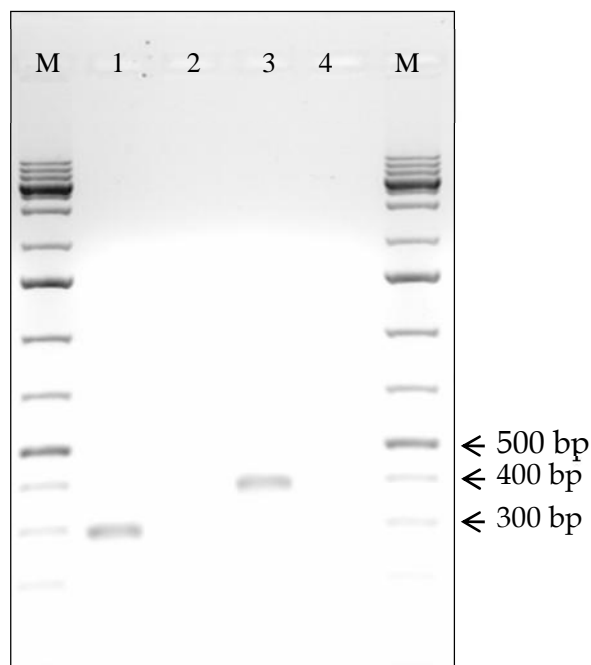


Slika 7. Umnožavanje *bcfC* i *steB* gena simpleks PCR reakcijama.

M - marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, SAD); 1 - *bcfC* PCR, dužina 993 bp, *S. Enteritidis* ATCC 13076; 2 - *bcfC* PCR, *E. coli* ATCC 25922, negativna kontrola; 3 - *steB* PCR, dužina 636 bp, *S. Enteritidis* ATCC 13076; 4 - *steB* PCR, *E. coli* ATCC 25922, negativna kontrola.

Preostala dva para prajmera Zhu-a i saradnika (257) za umnožavanje ciljnih

sekvenci unutar otvorenih okvira čitanja heli i gly su takođe testirana sa sva četiri referentna soja salmonela i *E. coli*. U ovim reakcijama, shodno očekivanom, nije bilo umnožavanja. Iako među izolatima sakupljenih za potrebe ovog istraživanja serovarijeteti *S. Heidelberg* i *S. Kentucky* nisu bili prisutni, pojedinačne PCR reakcije sa ovim parovima prajmera su ipak urađene za sve izolate u okviru ove preliminarne faze. Ovi testovi su takođe dali očekivani negativan rezultat (rezultati nisu prikazani), pa su, shodno tome, ta dva para prajmera isključena iz daljih ispitivanja, odnosno nisu korišćeni u optimizaciji multipleks PCR protokola.



Slika 8. Umnožavanje sdf i rhs lokusa

M - marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, SAD); 1 - sdf PCR *S. Enteritidis* ATCC 13076, dužina produkta je 293 bp; 2 - sdf PCR, *E. coli* ATCC 25922- negativna kontrola; 3 - rhs PCR *S. Pullorum* ATCC 13036, dužina produkta je 402 bp; 4 - rhs PCR, *E.*

5.2.2.2 Rezultati *in silico* analiza

S. Infantis, jedan od najčešće izolovanih salmonela serovarijeteta u Srbiji

(235) i najbrojniji među sojevima ispitanim u ovom radu, nije korišćen pri ispitivanjima Zhu-a i saradnika (257) (Tabela 20). Zato, da bi se utvrdio očekivani PCR profil *S. Infantis*, sekvenca genoma ovog serovarijeteta je ispitan *in silico* na prisustvo šest odabranih DNK sekvenci. Prema bioinformatičkoj analizi kod *S. Infantis* je utvrđeno postojanje samo *bcfC* gena, koji gen je specifičan za rod *Salmonella*. Shodno ovim rezultatima jasno je bilo da ovih šest parova prajmera ne formiraju jedinstveni PCR profil za *S. Infantis*, već da ovaj serovarijetet pripada Grupi 2.

U nastavku tome, i ostali serovarijeteti, koji nisu bili uključeni u ispitivanje koje su sproveli Zhu i sar. (257) (Tabela 20), ali su identifikovani klasičnom serotipizacijom među našim ispitanim izolatima salmonele (*S. Derby*, *S. Havana*, *S. Livingstone*, *S. Mbandaka*, i *S. Senftenberg*), podvrgnuti su *in silico* analizi. Dobijeni rezultati su pokazali da, izuzev *S. Livingstone*, svi ovi serovarijeteti spadaju u Grupu 1 (*bcfC* i *steB* pozitivni).

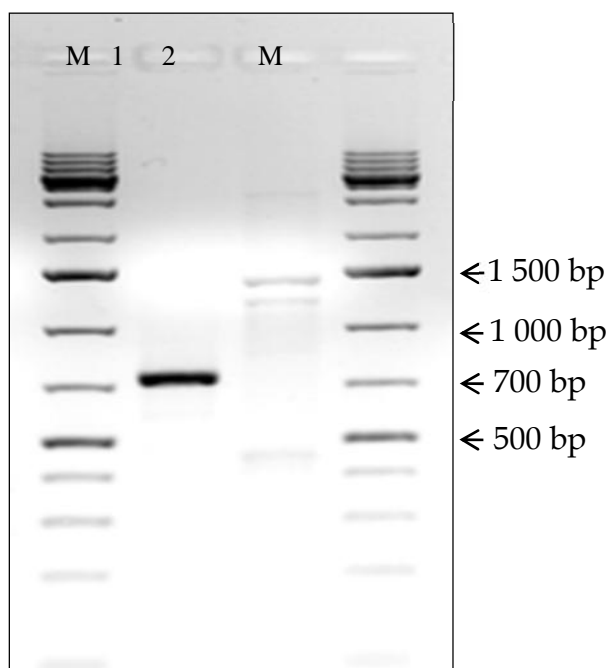
In silico analiza genoma *S. Livingstone* dala je neočekivan rezultat: kombinacija predviđenih PCR produkata dobijena ispitivanjem genoma ovog serovarijeteta se poklopila sa profilom traka koji su Zhu i saradnici (257) našli jedinstvenim za *S. Gallinarum* biotip *Gallinarum*, uzročnika tifa kokoši (*bcfC*, *steB* i *rhs* pozitivni). Zbog ovog zapažanja izvedene su pojedinačne PCR reakcije za specifično umnožavanje ciljne sekvence *rhs* lokusa sa DNK svih ispitanih izolata da se isključi neočekivano prisustvo ovog PCR produkta kod nekog izolata osim *S. Livingstone*. Rezultati ovih pretraga su bili u skladu sa predviđanjem *in silico*: PCR produkt karakteristične dužine se pojavio samo kod soja *S. Livingstone*, dok svi ostali izolati bili PCR negativni na *rhs* lokus (Tabela 24).

Mada serovarijeteta *S. Virchow* nije bilo među ispitanim izolatima, njegov PCR profil je proveren zbog velike antigenske srodnosti ovog serovarijeteta sa *S. Infantis*, zatim zbog činjenice, da prema Pravilniku (182) takođe spada u salmonele druge kategorije. *In silico* analizom je utvrđeno da se *S. Virchow*

svrstava u Grupu 1 za razliku od *S. Infantis*, koja pripada Grupi 2, samim tim izabrani način analize genoma ih jasno razlikuje uprkos njihovoj antigenskoj sličnosti.

5.2.2.3 Odabir i optimizacija pojedinačne PCR reakcije za identifikaciju *S. Infantis*

Zbog velikog broja izolata serovarijeteta *S. Infantis* među našim sojevima, kao i zbog značaja ovog serovarijeteta u Srbiji (182) i u Evropskoj Uniji (39), za njegovu identifikaciju bilo je potrebno uključiti u studiju par prajmera usmerenih ka specifičnoj sekvenci genoma ovog serovarijeteta. Cilj ovog postupka je bio njegovo jasno izdvajanje iz Grupe 2. Odabrani su oligonukleotidi objavljeni u radu Kardos-a i saradnika, pomoću kojih se umnožava gotovo ceo varijabilni deo flagelarnog gena *fljB* *S. Infantis* (124).



Slika 9.: Umnožavanje *fljB* gena za identifikaciju *S. Infantis*

M -marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, SAD); 1 - *fljB* PCR *S. Infantis* ATCC 51741, dužina produkta 727 bp; 2 - *fljB* PCR, *E. coli* ATCC 25922 - negativna kontrola.

Pri optimizaciji uslova za izvođenje pojedinačne reakcije sa ovim prajmerima i verifikaciji dužine PCR produkta korišćena je genomska DNK komercijalno pribavljenog ATCC soja *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis uz DNK ATCC soja serovarijeteta Enteritidis, Gallinarum biotip Pullorum, zatim *Escherichia coli* kao negativnih kontrola (Slika 9).

Reakcija je uspešno izvedena i sa DNK izolata *S. Infantis* koji su upotrebljeni pri dizajniranju parova prajmera od strane Kardosa i saradnika (124) (rezultati nisu prikazani). DNK ovih izolata nam je ustupljen iz Instituta za veterinarsko-medicinska istraživanja Akademije nauka Republike Mađarske ljubaznošću Dr Bele Nagy .

5.2.3 Definisane očekivanih PCR profila

Na osnovu rezultata pojedinačnih PCR reakcija, *in silico* analiza i informacija o identifikaciji izolata klasičnom serotipizacijom definisani su

Tabela 21: Očekivani PCR profili ispitanih serovarijeteta

| Serovarijeteti i biotipovi <i>S. enterica</i> | <i>bcfC</i> | <i>steB</i> | <i>sdf</i> | <i>rhs</i> | <i>fljB</i> |
|--|-------------|-------------|------------|------------|-------------|
| Enteritidis | + | + | + | - | - |
| Infantis | + | - | - | - | + |
| Gallinarum biotip Pullorum | + | - | - | + | - |
| Gallinarum biotip Gallinarum i Livingstone | + | + | - | + | - |
| Ostali serovarijeteti: | | | | | |
| Grupa 1* | + | + | - | - | - |
| Grupa 2** bez <i>S. Infantis</i> | + | - | - | - | - |

* Serovarijeteti predstavnici Grupe 1:

- Serovarijeteti čiji PCR profili određeni u izvornom radu (257): Agona, Hadar, Paratyphi A, Paratyphi B var. Java, , Abortusequi, Abortusovis, Saintpaul, Stanleyville, Typhisuis, Braenderup, Choleaesuis, Ohio, Thompson, , Muenchen, Newport, Berta, Dublin, Panama, Typhi, Agoueve i Cerro.
- Serovarijeteti svrstani u ovu grupu na osnovu rezultata *in silico* analize genoma: Senftenberg, Havana, Mbandaka, Derby, Tennessee, Lille, Virchow

** serovarijeteti predstavnici Grupe 2 (257):

- Typhimurium, Montevideo, Schwarzengrund, Bareilly, Hartford, Oranienburg, Javiana, Mississippi i Pomona.

očekivani PCR profili za serovarijetete ispitivane u ovoj studiji primenom pet parova prajmera koji su odabrani za njihovu molekularnu tipizaciju i optimizaciju multipleks PCR reakcije (Tabela 21).

5.2.4 Optimizacija multipleks PCR reakcije

Tokom optimizacije multipleks PCR reakcije testirali smo više parova prajmera (dva do pet parova) u različitim kombinacijama, u različitom sastavu reakcione smeše (različite koncentracije dNTP-a, enzima i različite kombinacije prajmera), kao i različite protokole PCR ciklusa (različite temperature hibridizacije) koristeći KAPA Taq PCR sistem (KAPA Biosystems, USA).

Nismo uspjeli da optimizujemo uslove za PCR reakciju sa korišćenim sistemom sa svih pet parova prajmera na način da rezultati budu pouzdano ponovljivi.

Maksimalan broj parova prajmera, sa kojim su rezultati multipleks PCR reakcije bili jasni, predstavljao je tri. Uzevši u obzir ovo ograničenje, zatim uopšteni značaj pojedinih serovarijeteta, kao i njihovu zastupljenost među ispitanim izolatima, odlučili smo se da optimizujemo tripleks PCR protokol koji bi obuhvatao parove prajmera za umnožavanje *bcfC* i *steB* gena i *sdf* lokusa. Ova kombinacija omogućava identifikaciju *S. Enteritidis*, kao najvažnijeg i najzastupljenijeg serovarijeteta, u jednom koraku (Tabela 22).

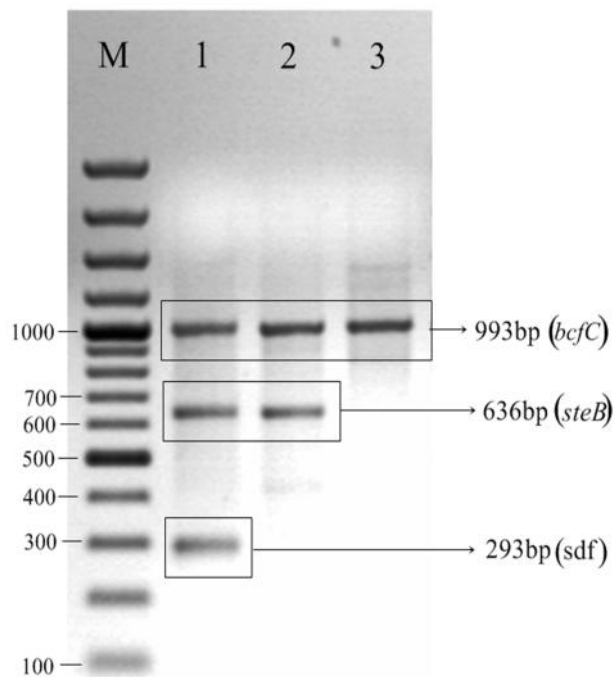
Tabela 22: Multipleks PCR profili *Salmonella* serovarijeteta

| Serovarijeteti i biotipovi <i>S. enterica</i> | <i>bcfC</i> | <i>steB</i> | <i>sdf</i> |
|---|-------------|-------------|------------|
| Enteritidis | + | + | + |
| Ostali serovarijeteti: | | | |
| Grupa 1* sa Gallinarum biotip Gallinarum i | + | + | - |
| Grupa 2** sa Gallinarum biotip Pullorum | + | - | - |

* Serovarijeteti predstavnici Grupe 1: Livingstone, Senftenberg, Havana, Mbandaka, Derby, Tennessee, Lille, Agona, Wirchov, Hadar, Paratyphi A, Paratyphi B var. Java, , Abortusequi, Abortusovis, Saintpaul, Stanleyville, Typhisuis, Braenderup, Choleaesuis, Ohio, Thompson, Muenchen, Newport, Berta, Dublin, Panama, Typhi, Agoueve i Cerro.

** Serovarijeteti predstavnici Grupe 2: Infantis, Typhimurium, Montevideo, Schwarzengrund, Bareilly, Hartford, Oranienburg, Javiana, Mississippi i Pomona.

Elektroforeza u agaroznom gelu pokazivala je da su parovi prajmera bili u stanju da umnožavaju očekivane specifične ciljne sekvence DNK i da se PCR produkti razdvajaju u jasne trake i u uslovima multipleks sredine (Slika 10).



Slika 10: Umnožavanje *bcfC* i *steB* gena i *sdf* lokusa multipleks PCR reakcijom

M - marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, SAD); 1 - *S. enterica* serovar *Enteritidis*; 2 - *S. enterica* iz Grupe 1 prema Tabeli 22; 3 - *S. enterica* iz Grupe 2 na osnovu Tabele 22.

