

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Gordana V. Kozoderović

Analiza prirode rezistencije na hinolone i
molekularna tipizacija odabranih serotipova
Salmonella enterica subspecies *enterica*

Doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Gordana V. Kozoderović

Analysis of nature of resistance to
quinolones and molecular typing of
selected serotypes of *Salmonella enterica*
subspecies *enterica*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTORI:

**Profesor dr Vesna Milošević,
Univerzitet u Novom Sadu,
Medicinski fakultet**

**Docent dr Jelena Lozo, Univerzitet
u Beogradu, Biološki fakultet**

**ČLANOVI
KOMISIJE :**

**Naučni savetnik dr Maja Velhner,
Naučni institut za veterinarstvo
„Novi Sad“**

**Viši naučni saradnik dr Nataša
Golić, Univerzitet u Beogradu,
Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo**

**Viši naučni saradnik dr Ivana
Strahinić, Univerzitet u Beogradu,
Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo, Beograd**

Datum odbrane

ANALIZA PRIRODE REZISTENCIJE NA HINOLONE I MOLEKULARNA TIPIZACIJA ODABRANIH SEROTIPOVA *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES *ENTERICA*

SAŽETAK

Salmoneloze spadaju među najznačajnije zoonoze u svetu. S obzirom da se ljudi zaražavaju najčešće putem konzumacije hrane životinjskog porekla, nadzor nad salmonelama neophodan je u svakom stadijumu proizvodnje hrane od farme do viljuške. Širenje rezistencije na hinolone među salmonelama predstavlja veliki javno zdravstveni problem zbog uticaja na lečenje ljudi i životinja. Cilj istraživanja je bio da se ispita mogućnost brze i efikasne tipizacije *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Enteritidis (*S. Enteritidis*) kao najčešćeg serotipa kod ljudi i učestalost i molekularni mehanizmi rezistencije na hinolone kod salmonela. U kolekciji izolata *S. Enteritidis* poreklom od ljudi, pilića i iz namirnica živinskog porekla, kombinacijom RAPD-PCR tipizacije sa četiri prajmera, rezistotipizacije i polimorfizma mutacija u regionu *gyrA* gena koji kodira rezistenciju na hinolone (QRDR), diskriminisano je 22 genetičke grupe sa indeksom diskriminacije 0.828. Svi izolati bili su visoko srodni, a tipizacija je dokazala nasumičnu raspoređenost tipova u sve tri kategorije izolata, odnosno cirkulaciju sojeva kroz razne stadijume lanca ishrane. RAPD-PCR tipizacija uspešno je izdvojila epidemijski soj među tri izolata *S. Enteritidis* iz jednog restorana brze hrane. Analizom uzoraka iz fabrike biskvita ustanovljena je kontaminacija sa najmanje četiri soja *S. Enteritidis* i povezanost serotipa Enteritidis sa jajima kao izvorom kontaminacije. Analizom većeg uzorka izolata poreklom od namirnica i ljudi sa teritorije Južnobačkog okruga u šestogodišnjem periodu ustanovljena je mala učestalost rezistencije *S. Enteritidis* na antibiotike, retka pojava višestruke rezistencije na antibiotike i mala učestalost rezistencije na hinolone (2.9%). Nađena su tri tipa mutacija odgovornih za rezistenciju na hinolone u QRDR regionu: Asp87Asn, Asp87Gly i Ser83Phe. Dominirale su mutacije na 87. poziciji i to Asp87Asn supstitucija. Nisu nađeni dokazi o klonalnom širenju sojeva rezistentnih na nalidiksičnu kiselinu. Rezistencija na fluorohinolone nije otkrivena. Dokazana je smanjena osetljivost na fluorohinolone kod *S. Enteritidis* rezistentnih na nalidiksičnu kiselinu. Kod drugih serotipova salmonela rezistencija na nalidiksičnu kiselinu i udruženost sa više markera rezistencije bila je

učestalija nego kod *S. Enteritidis*, naročito kod *S. Hadar*. Rezistencija na ampicilin i nalidiksičnu kiselinu bile su najčešće kod salmonela bez obzira na serotip. Diskriminativna moć i jednostavnost RAPD-PCR metode sa četiri prajmera udružene sa rezistotipizacijom preporučuju ih kao efikasan sistem tipizacije prilikom nadzora nad kretanjem salmonela u humanoj i životinjskoj populaciji. Ispitivanje rezistencije na antibiotike, a naročito na hinolone kod salmonela neophodno je u cilju upozoravanja kliničara na terapijske rizike, a sa epidemiološkog aspekta, radi detekcije pojave i širenja opasnih sojeva.

Ključne reči: *Salmonella* Enteritidis, RAPD, rezistencija, hinoloni, *gyrA*, QRDR

Naučna oblast: BIOLOGIJA

Uža naučna oblast: MOLEKULARNA BIOLOGIJA BAKTERIJA

UDK broj: 579.842(043.3)

ANALYSIS OF NATURE OF RESISTANCE TO QUINOLONES AND MOLECULAR TYPING OF SELECTED SEROTYPES OF *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES *ENTERICA*

ABSTRACT

Salmonellosis are among most significant zoonoses in the world. Since people are most often infected by consumption of food of animal origin, surveillance of salmonella is necessary in every stage of food production from farm to fork. Emergence of resistance to quinolones among salmonella is a significant public health problem, considering implications on the treatment of humans and animals. The aims of the investigation were to analyze the possibility of fast and efficient typing of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*) as the most frequent serotype in humans and to investigate frequency and molecular mechanisms determining resistance to quinolones in salmonella. In a collection of *S. Enteritidis* isolates originating from humans, poultry and marketed poultry products and eggs, a combination of RAPD-PCR typing with four primers, resistotyping and polymorphism of mutations in quinolone resistance determining region (QRDR) of *gyrA* gene revealed 22 genetic groups with discrimination index of 0.828. All isolates were closely related and typing has proved random distribution of types in all three categories of isolates, ie. circulation of strains through subsequent stages of food chain. RAPD-PCR typing successfully discriminated epidemic strain among 3 *S. Enteritidis* isolates from one fast food restaurant. Analysis of samples from one biscuit factory showed contamination with at least four strains of *S. Enteritidis* and strong connection of serotype Enteritidis with eggs as a source of contamination. Analysis of larger collection of isolates from food and humans in Southern Bačka county in a six-year period revealed low frequency of resistance of *S. Enteritidis* to antibiotics, rare occurrence of multiple resistance to antibiotics and low frequency of resistance to quinolones (2.9%). Three types of mutations determining resistance to quinolones in QRDR were discovered: Asp87Asn, Asp87Gly and Ser83Phe. Mutations at position 87 are dominant, with Asp87Asn as the most frequent. There was no evidence of clonal spread of strains resistant to quinolones. Resistance to fluoroquinolones was not detected. Reduced susceptibility to fluoroquinolones among *S.*

Enteritidis resistant to nalidixic acid was proved. Resistance to nalidixic acid and association with multiple antibiotic resistance were more common among other serotypes of salmonella, especially in *S. Hadar*, than among *S. Enteritidis*. Resistance to ampicillin and nalidixic acid were the most common in all investigated salmonella serotypes. Discriminative power and simplicity of RAPD-PCR method with four primers together with resistotyping recommend them as the efficient typing system for monitoring of salmonella in human and animal population. Investigation of resistance to antibiotics, especially to quinolones among salmonella is essential for alerting clinicians for therapy risks, and from epidemiological aspect, for detection of emergence and spread of dangerous strains.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, RAPD, resistance, quinolones, *gyrA*, QRDR

Scientific field: BIOLOGY

Special topic: MOLECULAR BIOLOGY OF BACTERIA

UDK number: 579.842(043.3)

Ova doktorska disertacija urađena je u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine u Novom Sadu i finansirana je iz projekata TR 31071 i ON 173019 Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije, čiji su nosioci Naučni Institut za veterinarstvo „Novi Sad“ i Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

Želim da se zahvalim:

Doc. dr Jeleni Lozo na korisnim savetima i strpljenju koji su mi pomogli u pisanju teze, a naročito za dostupnost u svako doba dana i noći prilikom razrešavanja svih nedoumica tokom pisanja i za kritičku ocenu teze.