Ova PCR reakcija omogućava nedvosmisleni identifikaciju *S. Enteritidis* čiji genom sadrži sve tri ciljne sekvence. Ostali serovarijeteti se ovom metodom svrstaju na osnovu svojih PCR profila u dve grupe: odsustvo produkta od 293-bp (*sdf* lokus) ukazalo na to da izolat pripada Grupi 1 u kojoj se sada nalazi i serovarijetet *Livingstone*, kao i *Gallinarum* biotip *Gallinarum*. Ako se samo umnožio *bcfC* gen izolat je mogao biti član Grupe 2 koja uključuje i *Gallinarum* biotip *Pullorum*, kao i *S. Infantis*. Na ovaj način dva biotipa serovarijeteta *Gallinarum* su razdvojena u različite grupe: (Tabela 22).

5.2.5 PCR identifikacija *S. Infantis*

Kao što je to navedeno u odeljku 5.2.2.2, *In silico* analiza je pokazala da *S. Infantis* poseduje PCR profil karakterističan za Grupu 2, a to je potvrđeno i pojedinačnim PCR reakcijama. Zbog toga, za identifikaciju *S. Infantis* DNK među izolatima iz Grupe 2, sojevi koji su dali multipleks PCR profil karakterističan za ovu grupu (Tabela 22) umnožavani su u pojedinačnoj PCR reakciji specifičnoj za *S. Infantis* opisanoj u odeljku 5.2.2.3. Štaviše, zbog validacije PCR protokola svih 107 izolata su testirani u ovoj reakciji. Ni jedan od izolata koji su na osnovu rezultata ispitivanja multipleks PCR tehnikom identifikovani kao *S. Enteritidis*, ili su spadali u Grupu 1 nisu pokazali prisustvo segmenta *fljB* gena specifičnog za *S. Infantis* (Tabela 24).

5.2.6 Rezultati identifikacije ispitanih izolata multipleks PCR reakcijom

Među 107 izolata ispitanih multipleks PCR-om njih 31 je u svom PCR profilu dao pozitivnu reakciju na ciljne sekvence *bcfC* i *steB* gena, kao i *sdf* lokusa. Upoređujući dobijene rezultate sa očekivanim PCR profilima definisanim u Tabeli 22 ovi sojevi su identifikovani kao *S. Enteritidis*. U slučaju 20 izolata umnožavale su se samo sekvence dužine karakteristične za *bcfC* i *steB* gene. Po ovom profilu traka oni spadaju u Grupu 1. Dalje, kod 50 ispitanih sojeva umnožen je samo *bcfC* gen. Među očekivanim PCR profilima ovaj scenario odgovara Grupi 1. Preostalih šest izolata je pokazalo neobične multipleks PCR profile, to jest kombinaciju traka koja se nije očekivala niti na osnovu podataka preuzetih iz izvornog rada (257), niti na osnovu naših preliminarnih ispitivanja i *in silico* analiza (Tabela 21). Kod njih su pozitivne bile PCR reakcije na *bcfC* gen i na *sdf* lokus, ali traka karakteristična za *steB* gen nije se pojavila (Tabela 24). Prema tome identifikacija ovih poslednjih izolata nije bila moguća na osnovu rezultata multipleks PCR reakcije.

Osamnaest izolata koji spadaju u manje učestale serovarijetete (*S. Tennessee* (5), *S. Mbandaka* (4) *S. Havana* (2), *S. Lille* (2), *S. Senftenberg*(2), *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Livingstone*) multipleks PCR je svrstao u Grupu 1, kako je to i bilo

predviđeno *in silico* analizom, odnosno na osnovu podataka iz rada Zhu-a i saradnika (257) (Tabela 23).

5.2.7 Rezultati pojedinačne PCR reakcije specifične na identifikaciju *S. Infantis*

U slučaju 39 od 50 izolata predstavnika Grupe 2 dobijen je karakterističan PCR produkt *fljB* gena. Ovi sojevi su imali, nakon izvršene multipleks i pojedinačne PCR reakcije, zbirni PCR profil pozitivan na *bcfC* i *fljB* gene. Prema utvrđenim kriterijumima su (Tabela 21), dakle, identifikovani kao *S. Infantis*. Ostalih 11 izolata je bilo negativno u pojedinačnom PCR-u usmerenim na identifikaciju *S. Infantis*. Ovi sojevi su i nakon ove dodatne reakcije ostali samo sa trakom karakterističnom na *bcfC* gen u svom PCR profilu, prema tome konačno su ostali u Grupi 2.

5.2.8 Poređenje rezultata klasične serotipizacije i PCR reakcija

PCR metodom smo identifikovali dva izolata manje kao *S. Enteritidis* u odnosu na klasičnu serotipizaciju (33). Ta dva izolata prema rezultatima multipleks PCR-a pripadali su Grupi 1 pošto im nedostaje PCR produkt *sdf* lokusa, koji je karakterističan za *S. Enteritidis* (Tabele 23 i 24).

Tabela 23: Sličnosti i razlike u rezultatima klasičnih i molekularnih metoda

| Multipleks PCR i pojedinačni PCR za <i>Infantis</i> | Klasična serotipizacija |
|---|---|
| 31 Enteritidis | 31 Enteritidis |
| 39 Infantis | 39 Infantis |
| 20 Grupa 1 sa Gallinarum biotip Gallinarum | 5 Tennessee, 4 Mbandaka, 2 Havana, 2 Lille, 2 Seftenberg, 1 Agona, 1 Derby, 1 Livingstone, 2 <i>Enteritidis</i> |
| 11 Grupa 2 sa Gallinarum biotip Pullorum | 1 Typhimurium, 3 Montevideo, 7 <i>Infantis</i> |
| 6 neidentifikovanih | 6 <i>Infantis</i> |
| Ukupno 107 | Ukupno 107 |

U slučaju *S. Infantis* rezultati su se razlikovali u većoj meri. Dok klasičnom serotipizacijom 52 izolata je identifikovano kao *S. Infantis*, dobijeni PCR profili su odgovarali ovom serovarijetetu samo u 39 slučajeva. Broj sojeva koji su identifikovani serološki kao *S. Infantis* je bio veći od ukupnog broja sojeva u okviru grupe 2, kojoj po svom multipleks PCR profilu *S. Infantis* pripada (Tabela 23).

Preostalih trinaest izolata klasičnom serotipizacijom identifikovanih kao *S. Infantis* mogu se podeliti na osnovu svojih PCR profila u dve grupe. Sedam njih se svrstao u Grupu 2 zbog nedostatka amplifikacije dela *fljB* gena. Ostalih šest sojeva nije bilo moguće identifikovati na osnovu dobijenog profila traka. Interesantno je, da su svih šest sojeva iz ove grupe pokazali istovetni neočekivani multipleks PCR profil – pozitivni su bili na *bcfC* i *sdf*, negativni na *steB*, a kada su testirani na *fljB* dali su produkt dužine 727 bp (Tabele 23 i 24).

Četiri izolata od 11 iz Grupe 2, koji su bili negativni u *fljB* PCR-u, pokazali su se karakterističnim pripadnicima svoje grupe: njih tri su bili *S. Montevideo*, a četvrti *S. Typhimurium* prema klasičnoj serotipizaciji (Tabela 23).

Tabela 24.: Detaljni uporedni rezultati identifikacije ispitanih izolata *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* metodom klasične serotipizacije i PCR tehnikom.

| Redni broj | Oznaka izolata | Godina izolacije | Poreklo izolata | Antigenska formula | Identifikacija klasičnom aglutinacijom | Multipleks PCR | | | <i>fljB</i> | <i>rhs</i> | Identifikacija PCR tehnikom | Napomena |
|------------|----------------|------------------|--------------------|--------------------|--|----------------|-------------|------------|-------------|------------|-----------------------------|---------------------------|
| | | | | | | <i>bcfC</i> | <i>steB</i> | <i>sdf</i> | | | | |
| 1 | 85 | 2014 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | - | - | - | Grupa 1 | <i>sdf</i> PCR negativan |
| 2 | 93 | 2014 | Feces koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | - | - | - | Grupa 1 | <i>sdf</i> PCR negativan |
| 3 | 2 | 2014 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | - | - | Grupa 2 | <i>fljB</i> PCR negativan |
| 4 | 7 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | - | - | Grupa 2 | <i>fljB</i> PCR negativan |
| 5 | 15 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | - | - | Grupa 2 | <i>fljB</i> PCR negativan |
| 6 | 27 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | - | - | Grupa 2 | <i>fljB</i> PCR negativan |
| 7 | 81 | 2014 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | - | - | Grupa 2 | <i>fljB</i> PCR negativan |
| 8 | 89 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | - | - | Grupa 2 | <i>fljB</i> PCR negativan |
| 9 | 98 | 2015 | Creva pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | - | - | Grupa 2 | <i>fljB</i> PCR negativan |
| 10 | 60 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | + | + | - | Identifikacija nije moguća | Neočekivani profil |
| 11 | 62 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | + | + | - | Identifikacija nije moguća | Neočekivani profil |
| 12 | 70 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | + | + | - | Identifikacija nije moguća | Neočekivani profil |
| 13 | 71 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | + | + | - | Identifikacija nije moguća | Neočekivani profil |
| 14 | 97 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | + | + | - | Identifikacija nije moguća | Neočekivani profil |

| Redni broj | Oznaka izolata | Godina izolacije | Poreklo izolata | Antigenaska formula | Identifikacija klasičnom aglutinacijom | Multipleks PCR | | | f1/B | rhs | Identifikacija PCR tehnikom | Napomena |
|------------|----------------|------------------|------------------------------------|---------------------|--|----------------|-------|-----|------|-----|-----------------------------|--|
| | | | | | | bc/c | st/eB | sdf | | | | |
| 15 | 116 | 2015 | Unutrašnji organi pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | + | + | - | Identifikacija nije moguća | Neočekivani profil |
| 16 | 84 | 2014 | Feces koka nosilja | 6,7 : d : l,w | Livingstone | + | + | - | - | + | Može biti Livingstone | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 17 | 24 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 18 | 25 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 19 | 26 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 20 | 28 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 21 | 29 | 2015 | Feces koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 22 | 32 | 2015 | Parenhimatozni organi koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 23 | 36 | 2015 | Feces koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 24 | 52 | 2015 | Feces koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 25 | 53 | 2015 | Uginuli embrioni pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 26 | 54 | 2015 | Parenhimatozni organi pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 27 | 55 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 28 | 57 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 29 | 58 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 30 | 64 | 2015 | Feces koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 31 | 65 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 32 | 66 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |

| Redni broj | Oznaka izolata | Godina izolacije | Poreklo izolata | Antigena formula | Identifikacija klasičnom aglutinacijom | Multipleks PCR | | | f _H B | r _{HS} | Identifikacija PCR tehnikom | Napomena |
|------------|----------------|------------------|------------------------------------|------------------|--|----------------|------|-----|------------------|-----------------|-----------------------------|----------|
| | | | | | | bcfC | stEB | sdf | | | | |
| 33 | 67 | 2015 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 34 | 75 | 2010 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 35 | 88 | 2015 | Parenhimatozni organi pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 36 | 91 | 2013 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 37 | 92 | 2013 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 38 | 99 | 2015 | Parenhimatozni organi koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 39 | 111 | 2015 | Feces koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 40 | 114 | 2015 | Feces koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 41 | 117 | 2015 | Parenhimatozni organi pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 42 | 121 | 2015 | Bris sa trupa svinje | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 43 | 122 | 2015 | Pileće meso | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 44 | 125 | 2015 | Feces guske | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 45 | 126 | 2015 | Feces koka nosilja | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 46 | 135 | 2015 | Izmet | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 47 | 138 | 2016 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Enteritidis | + | + | + | - | - | Enteritidis | |
| 48 | 1 | 2014 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 49 | 3 | 2014 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 50 | 4 | 2014 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 51 | 5 | 2014 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 52 | 8 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 53 | 9 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |

| Redni broj | Oznaka izolata | Godina izolacije | Poreklo izolata | Antigena formula | Identifikacija klasičnom aglutinacijom | Multipleks PCR | | | fljB | rhs | Identifikacija PCR tehnikom | Napomena |
|------------|----------------|------------------|------------------------------|------------------|--|----------------|------|-----|------|-----|-----------------------------|----------|
| | | | | | | bcfC | steB | sdf | | | | |
| 54 | 10 | 2015 | Parenhimatozni organi pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 55 | 11 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 56 | 12 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 57 | 13 | 2015 | Creva pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 58 | 14 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 59 | 16 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 60 | 17 | 2015 | Parenhimatozni organi pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 61 | 23 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 62 | 30 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 63 | 63 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 64 | 69 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 65 | 72 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 66 | 76 | 2013 | Trup živine | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 67 | 79 | 2014 | Feces koka nosilja | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 68 | 80 | 2014 | Parenhimatozni organi pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 69 | 82 | 2014 | Feces ćurića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 70 | 86 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 71 | 87 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 72 | 90 | 2013 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 73 | 94 | 2014 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |

| Redni broj | Oznaka izolata | Godina izolacije | Poreklo izolata | Antigena formula | Identifikacija klasičnom aglutinacijom | Multipleks PCR | | | f1B | rns | Identifikacija PCR tehnikom | Napomena |
|------------|----------------|------------------|------------------------------|------------------|--|----------------|------|-----|-----|-----|-----------------------------|--|
| | | | | | | bcfC | steb | sdf | | | | |
| 74 | 95 | 2014 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 75 | 96 | 2014 | Feces pilića | 9,12 : g,m : - | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 76 | 101 | 2015 | Trup živine | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 77 | 103 | 2015 | Parenhimatozni organi pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 78 | 108 | 2016 | Trup živine | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 79 | 112 | 2015 | Pileće meso | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 80 | 118 | 2015 | Parenhimatozni organi pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 81 | 123 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 82 | 128 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 83 | 136 | 2016 | Trup živine | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 84 | 137 | 2016 | Pileće meso | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 85 | 141 | 2016 | Bris iz objekta | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 86 | 142 | 2016 | Parenhimatozni organi pilića | 6,7 : r : 1,5 | Infantis | + | - | - | + | - | Infantis | |
| 87 | 35 | 2015 | Feces koka nosilja | 4,12 :f,g,s : - | Agona | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje prema originalnoj studiji (257) |
| 88 | 51 | 2013 | Parenhimatozni organi pilića | 6, 7 : g,m,s : - | Montevideo | + | - | - | - | - | Grupa 2 | Slaganje prema originalnoj studiji (257) |
| 89 | 104 | 2015 | Trup živine | 6, 7 : g,m,s : - | Montevideo | + | - | - | - | - | Grupa 2 | Slaganje prema originalnoj studiji (257) |
| 90 | 115 | 2015 | Hrana za životinje | 6, 7 : g,m,s : - | Montevideo | + | - | - | - | - | Grupa 2 | Slaganje prema originalnoj studiji (257) |

| Redni broj | Oznaka izolata | Godina izolacije | Poreklo izolata | Antigena formula | Identifikacija klasičnom aglutinacijom | Multipleks PCR | | | fljB | rhs | Identifikacija PCR tehnikom | Napomena |
|------------|----------------|------------------|------------------------------|---------------------|--|----------------|------|-----|------|-----|-----------------------------|--|
| | | | | | | befC | steB | sdf | | | | |
| 91 | 6 | 2015 | Parenhimatozni organi goluba | 4,5,12 : i : 1,2 | Typhimurium | + | - | - | - | - | Grupa 2 | Slaganje prema originalnoj studiji (257) |
| 92 | 78 | 2013 | Rektalni bris | 4,12 :f,g, :- | Derby | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 93 | 21 | 2015 | Feces koka nosilja | 13,23 :f,g,s :- | Havana | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 94 | 22 | 2015 | Feces koka nosilja | 13,23 :f,g,s :- | Havana | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 95 | 110 | 2015 | Hrana za životinje | 6, 7 : z38 :- | Lille | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 96 | 120 | 2015 | Hrana za životinje | 6, 7 : z38 :- | Lille | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 97 | 31 | 2015 | Feces pilića | 6,7 : z10 : e,n,z15 | Mbandaka | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 98 | 77 | 2013 | Feces pilića | 6,7 : z10 : e,n,z15 | Mbandaka | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 99 | 83 | 2015 | Parenhimatozni organi pilića | 6,7 : z10 : e,n,z15 | Mbandaka | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 100 | 102 | 2015 | Trup zaklane živine | 6,7 : z10 : e,n,z15 | Mbandaka | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 101 | 20 | 2015 | Feces pilića | 1,3,19 : g,s,t :- | Senftenberg | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 102 | 134 | 2015 | Feces patke | 1,3,19 : gst :- | Senftenberg | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |

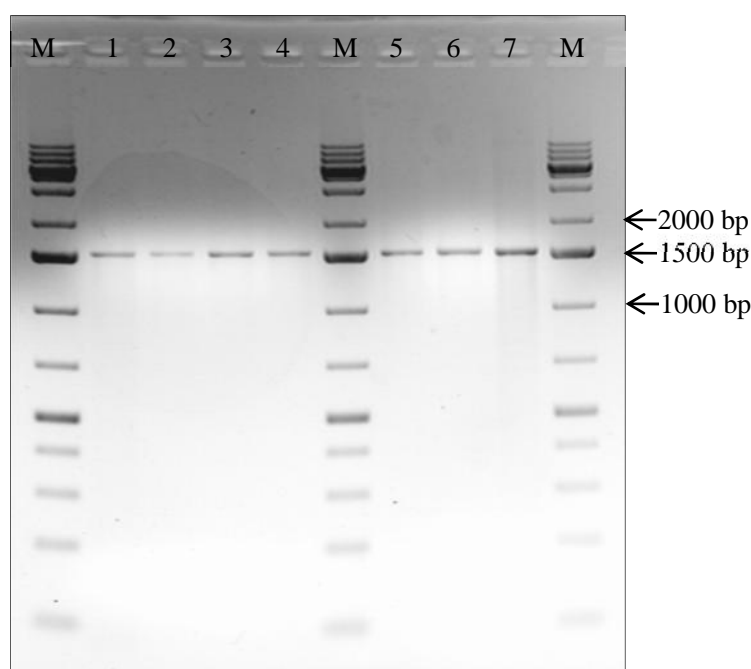
| Redni broj | Oznaka izolata | Godina izolacije | Poreklo izolata | Antigenška formula | Identifikacija klasičnom aglutinacijom | Multipleks PCR | | | fljB | rhs | Identifikacija PCR tehnikom | Napomena |
|------------|----------------|------------------|--------------------|--------------------|--|----------------|------|-----|------|-----|-----------------------------|--|
| | | | | | | bcfC | steB | sdf | | | | |
| 103 | 105 | 2015 | Hrana za životinje | 6, 7 : z29 : - | Tennessee | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 104 | 106 | 2015 | Hrana za životinje | 6, 7 : z29 : - | Tennessee | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 105 | 107 | 2015 | Hrana za životinje | 6, 7 : z29 : - | Tennessee | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 106 | 119 | 2015 | Hrana za životinje | 6, 7 : z29 : - | Tennessee | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |
| 107 | 132 | 2015 | Feces ćurića | 6, 7 : z29 : - | Tennessee | + | + | - | - | - | Grupa 1 | Slaganje sa <i>in silico</i> predikcijom |

5.3 Rezultati sekvenciranja gena za 16S rRNK

Sekvenciranje gena za 16S rRNK predstavlja najčešće korišćenu metodu za ispitivanje genoma u cilju identifikacije mikroorganizama. U našoj studiji za ovo ispitivanje odabrano je devet izolata salmonela, po jedan od predstavnika serovarijeteta Enteritidis (izolat broj 54), Infantis (izolat broj 30), Typhimurium (izolat broj 6), Senftenberg (izolat broj 20), Havana (izolat broj 21), , Agona (izolat broj 35), , Mbandaka (izolat broj 77), Derby (izolat broj 78) i Livingstone (izolat broj 84) (Tabela 25).

5.3.1 Rezultati umnožavanja dela 16SrRNK gena u PCR reakciji

Umnožavanje dela gena za 16S rRNK je rađeno lančanom reakcijom polimerizacije. Korišćeni su univerzalni bakterijski prajmeri (244). Umnožavanje segmenta DNK karakteristične dužine od oko 1500 bp dokazano je elektroforezom u agaroznom gelu. Kao što to pokazuje Slika 11 ciljna sekvenca je dobijana kod svakog ispitanog soja.



Slika 11: PCR za umnožavanje gena za 16S rRNK PCR.

M - marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (hermo Scientific, SAD); 1 - izolat br. 6; 2 - izolat br. 20; 3 - izolat br. 21; 4 - izolat br. 30; 5 - izolat br. 35; 6 - izolat br. 54; 7 - izolat br. 77.

5.3.2 Identifikacija izolata na osnovu sekvenci gena za 16S rRNK

Dobijene sekvence su korišćene za pretraživanje referentnih baza podataka koji sadrže sekvence identifikovanih mikroorganizama. Pretraživanje po sličnosti je vršeno korišćenjem BLAST algoritma. Rezultati su prikazani u Tabeli 25.

Na osnovu pore enja sekvenci gena za 16S rRNK svi izolati su identifikovani kao pripadnici roda *Salmonella*. Preklapanje sekvenci u svim slučajevima je iznosio punih 100 %. Maksimalna identičnost sekvenci je iznosila 98-99%. Uzevši u obzir raznolikost ispitivanih serovarijeteta i referentnih sekvenci, može se zaključiti da rezolucija ove metode ne zadovoljava potrebe za diferencijaciju salmonela na nivou vrste, podvrste i serovarijeteta.

Tabela 25 : Rezultati pretrage NCBI baze podataka u odnosu na sekvence umnoženog dela gena za 16S RNK odabranih izolata.

| Izolat | Preklapanje | Identičnost | Sekvence iz NCBI baze podataka sa njihovim pristupnim brojevima Navedena su tri najbolja rezultata pretraživanja sa liste dobijenih pogodaka |
|---|--------------------|--------------------|---|
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis (izolat br. 54) | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium soj LT2 (NR_104709) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi soj Ty2 (NR_074799) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i> soj DSM 9220 (NR_044372) |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis (izolat br. 30) | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi soj Ty2 (NR_074799) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium soj LT2 (NR_104709) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella bongori</i> NCTC 12419 (NR_074888) |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium (izolat br. 6) | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium soj LT2 (NR_104709) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi soj Ty2 (NR_074799) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i> soj DSM 9220 (NR_044372) |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Senftenberg (izolat br. 20) | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium soj LT2 (NR_104709) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi soj Ty2 (NR_074799) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> soj DSM 1487 (NR_044373) |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Havana (izolat br. 21) | 100% | 98% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 700720 (NR_074910) |
| | 100% | 98% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi soj Ty2 (NR_074799) |
| | 100% | 98% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> soj DSM 9221 (NR_044371) |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona (izolat br. 35) | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium soj LT2 (NR_104709) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi soj Ty2 (NR_074799) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i> soj DSM 9220 (NR_044372) |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Mbandaka (izolat br. 77) | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium soj LT2 (NR_104709) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 700720 (NR_074910) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> soj DSM 9221 (NR_044371) |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Derby (izolat br. 78) | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium soj LT2 (NR_104709) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi soj Ty2 (NR_074799) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> soj DSM 1487 (NR_044373) |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Livingstone (izolat br. 84) | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 700720 (NR_074910) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium soj LT2 (NR_104709) |
| | 100% | 99% | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i> soj DSM 9220 (NR_044372) |

6 DISKUSIJA

Samo precizna identifikacija serovarijeteta salmonele može biti osnova za adekvatan uvid u njihovu regionalnu rasprostranjenost. Nijedan program za kontrolu širenja i suzbijanja salmonela na teritoriji države, ne može biti realno i adekvatno planiran, a posebno ne sproveden, ukoliko nedostaju egzaktni podaci o prevalenciji različitih serovarijeteta, jer su i mehanizmi širenja i opstanka salmonela u organizmu životinja i životnom okruženju, u velikoj meri svojstvo povezano za serovarijetet. Precizna serotipizacija salmonela, koje su uprkos svim nastojanjima i dalje vodeći hranom prenosivi patogeni, polazna je osnova za svaki dalji napor u iznalaženju mera kontrole i profilakse salmoneloza.

Kao što je pomenuto za potrebe ove teze ispitani izolati salmonela koji su sakupljeni tokom rutinskog rada laboratorije VSI „Subotica“ iz redovno pristiglih uzoraka tokom perioda od tri godine, samim tim predstavljaju autohtone izolate. Sa druge strane zastupljenost određenih serotipova među njima daje uvid i o njihovo prisustvo na epizootiološkom području instituta, što dalje može da posluži kao jedna polaznih osnova za formiranje slike na nivou cele zemlje.

Broj opisanih serovarijeteta danas već prelazi 2600. Da bi jedna laboratorija bila u mogućnosti za njihovu samostalnu klasičnu serotipizaciju potrebno je da ima preko 250 antiseruma za tipizaciju, zatim da održava mnoštvo referentnih izolata koji bi obezbedili tih više od 350 antigena koji su potrebni za proizvodnju, purifikaciju i kontrolu kvaliteta tih antiseruma. Nažalost ovo opterećenje čak ni sve nacionalne referentne laboratorije ne mogu da podnesu. Samim tim, poznavanje učestalosti pojedinih serovarijeteta salmonela na određenom području u datom vremenu je takođe od značaja za pravilno planiranja zaliha dijagnostikuma za njihovu identifikaciju. Uzevši u obzir ove podatke i manje laboratorije mogu da se koncentrišu samo na najučestalije serovarijetete, samim tim u većini slučajeva mogu da izvrše potpunu identifikaciju svojih izolata salmonele.

Klasična serotipizacija predstavlja prilično dugotrajan proces, koji kod

retkih serovarijeteta može trajati i dve nedelje, odnosno ako u laboratoriji nisu dostupni svi u datom slučaju potrebni antiserumi i duže. Drugi problem predstavlja, da ista antigenska formula nekih serovarijeteta povezana je sa različitim genomima (polifiletički serovarijeteti: *S. Newport*, *S. Choleraesuis*). Pored toga u nekim slučajevima genetska osnova antigenske determinante je prisutna u genomu izolata, ali se ne eksprimira, onemogućavajući klasičnu serotipizaciju (na primer R forme bakterija).

Ipak za zadržavanje podele izolata salmonela unutar podvrste prema šemi White-Kauffmann-Le Minor postoje argumenti. Tokom višedecenijske primene ova klasifikacija je dokazala svoju robustnost, i ogromna količina podataka se nakupila u ovom sistemu. Zbog toga nazivi serotipova su i dalje deo jezika za komunikaciju među zainteresovanim stranama. Najbitnije, svakako, od ovih argumenata je činjenica da većina serovarijeteta predstavlja opravdanu biološku grupu: samo pominjanje ovih serovarijeteta budi konkretne asocijacije u vezi vrste domaćina i karakteristika uzrokovane bolesti

Poslednjih 25-30 godina intenzivno se ispituju mogućnosti upotrebe raznih molekularno-bioloških metoda za tipizaciju sojeva salmonele (PFGE, MLVA - VNTR, MLST, DNK mikro-čipovi itd.) (11, 13, 18, 128, 168, 210, 228). Pošto rezoluciona moć ovih tehnika prevazilazi nivo koji dostižemo klasičnom serotipizacijom, one se pre svega koriste za potrebe epizootioloških pretraga kao sredstvo za sekundarnu tipizaciju sojeva unutar određenog serovarijeteta. Samim tim za pravilno tumačenje rezultata dobijenih ovim metodama je svakako potrebno znati serovarijetet ispitanog izolata. Njihovi troškovi, zahtevnost u izvođenju i tumačenju rezultata ih pravi nepodobnom za rutinsku upotrebu u laboratorijama sa skromnijim resursima. Shodno tome, dostupne su pre svega samo u referentnim laboratorijama.

Da bi se iskoristile prednosti White-Kauffmann-Le Minor šeme kao pogodnog načina grupisanja izolata salmonela sa jedne strane i brzina molekularnih metoda sa druge strane, naučnici su se okrenuli ka istraživanju mogućnosti nalaženja načina imitacije rezultata klasične serotipizacije. U tom smislu istraženi su genomi sojeva salmonela u cilju nalaženja delova sa

sekvencom nukleotida visoko specifičnom za pojedine serovarijetete. Za ovu svrhu se pokazao najpraktičnijim specifično umnožavanje specifičnih delova genoma primenom PCR tehnologije. Objavljeno je niz pojedinačnih i multipleks PCR protokola za tipizaciju različitih kombinacija serovarijeteta salmonele (27, 31, 100, 130, 139, 141, 143, 146). Opremanje laboratorije za izvođenje PCR reakcija je mnogo lakše i jeftinije izvodljivo nego je to slučaj kod ranije pomenutih molekularno-bioloških metoda. Ova tehnika je i brža od njih, a njeno izvođenje je manje zahtevno.

Svakako procenjivanje performansi PCR protokola je jedino moguće ispitivanjem izolata tipizovanih klasičnom metodom, koja do sada predstavlja standardnu metodu za ovu svrhu.

Predmet ove teze je shodno tome predstavljalo 107 autohtonih izolata salmonele prikupljenih na opisan način. Klasičnom serotipizacijom je određen njihov serovarijetet. Obezbeđeni izolati salmonele odražavaju trend zastupljenosti serovarijeteta na datom području i okviru vremenskog perioda tokom koga su sakupljani: Najzastupljeniji serovarijeteti među njima su bili *Infantis* (52) i *Enteritidis* (33). Preostalih 22 izolata su obuhvatili različite serovarijetete: *Tennessee* (5), *Mbandaka* (4), *Montevideo* (3), *Senftenberg* (2), *Havana* (2), *Lille* (2), kao i po jedan soj serovarijeteta *Typhimurium*, *Agona*, *Derby* i *Livingstone*.

Pravilnik o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje infekcija živine određenim serovarijetetima salmonela (182), koji svrsta serovarijetete u dve kategorije. Prva kategorija obuhvata *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* – u slučaju izolacije ova dva serovarijeteta se primenjuju najstrožije mere u jatima živine. Članovi druge kategorije su *S. Infantis*, *S. Wirchov* i *S. Hadar*. Uzevši u obzir najzastupljene serovarijetete među izolatima sakupljenih za potrebe ovog rada, možemo zaključiti da iz aspekta laboratorijske dijagnostike identifikacija *S. Enteritidis* je najznačajnija. Nakon toga određenje *S. Infantis*, kao najzastupljenijeg serovarijeteta je takođe od značaja. *S. Typhimurium* kao serovarijetet prve kategorije po Pravilniku (182), značajan je, mada njegova zastupljenost među

izolatima je mala. Od značaja su kao članovi druge kategorija Pravilnika (182) još S. Wirchov i S. Hadar, njihovih predstavnika, međutim nije bilo među ispitanim izolatima.

Pri definisanju korišćene metode kombinovali smo publikovane prajmere u cilju sastavljanja odgovarajućeg multipleks PCR protokola, koji bi omogućio brzu i tačnu identifikaciju većine najčešće izolovanih *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarijeteta prisutnih među sakupljenim izolatima.

Pri odabiru objavljenog multipleks PCR protokola vodili smo se zaključcima koji su izvedeni nakon pregleda literature iz ove oblasti. Naime, veličina baze podataka sekvenciranih genoma salmonela ima direktan uticaj na specifičnost dizajniranih prajmera (212). To znači da što veći broj sekvenci genoma različitih serovarijeteta salmonela uzeta u obzir, verovatnija je veća specifičnost dizajniranih prajmera. Takođe opisan je slučaj kombinovanja različitih objavljenih protokola u cilju poboljšanja performanse metode (130, 177).

Prema tome, istražen je način za molekularnu tipizaciju upotrebom seta od šest parova prajmera za umnožavanje sekvenci *bcfC*, *heli*, *steB*, *rhs*, *sdf*, *gly* koji su dizajnirali Zhu i saradnici (257). Sastav ovih oligonukleotida je određen poređenjem svih u tom trenutku dostupnih celih genomskih sekvenci (njih više od 3000) 108 različitih *Salmonella enterica* serovarijeteta. Autori su imali za cilj identifikaciju i razlikovanje dva biotipa *S. Gallinarum* koji spadaju u vrsta specifične salmoneli i značajni su patogeni živine. Dalje ispitivanja su bila usmerena i na određivanje najčešćih serovarijeteta koji izazivaju većinom asimptomatsku infekciju kod živine u SAD. Prema tome multipleks PCR protokol je u originalnom radu omogućio identifikaciju *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Kentucky* kao i dva biotipa *S. Gallinarum* - *Gallinarum* i *Pullorum*. Pored toga, preostalih 104 serovarijeteta je podeljeno u dve grupe prema svojim PCR profilima. Autori su ove klastere označili kao Grupa 1 i Grupa 2.

Od serovarijeteta koji su bili prisutni među našim izolatima identifikacija *S. Enteritidis* je bilo obezbeđeno sa osnovnom postavkom originalnog

protokola, dok *S. Hadar* i *S. Agona* su spadali u Grupu 1, a *S. Typhimurium* i *S. Montevideo* se svrstao u Grupu 2.

Od serovarijeteta koji su bili prisutni među našim izolatima identifikacija *S. Enteritidis* je bilo obezbeđeno sa osnovnom postavkom originalnog protokola, dok *S. Hadar* i *S. Agona* su spadali u Grupu 1, a *S. Typhimurium* i *S. Montevideo* se svrstao u Grupu 2.

Očekivani PCR profili serovarijeteta koji nisu uzeti u obzir pri radu Zhu i saradnika (257) a bili prisutni među izolatima ispitanim u ovom radu određeni *in silico* analizom sekvenci njihovih genoma dostupnih u bazi podataka. Među ovim izolatima je bio i *S. Infantis*. Analiza njegovog genoma pokazala da korišćenjem izabranih šest parova prajmera ovaj serovarijetet se svrsta u Grupu 2. Prema *in silico* analizama genoma ostalih serovarijeteta iz naše kolekcije Grupa 1 obuhvata i serovarijetete Senftenberg, Havana, Mbandaka, Derby, Tennessee, Lille. Za *S. Livingstone* je predviđen *in silico* PCR profil koji nije opisan u originalnom radu (257) a sadrži reakciju na rhs lokus, sekvencu koju su Zhu i saradnici smatrali specifičnom za *S. Gallinarum*.

Mada među ispitanim izolatima nismo imali serovarijetet *S. Virchow*, njegov očekivan PCR profil je takođe određen *in silico* analizom. Ovo smo smatrali potrebnim iz razloga što ovaj serovarijetet antigenski je veoma sličan *S. Infantis*. Zatim *S. Infantis* i *S. Virchow* zajedno sa *S. Hadar* su navedeni u zakonskoj regulativi kako u našoj zemlji tako i u Evropskoj Uniji (182, 39) kao serovarijetet salmonele kategorije dva. Ova tri serotipova su na taj način jasno odvojene po njihovom značaju od ostalih serovarijeteta kao uzročnici alimentarnih infekcija ljudi. Od njih su rigoroznije tretirani samo serovarijeteti *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* koji su svrstani u kategoriju jedan.

In silico analizom sekvence genoma *S. Virchow* dobijen je podatak da sa prajmerima primenjenim u našem radu on se svrsta u Grupu 1. Samim tim odabrani PCR protokol jasno razlikuje ovaj serovarijetet od *S. Infantis* koji spada u Grupu 2. Bitno je pomenuti, dalje, da *S. Hadar* su ispitali Zhu i saradnici (257) u svojoj studiji i svrstali ga u Grupu 1 (Tabela 20).

Zbog značaja *S. Infantis* odlučili smo se za njegovo izdvajanje iz Grupe 2.

Za ovu svrhu smo izabrali prajmere dizajnirane od strane Kardosa i saradnika (124). Pri izboru para prajmera za identifikaciju uzeto je u obzir više razloga. Prajmeri u ovom radu umnožavaju skoro celokupan varijabilni deo *fljB* flagelarnog gena ovog serovarijeteta. Pri njihovom dizajniranju uzeti su u obzir genomske sekvence autohtonih izolata *S. Infantis* iz Mađarske. Ova činjenica je posebno bitna imajući u vidu podatak da farma brojlerskih pilića, sa koje potiče značajan broj izolata *S. Infantis* među našim sojevima, u posmatranom vremenskom periodu je redovno vršila uvoz jednodnevnih pilića iz Mađarske. Takođe je bitno pomenuti da pri razvoju metode uzeti u obzir sekvence genoma serovarijeteta kao što je na primer *S. Virchow* čija je antigenska struktura veoma slična kao kod *S. Infantis*. Pored toga ovi prajmeri su već uspešno korišćeni u raznim državama sveta (38, 79, 164).

Tokom preliminarnih ispitivanja upotreba svakog para prajmera je posebno ispitan u pojedinačnim PCR reakcijama. Korišćene referentne kulture bakterija su dale u svakom ispitivanju očekivane profile traka. Obzirom na to, da među izolatima sakupljenih za potrebe ovog istraživanja serovarijeteti *S. Heidelberg* i *S. Kentucky* nisu bili prisutni, analiza otvorenih okvira čitanja karakterističnih samo za njih (*heli*, odnosno *gly*) je izvršeno kod svih ispitanih izolata u okviru ove preliminarne faze. Ovi testovi dali negativan rezultat, prema tome dva para prajmera usmerenih za ove sekvence su isključena iz daljih ispitivanja multipleks tehnikom. Prajmere za detekciju *rhs* lokusa, karakterističnog za biotipove *S. Gallinarum* smo zadržali zbog značaja ovih bakterija u živinarstvu, zbog njihove antigenske srodnosti sa *S. Enteritidis*. U ovoj odluci smo uzeli u obzir i činjenicu da a *in silico* analiza genoma serovarijeteta Livingstone pokazala da i kod njega se umnožava ovaj lokus. Funkcionisanje prajmera je naravno i u ovom slučaju potvrđeno ispitivanjem genoma referentnog soja *S. Gallinarum* biotip *Pullorum*.

Kombinacijom parova prajmera opisanih u pomenute dve reference (124,257) Odabrali smo set od pet parova prajmera (Tabela 21) koji su usmereni na *bcfC*, *steB*, i *fljB* gene, zatim na *sdf* i *rhs* lokuse.

Višestruki pokušaji, da se multipleks PCR protokol, koji obuhvata svih pet odabranih parova oligonukleotida u jednoj reakciji i koji bi mogao da identifikuje dva najzastupljenija serovarijeteta među ispitanim sojevima, to jest *S. Enteritidis* i *S. Infantis* u jednom koraku, prilagodi uslovima naše laboratorije bili su neuspešni. Razlozi za to mogu biti raznovrsni i mnogostruki. Kako je to opisano u delu Materijali i metode, postupci izvedeni u cilju optimizacije PCR protokola u slučaju ovog rada ograničavali su se na ispitivanje kombinacija različitih koncentracija reagenasa i temperatura hibridizacije. Optimizacija multipleks PCR protokola predstavlja mnogo složeniji proces od uspostavljanja metode sa samo jednim parom prajmera. Usklađenost reakcija zavisi i od upotrebljenih reagenasa, uključujući i polimerazu. Ovaj zahvat često iziskuje i ozbiljnu uporednu analizu sekvenci uključenih parova prajmera, zatim i dobijenih produkata, u cilju izbegavanja nepovoljnog uticaja međusobne reakcije ovih oligonukleotida na odvijanje same amplifikacije, odnosno na mogućnost detekcije svih dobijenih produkata. Dalje, za otklanjanje prepreka tokom optimizacije neretko je potrebna manja ili veća modifikacija korišćenih prajmera (204). Testiranja ovog obima i kompleksnosti su prevazišla okvire i mogućnosti naših ispitivanja.

Svakako, optimizacija multipleks PCR sa tri para prajmera je urodila plodom (simultana detekcija *bcfC*, *steB* i *sdf*). Ova metoda je nedvosmisleno identifikovala *S. Enteritidis* sa pozitivnom reakcijom na prisustvo sva tri ispitana segmenta DNK (Tabela 24, redni brojevi 17-47). Na osnovu profila traka dobijenih ovim multipleks PCR protokolom ostali ispitanici *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovarijeteti su svrstani u dve grupe slično Grupi 1 (pozitivan *bcfC* i *steB*) i Grupi 2 (pozitivan samo *bcfC*) opisanim u izvornom radu Zhu i saradnika(257) (Tabela 22). Kako pomenuta izvorna studija nije uzela u obzir genom serovarijeteta *Infantis* pri dizajniranju navedenih prajmera, očekivano ponašanje ovog serovarijeteta u korišćenom tripleks protokolu je određeno *in silico* istraživanjem. Realno ispitivanje referentnog soja *S. Infantis* i predmetnih izolata potvrdilo je predviđenu kombinaciju amplifikata (Slika 9; Tabela 24, redni brojevi 3-9 i 48-86), tako da se *S. Infantis* svrstala u Grupi 2 primenom ove metode. Shodno tome pojedinačna PCR reakcija specifično

usmerena na *S. Infantis* je bilo potrebno izvoditi samo u slučaju sojeva pripadnika Grupe 2, da bi se ovaj serovarijetet identifikovao.

Pri upoređivanju rezultata dobijenih klasičnom serotipizacijom i upotrebljenom molekularno-biološkom metodom identifikacija ispitanih izolata je bila usaglašena na nivou serovarijeteta u ukupno 91 slučaju (85%).

U slučaju izolata *S. Enteritidis* molekularna tipizacija se slagala sa klasičnom u 31 slučaj od ukupno 33 (poklapanje rezultata kod 94% izolata). Ovi rezultati pokazuju visok nivo korelacije između rezultata klasične i molekularne metode.

Kod *S. Infantis* očekivan PCR profil je dobijen kod 39 izolata od 52 ispitana soja (poklapanje rezultata u 75% slučajeva). U ovom slučaju je razlika znatno veća nego kod prethodnog serovarijeteta.

Ostali ispitani serovarijeteti su proizveli očekivane PCR profile u svim slučajevima: Senftenberg, Havana, Mbandaka, Derby, Tennessee, Lille i Agona izolati su svrstani u Grupnu 1, dok sojevi Typhimurium i Montevideo u Grupnu 2 (Tabela 23).

Odstupanja kod preostalih 16 (15%) sojeva mogu se svrstati prema svojim karakteristikama u četiri grupe:

1. Kod dva izolata serovarijeteta *Enteritidis* nije dobijen amplifikat veličine 293 bp, dokaz prisustva *sdf* lokusa, što ove sojeve svrstava u Grupnu 1 prema utvrđenim kriterijumima (Tabela 24, redni brojevi 1 i 2)
2. Šest izolata serotipizovanih kao *S. Infantis* pokazali su specifičan produkt za *sdf* lokus, koji se smatra karakterističnim za serovarijetet *Enteritidis* (Tabela 24, redni brojevi 10-15). Samim tim, dobijeni profil traka nije moguće tumačiti prema očekivanim PCR profilima navedenim u Tabeli 21
3. Dodatnih sedam izolata klasičnom serotipizacijom identifikovanih kao *S. Infantis* nisu dali specifičan produkt za *fljB* gen. Shodno tome ovi izolati se nisu izdvojili iz Grupe 2 ni nakon izvođenja PCR reakcije specifične za *S. Infantis* (Tabela 24, redni brojevi 1-7).

4. Profil traka koji je nastao ispitivanjem izolata serovarijeteta Livingstone odgovara kombinaciji koju su Zhu i saradnici (257) našli specifičnim za *S. Gallinarum* biotip *Gallinarum* (Tabela 24, redni broj 16).

Lokus *sdf* kao visoko karakterističan deo genoma *S. Enteritidis* su objavili Agron i saradnici 2001. godine (4). Specifično prisustvo ovog lokusa u genomu ovog serovarijeteta potvrđeno je u više nezavisnih istraživanja koji su uključili i njemu veoma srodne serovarijetete, kao što su na primer *S. Gallinarum* i *S. Dublin* (Thompson i sar., 2008;) (227, 180). Analizom sekvence lokusa je utvrđeno, da ovaj segment predstavlja deo defektnog profagnog elementa SE14 bez strukturnih gena karakterističnih za bakteriofage, ali koji nosi pseudogene koji nisu funkcionalni, ali njihovi pretpostavljeni produkti pokazuju poklapanje sa delovima integraza bakteriofaga (205).

Postoje podaci, međutim da SE14 predstavlja nestabilni genetski element, koji je podložan spontanom isecanju iz genoma pod uobičajenim uslovima gajenja bakterija. Isecanje nastaje posredstvom rekombinacije direktnih ponavljajućih sekvenci označenih sa *attL* i *attR* koji inače ograničavaju ovaj segment dok se nalazi u okviru genoma *S. Enteritidis*. Značajno je spomenuti da ekscizija ovog genetskog ostrvca veoma često dovodi do formiranja cirkularnih ekstrahromosomskih fragmenata koji sadrže SE14 (205).

Mada je dokazano da ovaj segment ne nosi gene koji su neophodni za kratkoročnu sistemsku kolonizaciju unutrašnjih organa kod miševa kada se inficiraju intraperitonealnim putem, njihova uloga u preživljavanju u drugim nišama ne može da se isključi (205). Na to ukazuje činjenica da lokacija i struktura ovog segmenta su visoko konzervirane u okviru genoma *S. Enteritidis*. Ispitivanjem preko 100 izolata različitog geografskog porekla izolovanih iz mnoštva izvora dokazano je da je SE14 odsutan u samo nekoliko sojeva (4, 205). Ovo ukazuje na to, da postoji jaka pozitivna selekcija u *in vivo* uslovima u pravcu održavanja ovog genetskog ostrva u populaciji bakterija. U našem slučaju među 33 izolata *S. Enteritidis* našli smo dva kod kojih je izostao umnožavanje *sdf* lokusa, što je u skladu sa navedenim literaturnim podacima. Dalje, zbog njegove nestabilnosti i spontanog isecanja pri uobičajenim

tehnikama kultivacije u in vitro uslovima, ne isključuje se mogućnost gubitka ove sekvence kod izolata tokom njihovog dužeg čuvanja i ponavljanog presejavanja u laboratoriji (4, 205). Kako su predmetna dva soja *S. Enteritidis* izolovana 2014. godine ova mogućnost ni kod njih se ne može isključiti.

Pored navedenih, Deng i saradnici (49) su pri sekvenciranju celih genoma 81 izolata salmonela klasičnom serotipizacijom identifikovanih kao *S. Enteritidis* našli njih 4 kod kojih je nedostajao sdf lokus. Genomi ovih izolata, pored nedostatka ove sekvence, pokazali i značajnu razliku u broju polimorfizama pojedinačnih nukleotida u odnosu na referentni soj. Prema tome, uprkos istim rezultatima serotipizacije, radilo se i o posebnom genotipu koji je udaljen od glavnih filogenetskih linija *S. Enteritidis*(49). Slične razlike među filogenetskim linijama *S. Enteritidis* su dokazali Graham i saradnici i u Australiji (82). Da se eventualno i u našem slučaju kod ova dva izolata radi o posebnim genotipovima može da dokaže jedino sekvenciranje celog genoma ispitanih izolata, i njihovo upoređivanje sa publikovanim sekvencama.