Prof. dr Vesni Milošević na ukazanom poverenju i odličnim sugestijama koje su znatno poboljšale kvalitet teze, kao i za kritičku ocenu teze.

Dr Maji Velhner, mom vernom saborcu i motivatoru, mojoj lokomotivi, što me je nagovorila da krenemo u zajednički posao koji je rezultirao ovom tezom, ali pre svega jednim nesebičnim prijateljstvom i savezništvom. Neizmerno hvala zbog neiscrpane energije, podrške i saradnje u svakom segmentu eksperimentalne izrade i pisanja ove teze i za sve žučne ali odlične konstruktivne rasprave prilikom tumačenja rezultata i kritičke ocene teze.

Dr Nataši Golić na motivaciji i velikoj pomoći u omogućavanju da se izrada ove teze privede kraju, na detaljnim sugestijama tokom pisanja i na kritičkoj oceni teze.

Dr Ivani Strahinić na dobrim savetima i odličnoj analizi prilikom kritičke ocene teze.

Prof dr Zori Jelesić na dugogodišnjoj saradnji u istraživačkom radu, na stručnoj podršci i savetima i na izvanrednim sugestijama koje su mi pomogle prilikom pisanja teze.

Prof dr Mariji Kulauzov što mi je omogućila da se bavim ovim poslom koji toliko volim, za veliku podršku od samog početka mog naučnog rada i za korisne savete tokom pisanja teze.

Dr Gorani Ćosić, dr Dubravki Potkonjak i dr Igoru Stojanovu za korisne savete i informacije tokom pisanja teze.

Hvala mojoj porodici koja me je izdržala, bila strpljiva i dočekala da se ova teza privede kraju, a naročito hvala mom Milanu, mom kamenu temeljcu i mom najvećem savezniku!

SADRŽAJ

SKRAĆENICE	I
1.UVOD	1
1.1. Rod <i>Salmonella</i>	2
1.2. Istorijat, klasifikacija i taksonomija	3
1.3. Bakteriološke karakteristike i identifikacija salmonela	4
1.4. Infekcije salmonelama	5
1.4.1. <i>Mehanizmi patogenosti</i>	5
1.4.2. <i>Infekcije kod ljudi</i>	7
1.4.3. <i>Salmonele u prirodnoj sredini</i>	8
1.4.4. <i>Salmonele u biljkama</i>	9
1.4.5. <i>Infekcije kod životinja</i>	9
1.4.5.1. <i>Infekcije kod sisara gajenih za ljudsku ishranu</i>	11
1.4.5.2. <i>Infekcije kod živine gajene za ljudsku ishranu</i>	12
1.5. Epidemiologija infekcija	13
1.5.1. <i>Tipizacija salmonela</i>	14
1.5.2. <i>Epidemiološki trendovi salmoneloza u svetu</i>	19
1.5.3. <i>Epidemiološki trendovi salmoneloza kod ljudi u Vojvodini i Južnobačkom okrugu</i>	20
1.6. Antibiotско lečenje infekcija uzrokovanih salmonelama	22
1.7. Rezistencija na antibiotike	22
1.7.1. <i>Testiranje osetljivosti na antibiotike</i>	27
1.7.2. <i>Rezistencija <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> na antibiotike</i>	28
1.7.3. <i>Rezistencija na hinolone</i>	31
1.7.3.1. <i>Hinolonski antibiotici</i>	31
1.7.3.2. <i>Smanjena osetljivost na fluorohinolone</i>	33
1.7.3.3. <i>Mehanizmi rezistencije na fluorohinolone</i>	34
2. CILJEVI RADA	43
3. MATERIJAL I METODE	44
3.1. Materijal	44

3.1.1. Izolati.....	44
3.1.2. Medijumi za rast, kultivaciju i potvrdnu identifikaciju bakterija, testiranje osetljivosti na antibiotike i određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija.....	48
3.1.3. Serumi, antibiotici, kitovi za izolaciju DNK, kitovi za PCR,rastvori, puferi.....	48
3.2. Metode.....	49
3.2.1. Potvrdna identifikacija salmonela.....	49
3.2.2. Izolacija DNK.....	50
3.2.2.1. <u>Izolacija ukupne DNK za RAPD-PCR</u>	50
3.2.2.2. <u>Izolacija ukupne DNK za PCR umnožavanje</u> <u>QRDR regiona gyrA gena</u>	50
3.2.3. RAPD tipizacija.....	51
3.2.4. Selekcija za utvrđivanje rezistencije na NAL.....	52
3.2.5. Testiranje osetljivosti na antibiotike.....	52
3.2.6. Određivanje MIC za antibiotike.....	53
3.2.7. Umnožavanje QRDR regiona gyrA gena PCR-om i sekvenciranje.....	54
3.2.8. Određivanje Simsonovog indeksa diverziteta (D).....	55
3.2.9. Određivanje Dice koeficijenta.....	55
4. REZULTATI.....	56
4.1. Karakterizacija kolekcije od 60 izolata <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serotip Enteritidis (<i>S. Enteritidis</i>) poreklom od pilića, ljudi i namirnica živinskog porekla.....	56
4.1.1. RAPD tipizacija.....	56
4.1.2. Testiranje osetljivosti na antibiotike disk-difuzionom metodom.....	62
4.1.3. Određivanje MIC za NAL i za CIP agar-dilucionom metodom.....	63
4.1.4. Detekcija mutacija u QRDR regionu gyrA gena kod <i>S.</i> <i>Enteritidis</i> rezistentnih na NAL metodom sekvenciranja.....	64
4.1.5. Objedinjeni rezultati tipizacije za 60 izolata <i>S. Enteritidis</i>	65

4.1.6. <i>Određivanje diskriminacione moći tipizacionih metoda pomoću indeksa diskriminacije</i>	67
4.1.7. <i>Određivanje Dice koeficijenta</i>	68
4.2. Ispitivanje prirode rezistencije na NAL i smanjene osjetljivosti na fluorohinolone kod S. Enteritidis u šestogodišnjem periodu	69
4.2.1. <i>Analiza zastupljenosti rezistencije na NAL kod S. Enteritidis</i>	69
4.2.2. <i>Ispitivanje osjetljivosti NAL rezistentnih izolata S. Enteritidis na ostale antibiotike</i>	70
4.2.3. <i>Određivanje MIC za NAL i za CIP kod S. Enteritidis rezistentnih na NAL agar-dilucionom metodom</i>	70
4.2.4. <i>Detekcija mutacija u QRDR regionu gyrA gena kod S. Enteritidis rezistentnih na NAL metodom sekvenciranja</i>	71
4.3. Objedinjeni rezultati ispitivanja prirode mutacija kod svih S. Enteritidis rezistentnih na NAL u ovom istraživanju	73
4.4. Rezistencija na NAL kod različitih serotipova salmonela	74
4.4.1. <i>Analiza rezistencije na NAL različitih serotipova salmonela</i>	74
4.4.2. <i>Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike različitih serotipova salmonela rezistentnih na NAL</i>	75
5. DISKUSIJA	76
6. ZAKLJUČCI	100
7. LITERATURA	102