Serotipizacija ova dva izolata *S. Enteritidis* je takođe potvrđena u referentnoj laboratoriji

Najinteresantnije odstupanje klasičnih i molekularnih metoda je ipak ono koje se pojavilo pri identifikaciji šest izolata koji su ispoljili PCR profile koji se nisu pojavili među genomima/serovarijetetima analiziranim od strane Zhu i saradnika (257). Svih šest izolata su dali istu reakciju: bili su pozitivni na *bcfC* (sve *Salmonella spp.*), sdf lokus (specifičan za *S. Enteritidis*), i *fljB* (specifičan za *S. Infantis*) ali negativni na *steB* koji je deo profila *S. Enteritidis*. Nekompletan *S. Enteritidis* PCR profil isključuje mešanu kulturu *S. Enteritidis* i *S. Infantis* kao razlog za tako neobičan PCR profil. Iznenađujuće, na osnovu klasične serotipizacije svih šest izolata su bili u stvari *S. Infantis*, a to je potvrdila i referentna laboratorija. Kao što je gore pomenuto sdf lokus se nalazi na hromosomu *S. Enteritidis* i smatra se serovarijetet specifičnom ciljnom sekvencom za njegovu detekciju i kao takav široko se koristi za identifikaciju ovog važnog serovarijeteta (4). Pretraživanjem literature nismo uspjeli da nađemo informaciju o tome da prisustvo sdf lokusa opisano u genomu

serovarijeteta drugog od *S. Enteritidis*. Ipak kako je to izneto u prethodnom delu postoje dokazi da ovaj lokus predstavlja mobilni genetski element, štaviše opisano je njegovo spontano isecanje iz genoma *S. Enteritidis*. Ove činjenice otvaraju put ka razmišljanju o mogućnosti njegovog eventualnog prenošenja horizontalnim genetskim transferom. U ovom slučaju takođe bi samo sekvenciranje genoma ovih izolata mogao da razjasni pravi uzrok neočekivane reakcije.

Izostanak umnožavanja *fljB* gena kod sedam izolata *S. Infantis* je bio neočekivan, kako postoje literaturni podaci o efikasnosti odabranih prajmera u identifikaciji *S. Infantis* (38,79,124,164,213). Par prajmera koji se koristio za identifikaciju *S. Infantis* dizajniran je na način da umnoži praktično ceo varijabilni region *fljB* gena, koji je odgovoran za ekspimiranje flagelarnog antigena. Rezultati PCR protokola koji su usmereni na gene odgovorne za ekspresiju antigena detektovanih tokom serotipizacije obično direktno su uporedivi sa rezultatima klasične serotipizacije. Ove PCR tehnike omogućavaju identifikaciju serovarijeteta čak i u onim slučajevima kada ekspresija njihovih antigena ometana (izolati salmonela R tipa). To je jedan od ključnih prednosti PCR tehnike u odnosu na aglutinaciju na ploči u tipizaciji salmonela prema White-Kauffmann-Le Minor šeme. Naša ispitivanja su utvrdila da je prisustvo antigena detektovano, dok ciljna sekvenca odgovarajućeg gena nije umnožena. Jedan od mogućnosti je da se pojavila mutacija u delovima DNK za koje se prajmeri vezivaju, samim tim sprečena je hibridizacija i posledična amplifikacija gena, dok promene nisu ometale ekspresiju antigena. Naravno, druga mogućnost je greška klasične metode, mada serotipizacija spornih izolata je potvrđena u referentnoj laboratoriji. Za otkrivanje tačnog razloga za ovo odstupanje potrebno je detaljnije ispitati sekvencu genoma ovih sedam izolata.

Zhu i saradnici (257) su identifikovali *rhs* lokus kao DNK target jedinstven za *S. Gallinarum* (oba biotipova). Međutim, prema našim nalazima ovaj serovarijetet ima isti PCR profil kao *S. Livingstone*. Serovarijetet *Livingstone* se retko izoluje kod ljudi i životinja, mada u poslednje vreme se opisuje kao uzročnik salmoneloze u određenim zemljama (**Error! Reference source not**

found.). Ovaj nalaz iznova naglašava činjenicu da dobijene rezultate treba tumačiti oprezno, u datom kontekstu, i po potrebi identifikaciju treba potvrditi koristeći i druge metode, kao što je u slučaju serovarijeteta *S. Gallinarum*, test pokretljivosti ili klasična serotipizacija da se izbegnu greške koje mogu imati ozbiljne posledice. Ovaj nalaz potvrđuje takođe i značaj veličine i raznolikosti baze podataka koja se koristi pri dizajniranju prajmera za PCR tipizaciju serovarijeteta salmonela.

Na osnovu rezultata dobijenih tokom naše studije može se zaključiti, da multipleks PCR reakcijom sastavljenom nakon preliminarnih ispitivanja u jednoj reakciji može da se identifikuje samo *S. Enteritidis* sa zadovoljavajućom pouzdanošću. Identifikacija *S. Infantis*, najzastupljenijeg serovarijeteta među ispitanim izolatima, može da se izvrši samo sa dodatnom pojedinačnom PCR reakcijom. Međutim kod značajnog broja sojeva (25%) ovog serovarijeteta molekularna tipizacija nije dala jasne rezultate. Identifikacija biotipova *S. Gallinarum* je otežano otkrivanjem činjenice da prisustvo *rhs* lokusa nije ograničeno samo na ovaj serotip. Razvrstavanje serovarijeteta različitih od *S. Enteritidis* u dve grupe i činjenica da *S. Infantis* spada u Grupu 2, gde je svrstano manji broj serovarijeteta, smanjuje rad potreban za njegovu identifikaciju. Svakako za sigurnu identifikaciju serovarijeteta salmonela ne može da se isključi upotreba tehnika klasične mikrobiologije, kao što su biohemijska ispitivanja, test pokretljivosti i serotipizacija.

Eventualnu širu primenu ove ili slične PCR reakcije svakako treba da prethodi razjašnjenje razloga za pojavljivanje neočekivanih PCR profila, pre svega u slučaju *S. Infantis*.

Rezultati ukazuju takođe i na to, da ispitivanje autohtonih izolata salmonela je nezamenljiv korak pri analizi performanse metode na određenom geografskom području pre njenog uvođenja u upotrebu.

Mada sekvenciranje gena za 16S rRNK je među najboljim metodama za razlikovanje bakterija na nivou vrsta, njegova moć rezolucije nije dovoljna za određivanje nižih taksonomskih kategorija ispod tog nivoa. To smo potvrdili i u ovom radu gde se pojedini serovarijeteti salmonela nisu mogli razlikovati ovom

tehnikom. Štaviše, među najslučajnijim sekvencama pri upoređivanju pojavljuje se i ona od *S. Bongori*. Prema tome, u ovom slučaju možemo izjaviti, da je ova metoda pouzdana samo u potvrđivanju pripadnosti ispitanih izolata rodu *Salmonella*. Jedan od razloga za ovakvo ponašanje izolata salmonele može biti u karakteristikama genoma predstavnika ovog roda. Kao što je to opisano, genom pojedinih vrsta, podvrsta, a pre svega serovarijeteta salmonele je u većoj meri konzerviran nego je to slučaj kod drugih bakterijskih vrsta (9). Prema tome za razlikovanje tako niskog taksonomskog nivoa, kao što su serovarijeteti u okviru roda *Salmonella* potrebne su metode za ispitivanje genoma koje su u stanju da razlikuju znatno finija odstupanja nego što je to slučaj sa sekvenciranjem gena za 16S rRNK.

7 ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja u okviru ove disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Od ispitanih 107 izolata Salmonella, klasičnom serotipizacijom je identifikovano njih 52 kao S. Infantis, 33 kao S. Enteritidis, 5 kao S. Tennessee, 4 kao S. Mbandaka, 3 kao S. Montevideo, 2 kao S. Havana, 2 kao S. Lille, 2 kao S. Senftenberg, i po jedan od sledećih serovarijeteta: S. Typhimurium, S. Agona, S. Derby, i S. Livingstone.
2. Na osnovu zastupljenosti serovarijeteta, a korišćenjem prajmera koji su već opisani u literaturi, razvijen je tripleks PCR za identifikaciju S. Enteritidis odnosno za identifikaciju izolata kandidata za simpleks PCR za identifikaciju S. Infantis.
3. Primenom tripleks PCR protokola identifikovan je 31 izolat kao S. Enteritidis dok je klasičnom serotipizacijom 33 izolata identifikovano kao S. Enteritidis, što pokazuje 94% preklapanja između ove dve metode.
4. Dva izolata koja su u klasičnoj serotipizaciji identifikovana kao S. Enteritidis, molekularnom tehnikom nisu identifikovana kao S. Enteritidis zbog odsustva umnožavanja sdf lokusa tipičnog za ovaj serovarijetet. Razlog nepoklapanja rezultata PCR i klasične serotipizacije može biti posledica toga što se marker geni, u ovom slučaju sdf lokus, koji se koriste za identifikaciju serovarijeteta PCR metodom, često nalaze na mobilnim genetskim elementima.
5. Rezultati dvostepene identifikacije S. Infantis PCR metodom, upotrebom literaturno opisanih prajmera koji detektuju varijabilni region fljB gena, značajno su odstupali od rezultata dobijenih klasičnom serotipizacijom. Od ukupno 52 izolata koji su klasičnom serotipizacijom bili identifikovani kao S. Infantis, njih 39 je potvrđeno primenom PCR metode, dok kod 13 izolata PCR profil

nije odgovarao serovarijetetu *S. Infantis*. Poklapanje rezultata ove dve metode prilikom identifikacije *S. Infantis* bilo je 75%.

6. Za identifikaciju *S. Infantis* PCR metodom korišćeni su prajmeri koji umnožavaju deo fljB gena koji kodira flagelin druge faze, a koji je karakterističan za *S. Infantis* i čije se prisustvo detektuje i klasičnom serotipizacijom. Odstupanja u rezultatima identifikacije serovarijeteta *S. Infantis* mogle bi biti posledica promena na nivou gena koje se ne manifestuju na proteinskom nivou, ali onemogućavaju dobijanje PCR produkta pri datim uslovima.
7. Pokazano je da je ciljna sekvenca koja je u literaturi smatrana jedinstvenom za *S. Gallinarum* (oba biotipa) takođe prisutna i kod *S. Livingstone*.
8. Optimizovani protokol za tripleks PCR može olakšati kasniju serotipizaciju *Salmonella* jer se primenom ovog protokola može precizno identifikovati *S. Enteritidis* dok se drugi serovarijeteti vrste *Salmonella* prisutni na teritoriji R. Srbije mogu svrstati u Grupu 1 ili Grupu 2. Ovakvo grupisanje olakšava dalju ciljanu identifikaciju serovarijeteta salmonela.
9. Klasična serotipizacija se još uvek može smatrati zlatnim standardom za preciznu identifikaciju serovarijeteta *Salmonella* vrsta.

8 SPISAK LITERATURE

- 1 Aarts HJ, Van Lith LA, Keijer J. (1998). High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett Appl Microbiol* 26: 131-5.
- 2 Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Kranland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Usebeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S. and the *S. enterica* MLST Study Group (2012) Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens* 8(6): e1002776 doi: 10.1371/journal.ppat.1002776
- 3 Agbaje M., Begum R. H., Oyekunle M. A., Ojo O. E. and . Adenubi O. T (2011) Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol* (2011) 56:497-503. DOI 10.1007/s12223-011-0075-4
- 4 Agron PG, Walker RL, Kinde H, Sawyer SJ, Hayes DC, Wollard J, AndersenGL: Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovars Enteritidis. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67:4984-4991.
- 5 Aldridge PD, Wu C, Gnerer J, et al. (2006). Regulatory protein that inhibits both synthesis and use of the target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11340-5.
- 6 Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990, 215:403-410.
- 7 Andino A., Hanning I., (2015), *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, Volume 2015, Article ID 520179, 16 pageS.
- 8 Andualem G., Abebe T., Kebede N., Gebre-Selassie S., Mihret A., Alemayehu H. (2014) A comparative study of Widal test with blood culture in the diagnosis of typhoid fever in febrile patients. *BMC Research Notes* 7:653
- 9 Anjum, F.M. and Thompson, N.R.(2013) Characterizing *Salmonella* genomes.In: Barrow P.A., Methner U. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. Second edition CAB International, Wallingford, p. 58-79

- 10 Anjum, M.F., Marooney, C., Fookes, M., Baker, S., Dougan, G., Ivens, A. and Woodward, M.J. (2005) Identification of core and variable components of the *Salmonella enterica* subspecies I genome by microarray. *Infection and Immunity* 73, 7894–7905.
- 11 Arnold, C., Metherell, L., Willshaw, G., Maggs, A. and Stanley, J. (1999) Predictive fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli*: high-resolution typing method with phylogenetic significance. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1274.
- 12 Arrach N, Porwollik S, Cheng P, et al. (2008). *Salmonella* serovar identification using PCR-based detection of gene presence and absence. *J Clin Microbiol* 46:2581–9.
- 13 Baggesen, D.L., Wegener, H.C. and Christensen, J.P. (1996) Typing of *Salmonella enterica* serotype Saintpaul: an outbreak investigation. *APMIS* 104, 411–418.
- 14 Bailey JS, Fedorka-Cray PJ, Stern NJ, et al. (2002). Serotyping and ribotyping of *Salmonella* using restriction enzyme PvuII. *J Food Prot* 65:1005–7.
- 15 Baker S., Sarwar Y., Aziz H., Haque, A., Ali, A., Dougan, G., Wain, J. and Haque, A. (2005) Detection of Vi-negative *Salmonella enterica* serovar typhi in the peripheral blood of patients with typhoid fever in the Faisalabad region of Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4418–4425.
- 16 Baker, S., Holt, K., van de Vosse, E., Roumagnac, P., Whitehead, S., King, E., Ewels, P., Keniry, A., Weill, F.X., Lightfoot, D., van Dissel, J.T., Sanderson, K.E., Farrar, J., Achtman, M., Deloukas, P. and Dougan, G. (2008) High-throughput genotyping of *Salmonella enterica* serovar Typhi allowing geographical assignment of haplotypes and pathotypes within an urban District of Jakarta, Indonesia. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1741–1746.

- 17 Balachandran P., Cao Y., Wong L., Furtado M.R., Petrauskene O.V., Tebbs R.S., (2011). Evaluation of Applied Biosystems MicroSEQ® Real-Time PCR system for detection of *Salmonella* spp. in food, *Journal of AOAC*
- 18 Baquar, N., Burnens, A. and Stanley, J. (1994). Comparative evaluation of molecular typing of strains of a national epidemic due to *Salmonella* brandenburg by rRNA gene and IS200 probes and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1876–1880.
- 19 Bell, C.A.K. (2002) *Foodborne Pathogen S.* Wood Head Publishing, CRC Press, Cambridge, UK.
- 20 Ben-Darif E, Jury F, De Pinna E, et al. (2010). Development of a multiplex primer extension assay for rapid detection of *Salmonella* isolates of diverse serotypes. *J Clin Microbiol* 48:1055–60.
- 21 Bonifield HR, Hughes KT. (2003). Flagellar phase variation in *Salmonella* enterica is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J Bacteriol* 185:3567–74.
- 22 Borman, E.K., Stuart, C.A. and Wheeler, K.M. (1944) Taxonomy of the Family Enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology* 48, 351–367.
- 23 Bouchet V, Huot H, Goldstein R. (2008). Molecular genetic basis of ribotyping. *Clin Microbiol Rev* 21:262–73.
- 24 Boyd, E.F., Wang, F.S., Beltran, P., Plock, S.A., Nelson, K. and Selander, R.K. (1993) *Salmonella* reference collection B (SARB): strains of 37 serovars of subspecies I. *Journal of General Microbiology* 139, 1125–1132.
- 25 Brandl, M.T., Rosenthal, B.M., Haxo, A.F. and Berk, S.G. (2005) Enhanced survival of *Salmonella* enterica in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1562–1569.
- 26 Brands, D.A. (2006). *Deadly diseases and epidemics-Salmonella*, 1st edition, Chelsea House Publishers, USA

- 27 Braun SD, Ziegler A, Methner U, et al. (2012). Fast DNA serotyping and antimicrobial resistance gene determination of *Salmonella enterica* with an oligonucleotide microarray-based assay. *PloS one* 7:e46489.
- 28 Broennum Pedersen, T., Elmerdahl Olsen, J. and Bisgaard, M. (2008) Persistence of *Salmonella* Senftenberg in poultry production environments and investigation of its resistance to desiccation. *Avian Pathology* 37, 421–427.
- 29 Burr MD, Josephson KL, Pepper IL. (1998). An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. *Lett Appl Microbiol* 27:24–30.
- 30 Capita R, Alonso Calleja C, Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *J Appl Microbiol* 103:1366–75.
- 31 Cardona-Castro, N., Sánchez-Jiménez, M., Lavalettab, L., Muñozc, N. and Morenoc, J. (2009) Development and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella* serogroups and serotypes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 65, 327–330.
- 32 Carlton L.G., Prescott J.F., Songer G., Thoen C.O.,(editors), (2010). *Pathogenesis of bacterial infection*, fourth edition, Wiley and Blackwell, USA.
- 33 Carrique-Mas, J. and Davies, R.H. (2008) Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: a review. *Revue Scientifique et Technique (Office International des Épizooties)* 27, 665–677
- 34 CDC (2014), *Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report)*. Atlanta, Georgia: U.S.Department of Health and Human Services, CDC.
- 35 Chappell, L., Kaiser, P., Barrow, P., Jones, M.A., Johnston, C. and Wigley, P. (2009) The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128, 53–59.