SKRAĆENICE

AMP	Ampicilin
AFLP	„Amplified fragment length polymorphism“
CFT	Cefalotin
CGH	„Comparative genomic hybridization“
CIP	Ciprofloksacin
CLSI	„Clinical and Laboratory Standards Institute“
CRO	Ceftriakson
dNTP	Dezoksi nukleotid trifosfati
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	„European Centre for Disease Prevention and Control“
EFSA	„European Food Safety Authority“
ESBL	„Extended spectrum β-lactamases“
ERIC	„Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences“
EUCAST	„European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing“
I	Intermedijeran
MDR	„Multidrug resistance“
MHA	Müeller-Hinton agar
MIC	„Minimal inhibitory concentration“
MLST	„Multi-locus sequence typing“
MLVA	„Multiple-locus variable number tandem repeat analysis“
NAL	Nalidiksična kiselina
PCR	Lančana reakcija polimeraze
PFGE	„Pulsed field gel electrophoresis“ Elektroforeza u pulsnom polju
PI	„Pathogenicity island“
PM	„Phenotype microarray“
R	Rezistentan
RAPD	„Randomly amplified polymorphic DNA“
RFLP	„Restriction fragment length polymorphism“

S	Osetljiv
S. Enteritidis	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serotip Enteritidis
SIM	„Sumpor-Indol-Motility“
SNP	„Single nucleotide polymorphism“
SPI	„Salmonella pathogenicity Island“
SS	Salmonella-Shigella agar
SXT	Kotrimoksazol
TET	Tetraciklin
VBNC	„Viable but non-culturable state“
VNTR	„Variable number tandem repeats“

1. UVOD

Salmonele se ubrajaju među najznačajnije patogene familije *Enterobacteriaceae*. Kod ljudi one izazivaju različite oblike oboljenja, od crevnih infekcija kao što je dijareja, do generalizovanih infekcija opasnih po život kao što je trbušni tifus. Generalizovane infekcije kod ljudi su uglavnom uzrokovane bakterijama vrste *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (*S.*), serotipom Typhi ili Paratyphi. Drugi serotipovi uzrokuju uglavnom crevne infekcije, ali mogu izazvati i septikemiju, a neretko je i postojanje dugotrajnog kliconoštva, odnosno slučajeva kada su zdravi ljudi nosioci salmonela. Salmonela se smatra ubikvitarnim mikroorganizmom. Sem ljudi ona može da izazove oboljenja kod mnogih životinjskih vrsta, uključujući i one koji se gaje za ljudsku ishranu, te su oboljenja kod ljudi najčešće povezana sa konzumacijom hrane životinjskog porekla (meso, jaja). Stoga oboljenja izazvana salmonelama spadaju među najznačajnije zoonoze.

Salmonella enterica subsp. *enterica* serotip Enteritidis (*S. Enteritidis*) je serotip koji je sa *S. Typhimurium* vodeći uzročnik salmoneloza kod ljudi u svetu. Iako je za *S. Enteritidis* karakteristično da je uglavnom osetljiva na većinu antibiotika, početkom devedesetih godina prošlog veka počinju da se beleže slučajevi višestruko rezistentnih izolata. Tokom protekle decenije još veći problem nastao je pojavom sojeva rezistentnih na hinolone, grupu sintetičkih antibiotika širokog spektra. Pojava rezistentnih sojeva na hinolone je utoliko značajnija jer je pokazatelj i smanjene osetljivosti pomenutih sojeva na fluorohinolone, hinolone novije generacije veće efikasnosti i šireg spektra delovanja. Fluorohinoloni su otkriveni kasnih 1970-tih, a u širokoj upotrebi su od sredine 1980-tih godina. Koriste se između ostalog za lečenje invazivnih i sistemskih salmoneloza kod ljudi i životinja. Preterana upotreba fluorohinolona dovela je do fenomena smanjene osetljivosti salmonela na fluorohinolone, a time i pojave prvih salmonela rezistentnih na hinolone. Rezistencija na hinolone povezana je često i sa rezistencijom na cefalosporine proširenog spektra i produkcijom β -laktamaza proširenog spektra („extended spectrum β -lactamases“ - ESBL) (Giraud, 2006; Gunell, 2010), čime se smanjuje mogućnost izbora terapije u lečenju ozbiljnih infekcija uzrokovanih salmonelama.

1.1. Rod *Salmonella*

Rod *Salmonella* čine pokretne štapičaste bakterije koje se mogu naći u crevima mnogih živih bića kao fakultativni intracelularni patogeni, ali mogu opstati i u prirodi kao slobodnoživeće, gde dele stanište sa drugim bakterijama, i protozoama (Tezcan-Merdol et al., 2004).

Rod *Salmonella* podeljen je na dve vrste: *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. Vrsta *Salmonella enterica* sastoji se od šest podvrsta, a podvrste od serotipova. Genomi pojedinih sojeva *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica subspecies arizonae*, *diarizonae* i oko 20 serotipova u okviru *Salmonella enterica subspecies enterica* su potpuno sekvencirani. Sličnosti među različitim serotipovima su 95-99% sekvence DNK. Bakterije roda *Salmonella* su srodne sa *Escherichia coli* (*E. coli*) jer dele 60-70% sekvence (Jacobsen et al., 2011). Salmonele se mogu podeliti na osnovu specifičnosti za domaćina i na osnovu patogeneze. Nedavno je pokazano da sklonost određenih serotipova za specifične domaćine zavisi ne toliko od interakcije sa imunim sistemom domaćina, već od sposobnosti da pre invazije tkiva izbegnu predatorske amebe specifične za crevo domaćina (Wildschutte and Lawrence, 2007). Pojedini serotipovi imaju uzak opseg domaćina i sposobne su da izazovu ozbiljne sistemske infekcije kod ograničenog broja srodnih vrsta („host specific“ - *S. Gallinarum* kod živine, *S. Typhi* kod čoveka ili *S. Abortus-ovis* kod ovaca). U drugu grupu spadaju serotipovi koji su adaptirani na širok opseg domaćina koji su prevalentni kod jedne vrste domaćina, ali mogu da izazovu bolesti i u drugim vrstama („host restricted“ - *S. Dublin* izaziva ozbiljnu bolest među govedima, ali od nje mogu oboleti i ljudi). Konačno, u treću grupu spadaju ubikvitarni serotipovi sa širokim opsegom domaćina („generalist“ - *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Hadar*). Ubikvitarni serotipovi retko izazivaju sistemska oboljenja kod zdravih odraslih osoba, ali su sposobni da kolonizuju gastrointestinalni trakt mnogih vrsta domaćina. Zahvaljujući čestoj kolonizaciji i visokom nivou izlučivanja putem fecesa kod životinja gajenih za ljudsku ishranu, ubikvitarni serotipovi ulaze u lanac ishrane i izazivaju slučajeve salmoneloza kod ljudi (Van Hoorebeke, 2011).