- 36 Chenu JW, Cox JM, Pavic A. (2012). Classification of *Salmonella enterica* serotypes from Australian poultry using repetitive sequence based PCR. *J Appl Microbiol* 112:185-96.
- 37 Cheraghchi N., Khaki P., Moradi Bidhendi S., Sabokbar A., (2014). Identification of Isolated *Salmonella enterica* Serotype gallinarum Biotype Pullorum and Gallinarum by PCR-RFLP. *Jundishapur J Microbiol* 7:e19
- 38 Chironna M, Tafuri S, Gallone MS, Sallustio A, Martinelli D, Prato R, Germinario C: Outbreak of *Salmonella Infantis* gastroenteritis among people who had eaten at a hash house in southern Italy. *Public Health*
- 39 Commission regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs, Official Journal of European Union, L388, Volume 48, 22, (2005), 1-25.
- 40 Connerton, P., Wain, J., Hien, T.T., Ali, T., Parry, C., Chinh, N.T., Vinh, H., Ho, V.A., Diep, T.S., Day, N.P.J., White, N.J., Dougan, G. and Farrar, J.J. (2000) Epidemic typhoid in Vietnam: molecular typing of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi from four outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 895-897.
- 41 Cooke, F.J., Wain, J., Fookes, M., Ivens, A., Thompson, N., Brown, D.J., Threlfall, E.J., Gunn, G., Foster, G. and Dougan, D. (2007) Prophage sequences defining hot spots of genome variation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can be used to discriminate between field isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2590-2598.
- 42 Crosa, J.F., Brenner, D.J., Ewing, W.H. and Falkow, S.(1973) Molecular relationships among *Salmonellae*. *Journal of Bacteriology* 115, 307-315.
- 43 Daubin, V. and Ochman, H. (2004) Bacterial genomes as new gene homes: the genealogy of ORFans in *E. coli*. *Genome Research* 14, 1036-1042.
- 44 Dauga C, Zabrovskaia A, Grimont PA. (1998). Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol* 36:2835-43.

- 45 Davies, R. and Wales, A. (2010) Investigations into Salmonella contamination in poultry feedmills in the United Kingdom. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1430–1440.
- 46 Davies, R., Mueller-Doblies, D., Martelli, F. and Breslin, M. (2011) Observations on the distribution of monophasic Salmonella Typhimurium on pig farms in Great Britain. *Proceedings of the 9th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical hazards in Pigs and Pork (SafePork 2011)*, Maastricht, the Netherlands, 19–22 June, pp. 110–113.
- 47 Davis, M.A., Baker, K.N., Call, D.R., Warnick, L.D., Soyer, Y., Wiedermann, M., Grohn, Y., Mcdonough, P.L., Hancock, D.D. and Besser, T.E. (2009) Multilocus variable-number tandem-repeat method for typing of Salmonella enterica serovar Newport. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 1934–1938.
- 48 De Cesare A, Manfreda G, Dambaugh TR, et al. (2001). Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium strains isolated in Italy. *J Appl Microbiol* 91:780–5.
- 49 Deng, X., Desai, P. T., den Bakker, H. C., Mikoleit, M., Tolar, B., Trees, E., Hendriksen, R., Frye, J., Porwollik, S., Weimer, B., Wiedmann, M., Weinstock, G., Fields, P. and McClelland, M. (2014). Genomic Epidemiology of Salmonella enterica Serotype Enteritidis based on Population Structure of Prevalent Lineages. *Emerging Infectious Diseases*, 20(9), 1481–1489.
- 50 Dera-Tomaszewska B. (2012). Salmonella serovars isolated for the first time in Poland, 1995–2007. *Int J Occup Med Environ Health* 25: 294–303.
- 51 Didelot, X., Bowden, R., Street, T., Golubchik, T., Spencer, C., McVen, G., Sangal, V., Anjum, M.F., Actman, M., Falush, H.D. and Donnelly, P. (2011) Recombination and population structure in Salmonella enterica. *PLOS Genetics* 7, e1002191.

- 52 Dione, M.M., Geerts, S. and Antonio, M. (2012) Characterisation of novel strains of multiply antibiotic-resistant Salmonella recovered from poultry in Southern Senegal. *Journal of Infection in Developing Countries* 6(5), 436-442.
- 53 DuPont H. L., (2007), The Growing Threat of Foodborne Bacterial Enteropathogens of Animal Origin, *Clin Infect Dis.*, 45 (10): 1353-1361.
- 54 Echeita, M.A., Herrera, S., Garaizar, J. and Usera, M.A. (2002) Multiplex PCR-based detection and identification of the most common Salmonella second-phase flagellar antigens. *Research in Microbiology* 153, 107-113.
- 55 EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014;12(2):3547, 312 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547
- 56 EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015;13(12):4329, 190 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329
- 57 EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2016;14(12):4634, 231 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- 58 EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017;15(12):5077, 228 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>

- 59 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, EFSA Journal; 2010 8(1):1496.
- 60 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; EFSA Journal 2011; 9(3):2090. [378pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2090.
- 61 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; EFSA Journal 2012; 10(3):2597. [442pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2597. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- 62 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; EFSA Journal 2013;11(4):3129, 250 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.
- 63 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 2015;13(1):3991, 165 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991
- 64 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018;16(12):5500, 262 pp.

- 65 Erill, I., Campoy, S. and Barbé, J. (2007) Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 637–656.
- 66 EsteBan E, Snipes K, Hird D, et al. (1993). Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol* 31: 233–7.
- 67 Ethelberg, S., Wingstrand, A., Jensen, T., Sørensen, G., Müller, L., Lisby, M., Nielsen, E.M. and Mølbak, K. (2008) Large outbreaks of *Salmonella* Typhimurium infection in Denmark in 2008. *Euro Surveillance* 13, pii=19023.
- 68 Ewing, W.H. (1972) The nomenclature of *Salmonella*, its usage, and definitions for the three species. *Canadian Journal of Microbiology* 18, 1629–1637.
- 69 Fang, F.C. and Fierer, J. (1991) Human infection with *Salmonella* dublin. *Medicine (Baltimore)* 70, 198–207.
- 70 Fathpour, H., Emtiazi, G. and Ghasemi, E. (2003) Cockroaches as reservoirs and vectors of drug resistant *Salmonella* spp. *Fresenius Environmental Bulletin* 12, 724–727.
- 71 Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D. and Bossi, L. (2001) Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Molecular Microbiology* 39, 260–271.
- 72 Fitzgerald C, Collins M, Van Duyne S, et al. (2007). Multiplex, beadbased suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups. *J Clin Microbiol* 45:3323–34.
- 73 Fitzgerald C, Sherwood R, Gheesling LL, et al. (2003). Molecular analysis of the *rfb* O antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O:6,14 and development of a serogroup-specific PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 69:6099–105.

- 74 Food and Drug Administration (2009). Prevention of Salmonella Enteritidis in Shell Eggs During Production, Storage, and Transportation; Final Rule (July 9, 2009). Federal Food and Drug Administration website, Testing methodology for Salmonella Enteri
- 75 Fookes, M., Schroeder, G.N., Langridge, G.C., Blondel, C.J., Mammina, C., Connor, T.R., Seth-Smith, H., Vernikos, G.S., Robinson, K.S., Sanders, M., Petty, N.K., Kingsley, R.A., Baumler, A.J., Nuccio, S.P., Contreras, I., Santiviago, C.A., Maskell, D., Barrow, P., Humphrey, T., Nastasi, A., Roberts, M., Frankel, G., Parkhill, J., Dougan, G. and Thomson, N.R. (2011) *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the salmonellae. *PLoS Pathogens* 7:e1002191.
- 76 Franklin, K., Lingo, E.J., Yoshida, C., Anjum, M., Bodrossy, L., Clark, C.G., Kropinski, A.M. and Karmali, M.A. (2011) Rapid genoserotyping tool for classification of *Salmonella* serovars. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 2954–2965.
- 77 García, R., Bælum, J., Fredslund, L., Santorum, P. and Jacobsen, C.S. (2010) Influence of temperature and predation on survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression of *invA* in soil and manure-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5025–5031.
- 78 Gaul SB, Wedel S, Erdman MM, et al. (2007). Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved *Xba*I fragments for identification of swine *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol* 45:472–6.
- 79 Ghoddusi A, Nayeri Fasaei B, Karimi V, Ashrafi Tamai I, Moulana Z, Zahraei Salehi T: Molecular identification of *Salmonella* *Infantis* isolated from backyard chickens and detection of their resistance genes by PCR. *Iran J Vet Res* 2015, 16: 293-297
- 80 Gibson, D.L., White, A.P., Snyder, S.D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P. et al. (2006) *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by *AgfD* and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology* 188, 7722–7730.

- 81 Gordon, M.A. (2008) Salmonella infections in immunocompromised adults. *Journal of Infection* 56, 413–422.
- 82 Graham R.M.A., Hiley L., Rathnayake I.U., Jennison A.V. (2018) Comparative genomics identifies distinct lineages of *S. Enteritidis* from Queensland, Australia. *PLOS ONE* 13(1): e0191042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191042>
- 83 Grimont P.A.D., and Weill F.X., (2007), *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*, Ninth Edition, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris, France
- 84 Guard-Petter, J., Henzler, D.J., Rahman, M.M. and Carlson, R.W. (1997) On-farm monitoring of mouseinvasive *Salmonella enterica* serovar enteritidis and a model for its association with the production of contaminated eggs. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1588–1593.
- 85 Guedda I, Taminau B, Ferjani A, Boukadida J, Bertrand S, Daube G: Antimicrobial and molecular analysis of *Salmonella* serovar Livingstone strains isolated from humans in Tunisia and Belgium. *J Infect Dev Ctries* 2014, 8:973-980.
- 86 Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemühl, J., Grimont, P.A. and Weill, F.X. (2010) Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 161, 26–29.
- 87 Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Emmanuel MA, et al. (2009). Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. *BMC Microbiol* 9:97.
- 88 Hansen-Wester, I., C hakravortty, D. and Hensel, M. (2004) Functional transfer of *Salmonella* pathogenicity island 2 to *Salmonella bongori* and *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 72, 2879–2888.

- 89 Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103.
- 90 Hebrard, M., Viala, J.P.M., Meresse, P., Barras, F. and Aussel, L. (2009) Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *Journal of Bacteriology* 191, 4605–4614.
- 91 Hendriksen, R.S., Mikoleit, M., Carlson, V.P., Karlslose, S., Viera, A.R., Jensen, A.B., Seyfarth, A.M., DeLong, S.M., Weill, F.X., Lo Fo Wong, D.M.A., Anguola, F.J., Wegener, H.C. and Aarestrup, F.M. (2009) WHO global Salmonella external quality assurance system (EQAS) for serotyping of *Salmonella* isolates, 2000-2007. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 2729–2736
- 92 Herikstad, H., Motarjemi Y., and Tauxe R.V., (2002), *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping, *Epidemiol. Infect.*,129:1–8.
- 93 Herrera-León S, Ramiro R, Arroyo M, et al. (2007). Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Res Microbiol* 158:122–7.
- 94 Herrera-León, S., McQuiston, J.R., Usera, M.A., Fields, P.I., Garaizar, J. and Echeita, M.A. (2004) Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2581–2588.
- 95 Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F. and Medema, G.J. (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research* 40, 3–22.

- 96 Hirose K, Itoh KI, Nakajima H, et al. (2002). Selective amplification of *tyv* (*rfbE*), *prt* (*rfbS*), *viaB*, and *fliC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *J Clin Microbiol* 40:633-6.
- 97 Holt, K.E., Thomson, N.R., Wain, J., Langridge, G.C., Hasan, R., Bhutta, Z.A., Quail, M.A., Norbertczak, H., Walker, D., Simmonds, M., White, B., Bason, M., Mungall, M., Dougan, G. and Parkhill, J. (2009) Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* 10:36 doi:10.1186/1471-2164-10-36.
- 98 Hong Y, Liu T, Lee MD, et al. (2008). Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC Microbiol* 8:178.
- 99 Hong, Y., Liu, T., Hofacre, C., Maier, M., White, D.G., Ayers, S., Wang, L. and Maurer, J.J. (2003) A restriction fragment length polymorphism-based polymerase chain reaction as an alternative to serotyping for identification of *Salmonella* serotypes. *Avian Diseases* 47, 387-395.
- 100 Huehn S, Malorny B. (2009). DNA microarray for molecular epidemiology of *Salmonella*. *Methods Mol Biol* 551:249-85.
- 101 Huehn, S., La Ragione, R.M., Anjum, M., Saunders, M., Woodward, M.J., Bunge, C., Helmuth, R., Hauser, E., Guerra, B., Beutlich, J., Brisabois, A., Peters, T., Svensson, L., Madajczak, G., Litrup, E., Imre, A., Herrera-Leon, S., Mevius, D., Newell, D.G. and Malorny, B. (2010) Virulence and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathogens and Disease* 7, 523-535.
- 102 Hughes, L.A., Wigley, P., Bennett, M., Chantrey, J. and Williams, N. (2010) Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from wild birds in northern England suggests hostadapted strain. *Letters in Applied Microbiology* 51, 477-479.

- 103 Humphrey, T. (2004) Salmonella, stress responses and food safety. *Nature Reviews Microbiology* 2, 504–509.
- 104 Ibuki, T., Imada, K., Minamino, T., Kato, T., Miyata, T. and Namba, K. (2011) Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. *Nature Structural and Molecular Biology* 18, 277–282.
- 105 Institut za javno zdravlje Srbije, (2009): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2008, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 1452-7553.
- 106 Institut za javno zdravlje Srbije, (2010): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2009, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 2217-3714 (On line).
- 107 Institut za javno zdravlje Srbije, (2011): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2010, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 2217-3714 (On line).
- 108 Institut za javno zdravlje Srbije, (2012): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2011, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 2217-3714 (On line).
- 109 Institut za javno zdravlje Srbije, (2013): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2012, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 2217-3714 (On line).
- 110 Institut za javno zdravlje Srbije, (2014): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2013, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 2217-3714 (On line).
- 111 Institut za javno zdravlje Srbije, (2015): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2014, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 2217-3714 (On line).
- 112 Institut za javno zdravlje Srbije, (2016): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2015, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 2217-3714 (On line).