1.2. Istorijat, klasifikacija i taksonomija

Prvu salmonelu uzročnika tifusa otkrio je 1880. godine Eberth u slezini i mezenterijalnim limfnim žlezdama bolesnika koji je umro od crevnog tifusa. Gaffky je uspeo 1884. godine da je kultiviše i detaljnije opiše. Drugu bakteriju koja je po mnogim osobinama ličila na uzročnika crevnog tifusa izolovali su Salmon i Smith iz svinja koje su bolovale od svinjske kolere. Gärtner je 1888. godine našao salmonelu u slezini čoveka koji je umro od teškog enterokolitisa i ona je nazvana *Salmonella gartneri*, a kasnije *Salmonella* Enteritidis. Widal i saradnici su 1896. godine demonstrirali fenomen aglutinacije u serumu pacijenata. Test aglutinacije, koji je baziran na antigenoj klasifikaciji se i dan danas koristi kao standardni metod za serološku dijagnozu *Salmonella*.

Rod *Salmonella* pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Osnova za klasifikaciju i identifikaciju salmonela je bila serološka tipizacija koju je napravio White, a usavršio Kauffmann i drugi autori. Sistem serološke tipizacije se bazira na serološkoj identifikaciji razlika u polisaharidnom delu lipopolisaharidnog sloja (O ili somatski antigen) i filamentoznom delu flagela (H ili flagelarni antigen) koji su prisutni na površini bakterije. Isprva salmonele su bile podeljene u vrste na osnovu rezultata serotipizacije po principu: „svaki serotip - posebna vrsta“, pa su serotipovima davani nazivi prema Lineovoj binominalnoj nomenklaturi (na primer *Salmonella enteritidis*). Tek 1973. godine ovaj opšteprihvaćeni koncept biva iz korena poljuljan kada su Crosa i saradnici pomoću DNK-DNK hibridizacije dokazali da su svi serotipovi salmonela vrlo srodni, sem jednog, *Salmonella bongori*. Nakon objavljivanja genetičkih dokaza bilo je evidentno da se koncept vrste kod salmonela mora redefinisati. Tek 1987. godine Le Minor i Popoff su dali zvaničan predlog Komisiji Međunarodnog Komiteta za Sistematsku Bakteriologiju da se prihvati predlog Edwards-a i Kauffmann-a iz 1952. godine, da se vrsta nazove *Salmonella enterica*. Predlog je u početku bio odbijen jer se smatralo da se ne pridaje dovoljan značaj serotipu Typhi i da će ga kliničari možda prevideti ako dobiju nalaz *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Typhi. Međutim, danas je prihvaćeno da postoje dve vrste roda *Salmonella*: *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. Vrsti *Salmonella enterica* pripada preko 99% danas poznatih serotipova i sastoji se od šest podvrsta: *enterica* (podvrsta I), *salamae* (II),

arizonae (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) i *indica* (VI). Vrste *Salmonella enterica* pripadaju svi najvažniji serotipovi patogeni za ljude, a danas je poznato skoro 2500. Imena serotipova uobičajeno se daju prema sindromu koji izazivaju (*S. Typhi*), specifičnim domaćinima (*S. Gallinarum*) ili prema geografskom poreklu novog serotipa (*S. Kentucky*).

Čak i sa promenama u taksonomiji, ime serotipa ostaje glavna taksonomska definicija izolata salmonela. Široko je prihvaćeno da se umesto *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis koristi naziv *Salmonella Enteritidis* (gde je Enteritidis oznaka serotipa, a ne vrste) (Gunell, 2010).

1.3. Bakteriološke karakteristike i identifikacija salmonela

Salmonele su Gram-negativni, fakultativno anaerobni, nesporogeni pravi štapići. Dimenzije su im 2 do 3 sa 0.4 do 0.6 μm i većinom poseduju peritrihalne flagele, tj. sposobne su da se aktivno kreću. Sposobne su da redukuju nitrate, ne proizvode citohrom oksidazu, ne hidrolizuju ureu i ne vrše dezaminaciju triptofana i fenilalanina. Prilikom fermentacije glukoze proizvode gas i ne fermentišu laktozu, adonitol, saharozu, salicin i 2-ketoglukonat. Produkuju H_2S iz tiosulfata, dekarboksiluju ornitin i lizin. Pojedini serotipovi salmonela se razlikuju međusobno u metabolizmu ugljenih hidrata, a *S. Typhi* je jedini serotip koji ne produkuje gas prilikom fermentacije šećera.

Kada su u pitanju ljudi, detekcija salmonela se vrši iz stolice ili ređe iz krvi (kod sumnje na bakterijemiju ili tifus). U veterinarskoj praksi salmonela se izoluje iz stolice životinja, unutrašnjih organa (npr. jetre pilića), stelje, itd. Danas je za izolaciju salmonela iz različitih uzoraka sa uglavnom mešovitom bakterijskom florom na raspolaganju niz diferencijalnih i selektivnih čvrstih podloga (MacConkey i dezoksiholatni agar, *Salmonella-Shigella*, Wilson-Blair i Hektoen agar) u kombinaciji sa podlogama za umnožavanje (selenit bujon). Savremenije selektivne hromogene podloge kao što je CHROM agar se koriste i za izolaciju i za preliminarnu identifikaciju salmonela iz kliničkih uzoraka. Za izolaciju *S. Typhi* i detekciju laktoza fermentišućih sojeva salmonela koriste se selektivnije podloge kao što je bizmut-sulfitni agar koji sadrži vodonik sulfit umesto laktoze. Identifikacija salmonela se potvrđuje nizom biohemijskih testova i testom aglutinacije na pločici za dokazivanje specifičnih

somatskih i flagelarnih antigena, čime se definiše o kom se serotipu radi. Kao pomoćno sredstvo u serološkoj identifikaciji koristi se Kauffmann-White-ova šema prema kojoj su salmonele podeljene na osnovu somatskih antigena u 67 O grupa, ali najčešće uzročnici oboljenja kod ljudi pripadaju grupama A, B, C₁, C₂, D i E. Dalja podela u serotipove se vrši prema H ili flagelarnim antigenima faze 1 i faze 2 (WHO, 2007).

1.4. Infekcije salmonelama

Salmonele su patogene kako za ljude tako i za većinu toplokrvnih životinja, riba, a odnedavno je dokazana i patogenost za biljke (Tezcan-Merdol et al., 2004). Oboljenja kod ljudi su najčešće vezana za kontaminiranu hranu životinjskog porekla ili vodu zagađenu fecesom obolelih ljudi ili životinja. Takođe je dokazana i mogućnost zaraze konzumacijom zaraženih biljaka ili biljaka koje su zalivane zagađenom vodom. Neodgovarajuća higijena ruku može dovesti do prenosa oboljenja sa čoveka na čoveka i sa životinja na čoveka. Može se reći da je glavni put infekcije fekalno-oralni put. U prirodnom okruženju postoje mnogi rezervoari kao što su amebe, insekti, glodari, koji su potencijalni prenosioci zaraze. I pored značajnog unapređenja na polju bezbednosti proizvodnje i distribucije hrane, infekcije izazvane salmonelama su široko rasprostranjene u svetu, pogađaju ljude svih uzrasta i predstavljaju veliki javno zdravstveni problem.

1.4.1. Mehanizmi patogenosti

Minimalna infektivna doza za ljude varira od 30 do preko 10⁹ infektivnih mikroorganizama. Ova varijabilnost zavisi od matriksa hrane kontaminirane salmonelom i stanja digestivnog trakta čoveka. Infektivna doza je niža u kontaminiranoj hrani sa visokim sadržajem masti kao što je sir ili sladoled. Da bi dostigle mesta kolonizacije, salmonele moraju preživeti uslove koji vladaju u proksimalnom delu gastrointestinalnog trakta, uključujući nizak pH i prisustvo organskih kiselina. Salmonele su razvile mehanizme koji omogućavaju preživljavanje uslova koji vladaju u gastrointestinalnom traktu kao što je tolerancija na kiseline („acid tolerance response“ - ATR) koji uključuje različite regulatorne faktore i proteine. Bakterije koje prežive

nepovoljne uslove u želucu, potom kolonizuju tanko, debelo crevo i cekum. Intestinalna adhezija se vrši putem više vrsta fimbrija ili pila prisutnih na površini bakterije: fimbrije tipa 1 (*Fim*), duge polarne fimbrije (*Lpf*), tanke agregativne ili kovrdžave fimbrije i plazmidski kodirane fimbrije (*Pef*). Pojedini tipovi fimbrija imaju afinitet za odgovarajuće tkivo domaćina. Nakon vezivanja za epitelijalne ćelije, kod bakterija se eksprimira sekretorni sistem tipa III (T3SS) koji pospešuje ulaz u ćelije i invaziju. T3SS predstavlja kompleks proteina koji omogućavaju transfer faktora virulencije direktno u ćelije domaćina i utiče na najmanje 20 strukturalnih i regulatornih proteina koji su uključeni u invaziju ćelija. Fizički T3SS kompleks predstavlja strukturu koja u vidu šuplje igle spaja bakterijsku citoplazmu i ćelijsku membranu napadnute ćelije. Geni koji kodiraju T3SS mašineriju su locirani u ostrvu patogenosti 1 prisutnom kod bakterija roda *Salmonella* („*Salmonella* pathogenicity island-1“ - SPI-1). Ostrva patogenosti („pathogenicity islands“ - PI) su genetički elementi koji se sastoje od gena koji kodiraju faktore virulencije, kao što je adhezija, invazija kao i geni za proizvodnju toksina. PI se mogu nalaziti na hromozomu ili na plazmidu, ograničeni su ponavljajućim sekvencama i u bakterijskim genomima su u blizini tRNK gena, često su mobilni i mogu se ugrađivati u blizini različitih tRNK lokusa. PI mogu da sadrže transpozone, integrone ili insercione sekvence. Do 2005. godine je identifikovano 12 PI kod salmonela (Velge et al., 2005). Jedna od glavnih kliničkih manifestacija salmoneloze je dijareja koju uzrokuju SPI-1 T3SS translocirani proteini - *SopB*. Salmonela biva uvučena u ćeliju domaćina u specifičnoj vakuoli („*Salmonella* containing vacuole“ - SCV). SCV je glavni faktor virulencije salmonela, jer je zahvaljujući njoj bakterija zaštićena od lizosomalnih procesa prilikom ulaska u makrofage na Peyer-ovim pločicama. Invazivne, sistemske infekcije salmonelama vezane su za T3SS kodiranim sa ostrva patogenosti 2 (SPI-2). Ozbiljne manifestacije salmoneloza u vidu sistemskih infekcija dešavaju se kad se salmonele prisutne intracelularno u makrofagima i dendritičnim ćelijama (migratorni fagociti) raseju iz crevnog trakta u druge delove tela. Produkti gena lociranih na SPI-2 T3SS suprimiraju ispoljavanje bakterijskih antigena unutar dendritičnih ćelija, te izostaje jači imuni odgovor, što bakterijama omogućuje opstanak do dospeća u druge organe gde salmonele započinju proces apoptoze (Schmidt and Hensel, 2004). Pored navedenih faktora virulencije na SPI-1 i SPI-2 T3SS, neki faktori mogu biti locirani na plazmidima. Mnogi serotipovi vezani za infekcije ljudi kao što su

S. Typhimurium, *S. Enteritidis*, pa i *S. Choleraesuis* nose gene odgovorne za virulenciju na plazmidima. Neki od ovih plazmida su i autokonjugabilni, što obezbeđuje značajnu kompetitivnu prednost sojevima koji ih nose (Darwin and Miller, 1999; Foley and Lynne, 2008).

1.4.2. Infekcije kod ljudi

Postoje dve odvojene kategorije infekcija salmonelama, prema oboljenjima koja izazivaju kod ljudi: tifusne i netifusne infekcije. Tifusne infekcije izazivaju serotipovi *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* i *S. Paratyphi C*. Jedini rezervoari za salmonele serotipova *S. Typhi* i *S. Paratyphi A, B i C* su ljudi i bolesti se prenose sa čoveka na čoveka, ređe direktnim kontaktom obolele i zdrave osobe ili kontaktom sa fecesom osobe koja je hronični kliconoša, a češće fekalno kontaminiranom vodom i hranom. Trbušni tifus koji izaziva *S. Typhi* je infekcija krvi opasna po život koja je i danas endemska u mnogim delovima sveta sa nerazvijenim higijensko-sanitarnim sistemima, gde su voda i hrana zagađene ljudskim fekalijama. Pijenje neprerađene vode i konzumacija sirovog i neoprano voća i povrća, kao i mlečni proizvodi su glavni faktori rizika za trbušni tifus u tim područjima. Endemsko područje je Azija, naročito indijski potkontinent, a beleži se ukupno 22 miliona slučajeva godišnje u svetu. Inkubacija je od jedne do šest nedelja, a simptomi su visoka temperatura, znojenje, glavobolja, nesаница, bol u stomaku i dijareja ili konstipacija. *S. Paratyphi A, B i C* izazivaju slične, ali blaže simptome od trbušnog tifusa, i objedinjeni su pod nazivom paratifus.

Za razliku od prethodnih, netifusne salmoneloze mogu se nazvati zoonozama, budući da su im rezervoar i ljudi i životinje i da se infekcija najčešće prenosi konzumacijom zaraženih ili kontaminiranih proizvoda animalnog porekla (jaja, meso, mleko). Gastrointestinalna infekcija je najuobičajeniji vid infekcije salmonelama, sa uobičajenim simptomima kao što su gastroenteritis, dijareja, povraćanje, groznica i stomachni grčevi koji počinju najčešće 12 do 72 časa nakon infekcije i traju tri do sedam dana. Iako infekcije salmonelama uzrokuju uglavnom blago ili umereno teško oboljenje koje prolazi samo od sebe, takođe se mogu i javiti po život opasne infekcije kao što je septikemija, osteomijelitis, pneumonija i meningitis, naročito kod starijih i imunokompromitovanih pacijenata (Foley et al., 2006; Dhanoa and Fatt, 2009).

Nasuprot trbušnom tifusu, ostale salmoneloze su široko rasprostranjene i u razvijenom i u nerazvijenom svetu. Objašnjenje leži u tome da i pored napretka u primeni mera bezbednosti u proizvodnji i prometu namirnica, masovnost proizvodnje životinja za ljudsku ishranu na farmama, proizvodnje povrća navodnjavanog prirodnim fekalnim đubrivom i porast međunarodne trgovine hranom dovode do veće mogućnosti masovne kontaminacije hrane salmonelama i njihovog globalnog širenja među ljudima.