- 113 Institut za javno zdravlje Srbije, (2017): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2016, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 2217-3714 (On line).
- 114 Institut za javno zdravlje Srbije, (2018): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2017, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, ISSN 2217-3714 (On line).
- 115 ISO 6579-1:2017 (E). Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella -- Part 1: Detection of Salmonella spp. (2017) 4thEd., International Standard, Geneva, Switzerland.
- 116 Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 165(7):526-30.
- 117 Jansen AM, Hall LJ, Clare S, et al. (2011). A Salmonella Typhimurium-Typhi genomic chimera: a model to study Vi polysaccharide capsule function in vivo. *PLoS Pathog* 7:e1002131.
- 118 Jayaraman, R. (2008) Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *Journal of Biosciences* 33, 795–805.
- 119 Jiang XM, Neal B, Santiago F, et al. (1991). Structure and sequence of the rfb (O antigen) gene cluster of Salmonella serovar Typhimurium (strain LT2). *Mol Microbiol* 5:695–713.
- 120 Joerger, R.D. (2003) Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science* 82, 640–647.
- 121 Jones A. M.(2013) Fimbriae and Flagella of Salmonella enterica. In: Barrow P.A., Methner U. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. Second edition CAB International, Wallingford, p. 38-57
- 122 Jones, B.D., Lee, C. A. and Falkow, S.(1992) Invasion by Salmonella typhimurium is affected by the direction of flagellar rotation. *Infection and Immunity* 60, 2475–2480.

- 123 Kafatos, G., Andrews, N., Gillespie, I.A., Adak, G.K., De Pinna, E. and Threlfall, E.J. (2009) Impact of reduced numbers of isolates phage-typed on the detection of Salmonella outbreaks. *Epidemiology and Infection* 137, 821-827.
- 124 Kardos G, Farkas T, Antal M, Nogrady N, Kiss I: Novel PCR assay for identification of Salmonella enterica serovars Infantis. *Lett Appl Microbiol* 2007, 45:421-425.
- 125 Kauffmann, F. (1960) *The Bacteriology of Enterobacteriaceae*. Munksgaard, Copenhagen
- 126 Kauffmann, F. and Edwards, P.R. (1952) Classification and nomenclature of Enterobacteriaceae. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 2, 2-8.
- 127 Késrouanton A, Marault M, Lailier R, et al. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne Salmonella enterica serotype discrimination. *Foodborne Pathog Dis* 4:293-303.
- 128 Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G. and Achtman, M. (2002) Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution* 2, 39-45.
- 129 Kieboom, J., Kusumaningrum, H., Tempelaars, M., Hazeleger, W., Abee, T. and Beumer, R. (2006) Survival, elongation, and elevated tolerance of Salmonella enterica serovar Enteritidis at reduced water activity. *Journal of Food Protection* 69, 2681-2686.
- 130 Kim, S., Frye, J.G., Hu, J., Fedorka-Cray, P.J., Gautam, R. and Boyle, D.S.(2006) Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of Salmonella enterica subsp. enterica. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 3608-3615.
- 131 Klumpp, J. and Fuchs, T.M. (2007) Identification of novel genes in genomic islands that contribute to Salmonella typhimurium replication in macrophages. *Microbiology* 153, 1207-1220.

- 132 Kong, Q., Yang, J., Liu, Q., Alamuri, P., Roland, K.L. and Curtiss, R., 3rd (2011) Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity* 79, 4227–42 39
- 133 Lan, R., Reeves, P.R. and Octavia, S.(2009) Population structure, origin and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 996–1005.
- 134 Langridge, G.C., Wain, J. and Nair, S.(2008) Invasive salmonellosis in humans. Non-typhoidal *Salmonella* serovars cause different degrees of invasive disease globally. *Journal of Infectious Diseases* 199, 602.
- 135 Lapidot, A., Romling, U. and Yaron, S.(2006) Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. *International Journal of Food Microbiology* 109, 229–233
- 136 Lasagabaster, A., Arboleya, J.C. and de Maranon, I.M. (2011) Pulsed light technology for surface decontamination of eggs: impact on *Salmonella* inactivation and egg quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 124–128.
- 137 Le Minor, L., Rohde, R. and Taylor, J. (1970) Nomenclature des *Salmonella*. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* 119, 206–210.
- 138 Lederberg, J. and Iino, T. (1956) Phase variation in *Salmonella*. *Genetics* 41, 743–757.
- 139 Lee SH, Jung BY, Rayamahji N, et al. (2009). A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. *J Vet Sci* 10:43–51.
- 140 Lindsted, B.A., Vardund, T., Aas, L. and Kapperud, G. (2004) Multiple-locus variable number tandem repeats analysis of *Salmonella enterica* subspecies enteria serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 59, 163 –172.

- 141 Liu B, Zhou X, Zhang L, et al. (2012). Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control* 27:87-93.
- 142 Liu WB, Chen J, Huang YY, et al. (2010). Serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility profiles of *Salmonella* from chicken farms in Shanghai. *J Food Prot* 73:562-7.
- 143 Liu, B., Zhang, L., Z hu, X., Shi, C., Chen, J., Jiu, W., He, X. and Shi, X. (2011) PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. *International Journal of Food Microbiology* 144, 511-518.
- 144 Liu, Y., Lee, M.-A., Ooi, E.-E., Mavis, Y., Tan, A.-L. and Quek, H.-H. (2003) Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable number tandem repeats. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4388-4394.
- 145 Loman, N.J., Misra, R., Dallman, T.J., Constantinidou, C., Gharbia, S.E., Wain, J. and Pallen, M.J. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature Biotechnology* 30, 434-439.
- 146 Luk, J.M., Kongmuang, U., Reeves, P.R. and Lindberg, A.A. (1993) Selective amplification of arabinose and galactose synthase genes (*rfa*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2118-2123 .
- 147 Macnab, R.M. (1996) Flagella and motility. In: Niedhardt, F.C. et al. (eds) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn. AMS Press, Washington, DC, pp. 123-145.
- 148 Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th Edition, 2012, OIE. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.08_SALMONELLOSIS.pdf

- 149 McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. and Wilson, R.K. (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413, 852-856.
- 150 McClelland, M., Sanderson, K.E., Clifton, S.W., Latreille, P., Porwollik, S., Sabo, A., Meyer, R., Bieri, T., Ozersky, P., McLellan, M., Harkins, C.R., Wang, C., Nguyen, C., Berghoff, A., Elliott, G., Kohlberg, S., Strong, C., Du, F., Carter, J., Kremizki, C., Layman, D., Leonard, S., Sun, H., Fulton, L., Nash, W., Miner, T., Minx, P., Delehaunty, K., Fronick, C., Magrini, V., Nhan, M., Warren, W., Florea, L., Spieth, J. and Wilson, R.K. (2004) Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nature Genetics* 36, 1268-1274.
- 151 McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D. and Kjelleberg, S. (1998) Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* 25, 1-9.
- 152 McLaren, I.M., Sojka, M.G., Thorns, C.J. and Wray, C. (1992) An interlaboratory trial of a latex agglutination kit for rapid identification of *Salmonella enteritidis*. *Veterinary Record* 131, 235-236
- 153 McQuiston JR, Herrera-Leon S, Wertheim BC, et al. (2008). Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *J Bact*
- 154 McQuiston JR, Parrenas R, Ortiz-Rivera M, Gheesling L, Brenner F, Fields PI (2004). Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J Clin Microbiol* 42:1923-32.

- 155 McQuiston, J.R., Waters, R.J., Dinsmore, B.A., Mikoleit, M.L. and Fields, P. (2011) Molecular determination of H antigens of Salmonella by use of a microsphere-based liquid array. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 565–573.
- 156 Mijatović, G. I. (2016) Molekularna karakterizacija i antimikrobna osetljivost Salmonella enterica podvrste enterica izolovanih od živine sa područja Crne Gore, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu.
- 157 Minamino, T. and Macnab, R.M. (1999) Components of the Salmonella flagellar export apparatus and classification of export substrates. *Journal of Bacteriology* 181, 1388–1394.
- 158 Misselwitz, B., Kreibich, S.K., Rout, S., Stecher, B., Periaswamy, B. and Hardt, W.D. (2011) Salmonella enterica serovar Typhimurium binds to HeLa cells via Fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking. *Infection and Immunity* 79, 330–341.
- 159 Mortimer CK, Peters TM, Gharbia SE, et al. (2004). Towards the development of a DNA-sequence based approach to serotyping of Salmonella enterica. *BMC Microbiol* 4:31.
- 160 Murphy, T.M., McNamara, E., Hill, M., Rooney, N., Barry, J., Egan, J., O'Connell, A., O'Loughlin, J. and McFaddyen, S.(2001) Epidemiological studies on human and animal Salmonella Typhimurium DT104 and DT104b isolates in Ireland. *Epidemiology and Infection* 126, 3–9.
- 161 Nde CW, Sherwood JS, Doetkott C, Logue CM. (2006). Prevalence and molecular profiles of Salmonella collected at a commercial turkey processing plant. *J Food Prot* 69:1794–801.
- 162 Nesse, L.L., Refsum, T., Heir, E., Nordby, K., Vardund, T. and Holstad, G. (2005) Molecular epidemiology of Salmonella spp. isolates from gulls, fishmeal factories, feed factories, animals and humans in Norway based on pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiology and Infection* 133, 53–58.

- 163 Nguyen, Q.C., Everest, P., Tran, T.K., House, D., Murch, S., Parry, C., Connerton, P., Phan, V.B., To, S.D., Mastroeni, P., White, N.J., Tran, T.H., Vo, V.H., Dougan, G., Farrar, J.J. and Wain, J. (2004) A clinical, microbiological, and pathological study of intestinal perforation associated with typhoid fever. *Clinical Infectious Diseases* 39, 61–67
- 164 Nogrady N, Kardos G, Bistyak A, Turcsanyi I, Meszaros J, Galantai Zs, Juhasz A, Samu P, Kaszanyitzky JE, Paszti J, Kiss I: Prevalence and characterization of *Salmonella* *Infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken-h
- 165 Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. and Lino, T. (1992) A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, σ^F . *Molecular Microbiology* 6, 3149–3157.
- 166 Old DC, Rankin SC, Crichton PB. (1999). Assessment of strain relatedness among *Salmonella* serotypes *Salinatis*, *Duisburg*, and *Sandiego* by biotyping, ribotyping, IS200 fingerprinting, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 37:168
- 167 Olive DM, Bean P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661–9.
- 168 Olsen, J.E. and Skov, M.N. (1994) Genomic lineage of *Salmonella dublin*. *Veterinary Microbiology* 40, 271–282.
- 169 Orlić D., Kapetanov M., 2007. *Zarazne bolesti ĩivine*, Naučni Institut za veterinarstvo, Novi Sad
- 170 Oscar TP. (1998). Identification and characterization of *Salmonella* isolates by automated ribotyping. *J Food Prot* 61:519–24.
- 171 Parmar, D. and Davies, R. (2007) Fowl typhoid in a small backyard laying flock. *Veterinary Record* 160, 348.

- 172 Paskeviciute, E., Buchovec, I. and Luksiene, Z. (2011) High-power pulsed light for decontamination of chicken from food pathogens: a study on antimicrobial efficiency and organoleptic properties. *Journal of Food Safety* 31, 61–68.
- 173 Pedulla, M.L., Ford, M.E., Karthikeyan, T., Houtz, J.M., Hendrix, R.W., Hatfull, G.F., Poteete, A.R., Gilcrease, E.B., Winn-Stapley, D.A. and Casjens, S.R. (2003) Corrected sequence of the bacteriophage p22 genome. *Journal of Bacteriology* 185, 1475–1477.
- 174 Peters TM, Threlfall EJ. (2001). Single-enzyme amplified fragment length polymorphism and its applicability for *Salmonella* epidemiology. *Syst Appl Microbiol* 24:400–4.
- 175 Peters, T., Bertrand, S., Björkman, J. T., Brandal, L. T., Brown, D. J., Erdösi, T., Heck, M., Ibrahim, S., Johansson, K., Kornschöber, C., Kotila, S.M., Le Hello, S., Lienemann, T., Mattheus, W., Nielsen, E. M., Ragimbeau, C., Rumore, J., Sabol, A., Torpdahl, M., Trees, E., Tuohy, A., ... de Pinna, E. (2017). Multi-laboratory validation study of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, 2015. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 22(9), 30477.
- 176 Petersen, R.F., Littrup, E., Larsson, J.T., Torpdahl, M., Sorensen, G., Muller, L. and Nielsen, E.M. (2011) Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium highly successful outbreak strains. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 655–661.
- 177 Peterson G, Gerdes B, Berges J, et al. (2010). Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays for identification of serovars and virulence genes in *Salmonella enterica* of human or animal origin. *J Vet Diagn Invest* 22:5

- 178 Pierce S.E. et.al., (2012), Detection and Identification of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Shigella* spp. via PCR-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Isolate Testing and Analysis of Food Samples, Applied and Environmental Microbiology 72:1033-1041
- 179 Porwollik, S., Boyd, E.F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. and McClelland, M. (2004) Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *Journal of Bacteriology* 186, 5883-5898.
- 180 Porwollik, S., C. A. Santiviago, P. Cheng, L. Florea, and M. McClelland. 2005. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. *J. Bacteriol.* 187:6545-655
- 181 Porwollik, S., Wong, R.M. and McClelland, M. (2002) Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99, 8956-8961.
- 182 Pravilnik o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje infekcija živine određenim serotipovima salmonela (Službeni glasnik RS, 36/2018 i 46/2018)
- 183 Prouty, A.M., Brodsky, I.E., Manos, J., Belas, R., Falkow, S. and Gunn, J.S. (2004) Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes by bile. *FEMS Immunology and Microbiology* 41, 177-185.
- 184 Queen, P. J., M. E. Carter, B. K. Markey & G. R. Carter. *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby 1999.
- 185 Queen, P. J., Markey, B. K. , Carter, M. E, Donnelly, W.R and Leonard, F. C. . *Veterinary microbiology and microbial disease*. Blackwell Science 2002.
- 186 Rabie, A., Carrique-Mas, J. and Davies, R. (2010) Persistence of *Salmonella* in rodent populations from infected farms in Great Britain. *Proceedings of the I3S International Symposium 'Salmonella and Salmonellosis', St Malo, France, 28-30 June, pp. 219-222.*

- 187 Rabsch, W., Andrews, H.L., Kingsley, R.A., Prager, R., Tschäpe, H., Adams, L.G. and Bäumler, A.J. (2002) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infection and Immunity* 70, 2249–2255.
- 188 Rabsch, W., Tschäpe, H. and Bäumler, A.J. (2001) Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection/Institut Pasteur* 3, 237–247.
- 189 Raetz, C.R.H. (1996) Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In: Niedhardt, F.C et al. (eds) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn. AMS Press, Washington, DC, pp. 1035–1063.
- 190 Raffatellu, M., Wilson, R.P., Winter, S.E. and Bäumler, A.J. (2008) Clinical pathogenesis of typhoid fever. *Journal of Infection in Developing Countries* 2, 260–266.
- 191 Ranieri ML, Shi C, Moreno Switt AI, et al. (2013). *Salmonella* serovar prediction: comparison of typing methods with a new procedure based on sequence characterization. *J Clin Microbiol* 51: 1786-97.
- 192 Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, et al. (2005). Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. *J Clin Microbiol* 43: 3615–23.
- 193 Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D. and Farmer, J.J. III (1989) Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb.nov. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 313–320.
- 194 Reeves, P.R., Hobbs, M., Miguel, A., Valvano, A.M., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., Kido, N., Klena, K., Maskell, D., Raetz, R.H.C. and Rick P.D. (1996) Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in Microbiology* 4, 495–503.