1.4.3. *Salmonele u prirodnoj sredini*

Životni ciklus salmonela uključuje fazu kada se nalaze unutar domaćina gde im je obezbeđena temperirana sredina bogata aminokiselinama i šećerima, pogodna za rast i razmnožavanje. Izlučivanjem u spoljnu sredinu putem fecesa, bakterije se nađu u potpuno drugačijem okruženju, bilo da je u pitanju voda ili zemlja, suočavajući se sa ograničenim resursima hranljivih materija, niskom vlažnošću, temperaturom i pH, nekad visokim salinitetom i prisustvom predatora. Mnogi autori smatraju da salmonele preživljavaju ovakve uslove ulazeći u vijabilno, ali nekultivabilno stanje („viable but nonculturable state“ – VBNC) (Gupte et al., 2003). U ovom stanju bakterije su „uspavane“ - metabolički su aktivne, ali se ne mogu kultivisati u laboratorijskim uslovima. Sa vraćanjem povoljnih uslova bakterije ponovo rastu i razmnožavaju se. Ima autora koji sumnjaju u ispravnost ove hipoteze (Winfield and Groisman, 2003), ali je evidentno da salmonele vrlo uspešno i dugo opstaju u spoljašnjoj sredini, čak duže od *E. coli*. Upravo ta ubikvitarna priroda omogućava salmonelama životni ciklus koji se sastoji od prolaza kroz domaćina u prirodnu sredinu i nazad u novog domaćina. Ovim se između ostalog objašnjava višegodišnja perzistencija salmonela na farmama kao i dugoročno preživljavanje u zemlji nakon đubrenja njiva izmetom inficiranih životinja. Sa druge strane, salmonele imaju sposobnost preživljavanja i do 50 dana u sredinama kao što su površine u kupatilu, zahvaljujući sposobnosti adhezije i formiranja biofilmova. Kada je vodena sredina u pitanju, u septičkim jamama i kanalizaciji ostaju vijabilne 10 do 15 dana, u površinskim zagađenim vodama nadživljavaju *Staphylococcus aureus* i *Vibrio cholerae*, a u morskim vodama za razliku od *E. coli* njihov broj ne varira u zavisnosti od temperature ili sezone, nije podložna osmotskom stresu pri promeni saliniteta pri ulivanju slatkovodne kanalizacije u morsku sredinu.

Takođe, salmonela je mnogo otpornija od *E. coli* i u zemlji i sedimentu, gde ne samo da preživljava putem adhezije za čestice, nego se i razmnožava najmanje godinu dana, a prema nekim autorima i 900 dana (Winfield and Groisman, 2003).

1.4.4. *Salmonele u biljkama*

Iako se za slučajeve salmoneloza uzrokovane konzumacijom povrća i voća najčešće optuživala kontaminacija spoljašnjosti biljaka prilikom zalivanja fekalnom vodom ili prilikom procesuiranja, nedavno je dokazano da salmonele aktivno inficiraju biljke i intracelularno se razmnožavaju i izazivaju patogene efekte na biljkama u svim stadijumima razvića. Dokazano je da salmonele mogu intracelularno inficirati radič, salatu, paradajz, razne klice, itd, izazivajući kaskadu imunog odgovora i patološke promene, kao i da mogu formirati stabilne biofilme na korenu i listovima. Takođe salmonele mogu da prodru u biljku iz kontaminiranog zemljišta kroz korenov sistem (Schikora et al., 2008). Identifikovan je poseban set gena kod *S. Typhimurium* koji se diferencijalno reguliše tokom kolonizacije unutrašnjih tkiva paradajza, tzv. geni regulisani paradajzom, a koji su različiti od gena uključenih u infekciju i kolonizaciju životinjskih tkiva, kao i od gena za kolonizaciju biljnih tkiva nađenih kod fitopatogenih bakterija (Noel et al., 2010). S obzirom da se voće i povrće konzumira uglavnom sirovo, jasno je da površinsko pranje nije dovoljna mera za dekontaminaciju i da se rizik od konzumacije sirovih namirnica mora dodatno razmotriti (Lynch et al., 2009).

1.4.5. *Infekcije kod životinja*

Salmonele su široko rasprostranjene među skoro svim grupama životinja. Malo se zna o prevalenci, patogenosti i distribuciji salmonela među divljim životinjama, mada su izolovane iz fecesa oposuma, veverica, rakuna, jelena, ježeva, lisica, minkova, puma, tigrova, divljih svinja, nilskih konja, nosoroga, foka, kitova, itd. Takođe, salmonele su prisutne i među pticama pevačicama, grabljivicama, papagajima, sovama, labudovima, ribama, insektima (mravi, muve, bubašvabe, crvi, komarci), artropodama (škampi, krabe). Muve mogu da prenose tifus i druge serotipove salmonela (mogu izlučiti 10^7 bakterija u izmetu), a kokošije grinje prenose salmonele među pilićima, što im daje

veliki značaj kao rezervoarima infekcije (Holt et al., 2007; Hoelzer et al., 2011). Bakteriofagne nematode koje se nalaze u zemlji mogu takođe biti domaćini salmonelama, a neretko se nalaze i na povrću i voću gde čak mogu da štite salmonele od efekata pranja i tretmana dezinficijensima tokom obrade namirnica (Caldwell et al., 2003; Kenney et al., 2004). Dok kod nekih životinja salmonele mogu izazvati oboljenja, druge mogu biti njihovi nosioci bez vidljivih znakova bolesti, ali ipak predstavljati opasnost za ljude kao rezervoar infekcije. I kod životinja glavni put prenosa je fekalno-oralni put, ali je moguća i vertikalna transmisija kod pilića, a preko respiratornog sistema i tonzila kod svinja i goveda. Životinje gajene za ljudsku ishranu su najveći izvor potencijalne zaraze ljudi salmonelama. Takođe, infekcije salmonelama se danas povezuju i sa kućnim ljubimcima kao što su ptice, glodari, mačke i psi. Kod ovih životinja infekcija je uglavnom asimptomatska, ali se mogu javiti i groznica, enterokolitis, endotoksemija, povraćanje, anoreksija, dehidracija, itd. Prevalenca među kućnim ljubimcima psima i mačkama je 1-5%. Psi i mačke se zaraze uglavnom preko hrane, češće sirove hrane, ali oko 30% infekcija nastaje kada su životinje hranjene kontaminiranim komercijalnom hranom. Među ljubimcima su nalaženi i višestruko rezistentni izolati salmonela. Direktan kontakt sa psima i mačkama u kućama i veterinarskim klinikama je glavni put infekcije ljudi. Salmonele se mogu naći i kod glodara kućnih ljubimaca, kao što su miševi, pacovi, zečevi, hrčci, morski prasići, a zabeležena je i humana epidemija *S. Typhimurium* u više država čiji su izvor bili smrznuti glodari kao hrana za zmijske. Kod pojedinih grupa životinja kao što su reptili (zmijske, kornjače, gušteri, krokodili) i vodozemci, salmonele se prema nekim autorima smatraju delom normalne crevne flore, jer su zastupljene kod velike većine jedinki (90%) u crevnom traktu i drugim organima, a ne izazivaju nikakve kliničke ni patofiziološke znakove bolesti (Chiodini, 1982; Corrente et al., 2004). Približno 40% svih poznatih serotipova salmonela je nađeno kod reptila i vodozemaca, pa ipak manje od 1% salmoneloza kod ljudi je uzrokovano serotipovima karakterističnim za reptile. Salmonele se i kod ovih životinja izlučuju fecesom, put zaraze je najčešće indirektni kontakt sa okruženjem životinje, a infekcije kod ljudi su češće sistemske i ozbiljne sa višim mortalitetom nego kod salmoneloza poreklom iz hrane (Hoelzer et al., 2011). Pokazano je da su infekcije serotipovima *S. Marina* i *S. Chameleon* uzrokovane kontaktom sa iguanama, a kontakt sa zmijama je povezan sa infekcijom *Salmonella*

enterica subspecies arizonae, iako reptili mogu biti domaćini i uobičajenijim serotipovima koji pripadaju podvrsti *enterica*. Stoga, sa porastom popularnosti držanja takozvanih egzotičnih ljubimaca raste i rizik zaraze pojedinim serotipovima, naročito kada su u pitanju deca (Harris et al., 2010).

1.4.5.1. Infekcije kod sisara gajenih za ljudsku ishranu

Salmonela je značajan patogen u trovanju hranom kod ljudi, iako ima mnogo nižu prevalencu među životinjama na farmama u poređenju sa *E. coli* i bakterijama roda *Campylobacter*. Salmonela se najčešće nalazi kod pilića, svinja i goveda, a zastupljenost različitih serotipova varira među ovim grupama životinja. *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* spadaju među najčešće kod pilića i u jajima. Stoga su infekcije kod ljudi ovim serotipovima uglavnom vezane za konzumaciju piletine (*S. Typhimurium*) i jaja (*S. Enteritidis*) (Pidcock et al., 2002). *S. Typhimurium* ima širi opseg domaćina, pa se može naći i kod stoke i svinja, i povremeno i kod ovaca. Sa druge strane, kod ljudi relativno retke, *S. Kentucky* su široko rasprostranjene među pilićima u SAD. *S. Dublin* je karakteristična za krupnu stoku. Takođe je veliki problem salmoneloza među gajenim ribama u ribnjacima, a izvor zaraze je najčešće riblja hrana. Generalno, salmonele ređe uzrokuju oboljevanja kod životinja gajenih za ljudsku ishranu, već su najčešće nezapažene ili sa slabim simptomima.

Kod goveda su posledice oboljevanja od salmonela ređe abortusi, a veći značaj imaju slučajevi oboljevanja mlađih jedinki, što ima za posledicu gubitak težine i troškove lečenja i kontrole širenja epidemije. Kod odraslih grla infekcije salmonelom često prolaze nezapaženo i poznato je da perzistiraju na inficiranim farmama mesecima i godinama. Ljudi se mogu zaraziti od inficiranih goveda prvenstveno putem konzumacije sirovog mleka i sira i direktnim kontaktom sa životinjama ili njihovim izmetom. Serotipovi koji se detektuju kod goveda su *S. Dublin*, *S. Newport*, *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Montevideo*, *S. Braenderup*, itd (Hoelzer et al., 2011).

Salmoneloze kod ovaca dovode do značajnog mortaliteta i spadaju među ekonomski najznačajnije bolesti malih ruminanata. Abortusi su najčešće izazvani serotipom *S. Abortus-ovis*, ali su zabeleženi slučajevi uzrokovani i *S. Typhimurium* i *S. Dublin*, a vrlo je visok i neonatalni mortalitet i mortalitet jagnjadi kod pogođenih stada.

Salmonella diarizonae je visoko adaptirani serotip za ovce i uzročnik zimske dizenterije, a takođe i uzročnik abortusa. Ljudi se ređe zaražavaju od ovaca, jer je izlučivanje putem fecesa relativno slabo, rizik je veći za zaposlene na farmama preko okruženja, vune, itd., kao posledica loše higijene (Hoelzer et al., 2011).

Kod svinja su moguće manifestacije od asimptomatske infekcije do perakutnog oboljenja od enteritisa do septikemije. *S. Choleraesuis* uzrokuje ozbiljne sistemske infekcije, a ubikvitarni serotipovi kao što je *S. Typhimurium* obično uzrokuju blago oboljenje ili su asimptomatske, ali životinje izlučuju salmonele dosta dugo. Mogu oboleti sve starosne grupe ali češće prasići stariji od 8 nedelja (Hoelzer et al., 2011), a ljudi se zaražavaju konzumacijom mesa.

1.4.5.2. Infekcije kod živine gajene za ljudsku ishranu

Nasuprot ozbiljnim oboljenjima izazvanim *E.coli* i *Campylobacter* sp., salmoneloze se kod pilića smatraju velikim problemom u proizvodnji, najviše zbog opasnosti koju zaražena jata predstavljaju za bezbednost hrane. Infekcije se ipak mogu javiti kao akutne ili hronične izazvane jednim ili sa više serotipova roda *Salmonella*. Pilići se mogu inficirati oralnim putem, kao i nazalnim i kloakalnim putem. Takođe, česta je i vertikalna transmisija jaja bilo iz inficiranog ovarijuma, ovidukta ili tokom prolaska kroz kloakalni feces inficiranih koka bilo kliconoša (*S. Enteritidis*), ali većina infekcija su asimptomatske. Patogenost salmonela zavisi od invazivnosti i sposobnosti bakterija da prežive i da se umnožavaju u ćelijama, naročito makrofazima. Glavno mesto umnožavanja ovih bakterija je digestivni trakt, a zatim sledi invazija kroz crevnu mukozu, cecalne tonzile i Peyer-ove pločice. Asimilovane bakterije od strane makrofaga se putem krvi ili limfe šire na organe koji su bogati retikuloendotelijalnim tkivom kao što su jetra i slezina, koji su ujedno glavno mesto za dalje umnožavanje. U slučaju neodgovarajućeg imunog odgovora organizma, može doći do sekundarne invazije i lokalizacije u drugim organima, posebno ovarijumu, oviduktu, miokardu, perikardu, žlezdanom želucu, žumančanoj kesi i plućima. Klinički simptomi izazvani *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* su uglavnom blagi i prolaze nezapaženo ali pilići postaju kliconoše jer dolazi do asimptomatske kolonizacije crevnog trakta. Međutim, zabeležene su i akutne epidemije kliničke bolesti sa visokim mortalitetom među

pilićima mlađim od dve nedelje (Velge et al., 2005). Kod odraslih kliconoša reproduktivni organi su predilekciona mesta za *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*, koje dovode do infekcije ovarijalnih folikula i kao rezultat dovode do transovarijalne transmisije bakterija.

Generalno se smatra da su ovidukt i belance (zapravo mukus ovidukta) neprijateljske sredine za salmonele, a naročito belance odnosno albumen, koji sadrži mnoštvo antibakterijskih supstanci od kojih su najvažniji ovotransferin i lizozim. Dok ostali serotipovi roda *Salmonella* mogu da kolonizuju gastrointestinalne organe živine, samo su *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* sposobni da kolonizuju reproduktivne organe i tako kontaminiraju jaja u toku formiranja. Dodatno, *S. Enteritidis* je u stanju da opstane u jajetu nakon što je sneseno. *S. Enteritidis* može biti i u belancetu i u žumancetu, ali je u belancetu češća (Clavijo et al., 2006).