- 195 Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B. and Barrett, T.J. (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* 3, 59.
- 196 Ridley AM. (1998). Genomic fingerprinting by application of rep-PCR. *Methods Mol Med* 15:103-15.
- 197 Rizzi V, Migliorati G, Acciari V, et al. (2005). Surveillance system and rapid tracing of primary sources in food-borne outbreaks by *Salmonella* spp. Part II: molecular characterisation of some strains of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis
- 198 Rodriguez A, Pangloli P, Richards HA, et al. (2006). Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. *J Food Prot* 69: 2576-80.
- 199 Roth, J.R., Lawrence, J.G. and Bobik, T.A. (1996) Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annual Review of Microbiology* 50, 137-181.
- 200 Roumagnac, P., Weill, F.X., Dolecek, C., Baker, S., Brisse, S., Chinh, N.T., Le, T.A., Acosta, C.J., Farrar, J., Dougan, G. and Achtman, M. (2006) Evolutionary history of *Salmonella* Typhi. *Science*, 1301-1304.
- 201 Rychlik, I. and Barrow, P.A. (2005) *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 1021-1040.
- 202 Rycroft A. N. (2013) Structure, Function and Synthesis of Surface Polysaccharides in *Salmonella*. In: Barrow P.A., Methner U. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. Second edition CAB International, Wallingford, p. 20-37
- 203 Sanderson K E., Nair S.(2013) Taxonomy and species concepts in the genus *salmonella*. In: Barrow P.A., Methner U. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. Second edition CAB International, Wallingford, 1-19.

- 204 SantaLucia J. (2007) Physical Principles and Visual-OMP Software for Optimal PCR Design. In: Yuryev A. (eds) PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology™, vol 402. Humana Press
- 205 Santiviago, C.A., Blondel, C.J., Quezada, C.P., Silva, C.A., Tobar, P.M., Porwollik, S., McClelland, M., Andrews-Polymenis, H., Toro, C.S., Zaldívar, M., & Contreras, I. (2010). Spontaneous excision of the Salmonella enterica serovar Enteritidis-specific defective prophage-like element phiSE14. *Journal of bacteriology*, 192 8, 2246-54.
- 206 Saunders, M.P., Wu, G., Abuoun, M., Pan, Z., Anjum, M. and Woodward, M.J. (2010) Optical genetic mapping defines regions of chromosomal variation in serovars of *S. enterica* subsp. *enterica* of concern for human and animal health. *Epidemiology and Infection* 139, 1065–1074.
- 207 Sbrogio-Almeida, M.E., Mosca, T., Massis, L.M., Abrahamsohn, I.A. and Ferreira, L.C. (2004) Host and bacterial factors affecting induction of immune responses to flagellin expressed by attenuated Salmonella vaccine strains. *Infection and Immunity* 72, 2546–2555.
- 208 Schmidt, H. and Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 14–56.
- 209 Schrader KN, Fernandez-Castro A, Cheung WK, et al. (2008). Evaluation of commercial antisera for Salmonella serotyping. *J Clin Microbiol* 46:685–8.
- 210 Schwarz, S. and Liebisch, B. (1994) Pulsed field gel electrophoretic identification of Salmonella enterica serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H. *Letters in Applied Microbiology* 19, 469–472
- 211 Shangkuan YH, Lin HC. (1998). Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of Salmonella Typhi and other Salmonella species. *J Appl Microbiol* 85:693–702.
- 212 Shi C, Singh P, Ranieri ML, Wiedmann M, Moreno Switt AI. (2013). Molecular methods for serovar determination of Salmonella. *Crit Rev Microbiol*. 41(3):309-25.

- 213 Shimizu R, Osawa K, Shigemura K, Yoshida H, Fujiwara M, Iijima Y, Fujisawa M, Shirakawa T: Development of multiplex PCR for rapid identification of four *Salmonella* serovars most commonly isolated in Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal*
- 214 Shivaprasad, H.L. (2000) Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 19, 405–424.
- 215 Silverman M, Zieg J, Hilmen M, Simon M. (1979). Phase variation in *Salmonella*: genetic analysis of a recombinational switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:391–5.
- 216 Singh A, Goering RV, Simjee S, et al. (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 19: 512–30.
- 217 Skov, M.N., Spencer, A.G., Hald, B., Petersen, L., Nauerby, B., Carstensen, B. et al. (2004) The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilic *Campylobacter* spp. Between broiler flocks. *Avian Diseases* 48, 9–18.
- 218 Smith NH, Selander RK. (1991). Molecular genetic basis for complex flagellar antigen expression in a triphasic serovar of *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:956–60.
- 219 Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M. and Spratt, B.G. (1993) How clonal are bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 90, 4384–4388.
- 220 Smith, N., Beltran, P. and Selander, R.K. (1990) Recombination of *Salmonella* Phase 1 Flagellin Genes Generates New Serovars. *Journal of Bacteriology* 172, 2209–2216.
- 221 Soto SM, Guerra B, González-Hevia MA, Mendoza MC. (1999). Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. *Appl Environ Microbiol* 65:4830–6.

- 222 Sterzenbach, T., Crawford, W.R., Winter E. S. and Bäumler, J.A. (2013) Salmonella virulence mechanisms and their genetic basis. In: Barrow P.A., Methner U. (Eds.), Salmonella in Domestic Animals. Second edition CAB International, Wallingford, p. 80-103
- 223 Subramanian, N. and Qadri, A. (2006) Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic salmonella. Nature Immunology 7, 583-589.
- 224 Sun, Y.H., Rolán, H.G. and Tsolis, R.M. (2007) Injection of flagellin into the host cell cytosol by Salmonella enterica serotype Typhimurium. Journal of Biological Chemistry 282, 33897-33901.
- 225 Szekely, E. and Simon, M. (1983) DNA sequence adjacent to flagellar genes and evolution of flagellar-phase variation. Journal of Bacteriology 155, 74-81.
- 226 Thiennimitr, P., Winter, S. E., Winter, M.G., Xavier, M.N., Tolstikov, V., Huseby, D.L., Sterzenbach, T., Tsolis, R.M., Roth, J.R. and Baumler, A.J. (2011) Intestinal inflammation allows Salmonella to use ethanolamine to compete with the microbiota. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 17480-17485.
- 227 Thomson, N.R., Clayton, D.J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher, C., Quail, M.A., Stevens, M., Jones, M.A., Watson, M., Barron, A., Layton, A., Pickard, D., Kingsley, R.A., Bignell, A., Clark, L., Harris, B., Ormond, D., Abdallah, Z., Brooks, K., Cherevach, I., Chillingworth, T., Woodward, J., Norberczak, H., Lord, A., Arrowsmith, C., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Sanders, M., Whitehead, S., Chabalgoity, J.A., Maskell, D., Humphrey, T., Roberts, M., Barrow, P.A., Dougan, G. and Parkhill, J. (2008) Comparative genome analysis of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. Genome Research 18, 1624-1637

- 228 Thong, K.L., Cheong, Y.M., Puthuchery, S., Koh, C.L. and Pang, T. (1994) Epidemiology analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1135-1141.
- 229 Threlfall, E.J. and Frost, J.A. (1990) The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 5-16.
- 230 Torpdahl, M., Sørensen, G., Lindstedt, B.-A. and Nielsen, E.M. (2007) Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella Typhimurium* infections. *Emerging Infectious Diseases* 13, 388-395.
- 231 Turpin, P.E., Maycroft, K.A., Rowlands, C.L. and Wellington, E.M. (1993a) An ion-exchange based extraction method for the detection of salmonellas in soil. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 181-190.
- 232 Valiente Moro, C., Chauve, C. and Zenner, L. (2007) Experimental infection of *Salmonella Enteritidis* by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology* 146, 329-336.
- 233 Valtonen, V.V., Aird, J., Valtonen, M.V., Makela, O. and Makela, P.H. (1971) Mouse virulence of *Salmonella*: antigen-dependent differences are demonstrable also after immunosuppression. *Acta Pathologica et Microbiologica Immunologica Scandinavica, Section B* 79, 715-718.
- 234 Vanselow, B.A., Hornitzky, M.A., Walker, K.H., Eamens, G.J., Bailey, G.D., Gill, P.A. et al. (2007) *Salmonella* and on-farm risk factors in healthy slaughter-age cattle and sheep in eastern Australia. *Australian Veterinary Journal* 85, 498-502.
- 235 Velhner M., Kozoderović G., Grego E., Galić N., Stojanov I., Jelesić Z., Kehrenberg C. (2014) Clonal spread of *salmonella enterica* serovar infantis in Serbia: Acquisition of mutations in the topoisomerase genes *gyrA* and *parC* leads to increased resistance to fluoroquinolones, *Zoonoses and Public Health*, vol. 61, no. 5, pp. 364-370,.

- 236 Vernikos, G.S., Thomson, N.R. and Parkhill, J. (2007) Genetic flux over time in the Salmonella lineage. *Genome Biology* 8, R100.
- 237 Vestby, L., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E. and Nesse, L. (2009) Biofilm forming abilities of Salmonella are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research* 5, 20.
- 238 Wain, J. , House, D., Zafa, A., Baker, S., Nair, S., Kidgell, C., Bhutta, Z., Dogan, G. and Hassan, R. (2005) Vi antigen expression in Salmonella enterica serovar Typhi clinical isolates from Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1158–1165.
- 239 Wain, J. and Olsen, E.J. (2013) Current and new approaches to typing of Salmonella. In: Barrow P.A., Methner U. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. Second edition CAB International, Wallingford, p. 498-517
- 240 Wales, A. and Davies, H. R. (2013) Environmental Aspects of Salmonella. In: Barrow P.A., Methner U. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. Second edition CAB International, Wallingford, p. 399-425
- 241 Wales, A.D., Carrique-Mas, J.J., Rankin, M., Bell, B., Thind, B.B. and Davies, R.H. (2010) Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to Salmonella in mites, flies and litter beetles. *Zoonoses and Public Health* 57, 299–314.
- 242 Wassenaar TM, Newell DG. (2000). Genotyping of Campylobacter spp. *Appl Environ Microbiol* 66:1–9.
- 243 Wattiau, P., Boland, C. and Bertrand, S.(2011) Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7877–7885.
- 244 Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., (1991), 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703.

- 245 Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G. 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L., Sonnenberg, M.S. and Blattner, F.R. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 17020–17024.
- 246 Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. and Schubert, S. (2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics – identification and beyond. *Applied Microbiological Biotechnology* 93, 965–977.
- 247 William JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531–5.
- 248 Williamson, C., Bairdt, G.D. and Manning, E.J. (1988) A Common Virulence Region on Plasmids from Eleven Serotypes of *Salmonella*. *Journal of General Microbiology* 134, 975–982.
- 249 Wilson, R.P., Raffatellu, M., Chessa, D., Winter, S.E., Tukel, C. and Bäumler, A.J. (2008) The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cellular Microbiology* 10, 876–890.
- 250 Winn Jr. W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G: *Konemanns Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology*, sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2006.
- 251 Wong, K.K., McClelland, M., Stillwell, L.C., Sisk, E.C., Thurston, S.J. and Saffer, J.D. (1998) Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Infection and Immunity* 66, 3365–3371.
- 252 Wray, C. and Davies, R.H. (1998) Environmental problems in poultry production: dust and pests. *Proceedings of the International Symposium on Food-borne Salmonella*, Baltimore, USA, 25–26 July, pp. 93–104.

- 253 Wray, C., and Wray A. (2000) *Salmonella in Domestic Animals* Wallingford, Oxon. UK:CABI
- 254 Yamamoto S, Kutsukake K. (2006). FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 188:958–67.
- 255 Zeng, H., Carlson, A.Q., Guo, Y., Yu, Y., Collier-Hyams, L.S., Madara, J.L., Gewirtz, A.T. and Neish, A.S.(2003) Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *Journal of Immunology* 171, 3668–3674.
- 256 Zhang, S., Kingsley, R.A., Santos, R.L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R.M., Adams, L.G. and Bäumler, A.J. (2003) Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infection and Immunity* 71, 1–12.
- 257 Zhu C, Yue M, Rankin S, Weill F-X, Frey J, Schifferli DM (2015) One-step identification of five prominent chicken *Salmonella* serovars and biotypes. *J Clin Microbiol* 2015, 53: 3881-3883.
- 258 Zou W, Lin WJ, Hise KB, et al. (2012). Prediction system for rapid identification of *Salmonella* serotypes based on pulsed-field gel electrophoresis fingerprints. *J Clin Microbiol* 50: 1524–32.

BIOGRAFIJA

Ferenc Kiškarolj rođen je 5. septembra 1972. godine u Bačkoj Topoli gde je završio osnovnu i srednju školu.

Osnovne studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je 1992. godine, a diplomirao u junu 1998. Godine kao student generacije sa prosečnom ocenom 9,23 (devet i 23/100)

Nakon završetka osnovnih studija zaposlio se u Veterinarskom specijalističkom institutu „Subotica“, u laboratoriji za kliničku mikrobiologiju, gde radi i danas. Specijalizaciju iz mikrobiologije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu završio je 2005. godine odbranom specijalističkog rada “Izolacija i identifikacija Salmonella vrsta poreklom od živine i njihova osetljivost na antibiotike i hemioterapeutike”.

U laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta vrši dužnosti tehničkog rukovodioca laboratorije. Pored toga obavlja poslove iz oblasti svoje specijalizacije u radnoj jedinici laboratorije za bakteriološka, parazitološka i imunološka ispitivanja biološkog materijala poreklom od životinja.

Učestvovao u pripremi VSI „Subotica“ za sertifikaciju po standardu ISO 9001 koja je usledila januara 2005. godine. Paralelno sa ovim poslovima su vršene i pripreme za akreditaciju laboratorije po standardu ISO/IEC 17025 kojima je takođe značajno doprineo svojim radom. Laboratorija je akreditovana krajem 2006, a od tog vremena dva puta reakreditovana.

Tokom svog rada stekao veliko iskustvo u izvođenju metoda klasične bakteriološke izolacije i identifikacije, zatim u oblasti seroloških ispitivanja. Pri ovom radu je uveo brojne metode u rutinsku upotrebu. Njegova trenutna glavna aktivnost u radu u laboratoriji je implementacija Real time PCR tehnike za dijagnostiku bakterijskih i virusnih bolesti životinja.

Učestvovao je na velikom broju simpozijuma i konferencija u zemlji i inostranstvu. Do sada je objavio četiri radova u međunarodnim časopisima. Bio je član radne grupe za izradu Nacionalnog programa za kontrolu rezistencije bakterija na antibiotike za period 2019–2021.

Član je Veterinarske komore Srbije, Udruženja mikrobiologa Srbije i udruženja MENSA Srbije. Posедуje vozačku dozvolu „B“ kategorije. Oženjen je i otac dvoje dece.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: Ференц_Кишкарољ

број уписа: 14/7

Изјављујем

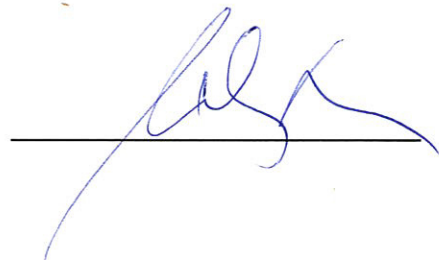
да је докторска дисертација под насловом

Примена серолошких метода, мултиплекс ланчане реакције полимеразе и секвенцирања гена за 16S рибозомалну РНК у идентификацији сероваријетета врсте *Salmonella enterica* подврсте *enterica*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 09.05.2019. године



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ференц_Кишкарољ

Број уписа: 14/7

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: Примена серолошких метода, мултиплекс ланчане реакције полимеразе и секвенцирања гена за 16S рибозомалну РНК у идентификацији сероваријетета врсте *Salmonella enterica* подврсте *enterica*

Ментори: др Душан Мишић, ванредни професор,
др Лидија Шенеровић, виши научни сарадник,

Потписани: Ференц_Кишкарољ

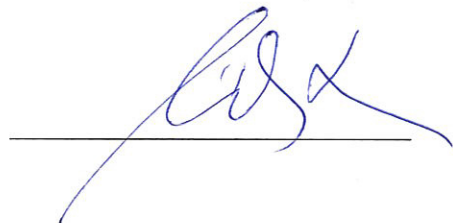
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 09.05.2019. године



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Примена серолошких метода, мултиплекс ланчане реакције полимеразе и секвенцирања гена за 16S рибозомалну РНК у идентификацији сероваријетета врсте *Salmonella enterica* подврсте *enterica*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 09.05.2019. године