Salmonele se izlučuju i preko fecesa kada dolazi do lateralnog širenja putem fekalno kontaminirane hrane, vode i stelje, a na ovaj način i drugi serotipovi salmonela mogu da kontaminiraju ljuske jaja. Od oko 2500 poznatih serotipova roda *Salmonella*, svega 10% je nađeno kod živine. Pilići su prirodni domaćini visoko adaptiranih *S. Gallinarum* i *S. Pullorum*, ali se epidemije javljaju i kod ćuraka, morki, prepelica i fazana. Sa ljudskog aspekta, mnogo veći značaj ima zastupljenost *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* među živinom, jer se teško detektuju zbog nedostatka simptoma, a ovi serotipovi najčešće se prenose sa pilića na ljude, *S. Enteritidis* putem jaja, a *S. Typhimurium* putem mesa. Postoji i problem praga detekcije *S. Enteritidis* u jajima dok bakterije ne dostignu log 9.0 po jajetu. Velika gustina jata, slaba ishrana i drugi stresni uslovi kao i nehigijensko okruženje značajno povećavaju mortalitet i pad proizvodnje. Pokazano je da pacovi umnogome doprinose širenju i perzistenciji salmonela na farmama pilića (Kabir, 2010).

1.5. Epidemiologija infekcija

Ubikvitarnost salmonela i široka rasprostranjenost u prirodnoj sredini, na farmama, pa prema tome i u lancu hrane, prilagođenost na mnoge životinjske rezervoare i puteve prenošenja čini epidemiološka istraživanja ovih bakterija vrlo složenim. Dok se za većinu epidemija među ljudima relativno lako može otkriti izvor infekcije jer su

najčešće alimentarne prirode, uzrokovane jednim serotipom i uglavnom ograničenog trajanja, izuzetak mogu biti bolničke epidemije ili epidemije u domovima za stare ili mentalno zaostale koje duže traju i imaju složenije puteve prenošenja. Kod životinja gajenih za ljudsku ishranu na farmama, izvori, putevi i načini širenja infekcija su najčešće složeniji, naročito zato što više sojeva i serotipova salmonela može perzistirati na farmama istovremeno i to duže vreme. Samim tim i eradikacija salmonela na farmama predstavlja veliki izazov. Prvi korak u sprečavanju širenja infekcija među životinjama i ljudima je praćenje kretanja pojedinih sojeva salmonela u obe populacije. U tu svrhu nije dovoljno identifikovati salmonela do nivoa serotipa, jer nisu svi sojevi bakterija u okviru serotipa identični. Podele na različitim nivoima u okviru serotipa imaju značaja u epidemiološkim studijama, kako populacionim, tako i na lokalnom nivou u okviru nadzora nad ovim patogenima.

1.5.1. *Tipizacija salmonela*

Tipizacija ima za cilj određivanje nivoa međusobne srodnosti izolata, odnosno svrstavanje izolata u sojeve. Soj je set klonalno povezanih izolata koji se međusobno ne mogu razlikovati primenom odgovarajućih metoda tipizacije, a razlikuju se od drugih izolata po svojim genotipskim karakteristikama (Dijkshoorn et al., 2000). Definicija soja je praktično zavisna od rezolutivne moći sistema tipizacije, odnosno varijabilnosti osobine ili dela genoma koji se izučavaju (Pereira et al., 2008) i stoga je korisnije koristiti klonalnost kao relativan pojam nego kao apsolutan. Sojevi predstavljaju uslovnu podelu vrste. Koriste se još i izrazi kao što su tipovi, klonovi ili linije. U epidemiološkim istraživanjima diferencijacija sojeva omogućava utvrđivanje endemskog prisustva, incidence, prevalencije, cirkulacije i evolucije patogenih klonova u prostoru i vremenu. Takođe omogućava međusobno povezivanje kliničkih slučajeva i slučajeva sa epidemijama, rezervoarima i putevima prenošenja bakterija. Savremena epidemiologija oslanja se na molekularne metode tipizacije koje analiziraju sastav nukleinskih kiselina ili aminokiselina u nekom organizmu i često se naziva i molekularna epidemiologija (Foxman and Riley, 2001). Ne postoji „zlatni standard“ odnosno metoda koja je sama za sebe u stanju da otkrije sve razlike među sojevima. Stoga se obično pribegava kombinaciji dve ili više tipizacionih tehnika, a rezultati se

analiziraju u svetlu epidemioloških podataka. Metode tipizacije mogu se vrednovati prema mogućnosti dobijanja nedvosmislenog rezultata za svaki izolat, reproducibilnosti, moći diskriminacije odnosno diferencijacije među nesrodnim sojevima, lakoći interpretacije i lakoći izvođenja (Foxman et al., 2005).

Koncept vrste pretrpeo je velike izmene nakon uvođenja metoda genotipizacije u filogenetska ispitivanja roda *Salmonella*. Činjenica da većina serotipova genetički pripada istoj podvrsti sama po sebi ukazuje na teškoće u diskriminaciji sojeva salmonela, a naročito ispod nivoa serotipa. Podela salmonela ispod nivoa serotipa ili tipizacija sojeva može se vršiti korišćenjem fenotipskih ili genotipskih metoda (Liebana, 2002).

Od tradicionalnih fenotipskih metoda koriste se biotipizacija (Ahmed et al., 2000), fagotipizacija i rezistotipizacija.

U slučaju salmonela opšte je priznata fagotipizacija, odnosno tipizacija sojeva koji su osetljivi na određeni set faga ili virusa koji specifično liziraju bakterijske ćelije (Rychlik et al., 2000; de Oliveira et al., 2007). Tako se danas govori o dominaciji određenih fagotipova u nekim delovima sveta kao što je fagotip DT104 *S. Typhimurium* (Velge et al., 2005).

Rezistotipizacija ili određivanje osetljivosti na antibiotike može da diskriminiše različite sojeve salmonela ukoliko oni poseduju determinante rezistencije. S obzirom da je prisustvo gena odnosno mutacija koje determinišu rezistenciju ponekad favorizovano selektivnim pritiskom primene antibiotika i da se geni za rezistenciju mogu naći udruženi na mobilnim genetičkim elementima i na taj način horizontalno preneseni među sojevima istih i/ili različitih vrsta, rezultati rezistotipizacije se moraju razmatrati u svetlu širih epidemioloških istraživanja (Xia et al., 2009).

Metode genotipizacije diferenciraju sojeve salmonela na osnovu njihovih razlika na nivou DNK molekula. DNK metode uključuju PFGE („pulsed-field gel electrophoresis“), genotipizaciju baziranu na hibridizaciji ili RFLP („restriction fragment length polymorphism“) odnosno tipizaciju na osnovu insercionih sekvenci IS200 kao i ribotipizaciji. Dodatno u genotipizaciji se koriste metode bazirane na PCR („polymerase chain reaction“) metodi i to RAPD-PCR („randomly amplified polymorphic DNA“), ERIC-PCR („enterobacterial repetitive intergenic consensus sekvence“) i AFLP („amplified fragment length polymorphism“). Dodatno,

genotipizacija može podrazumevati PCR-ribotipizaciju, „microarray“ genotipizaciju, MLVA („multiple locus variable number of tandem repeats“), MLST („multilocus sequence typing“).

Analiza plazmidnih profila dobijenih iz različitih sojeva jedna je od prvih genotipskih tehnika koja se primenjivala kod mnogih bakterija pa i salmonela. Kod nekih serotipova kao što su *S. Typhimurium*, *S. Virchow* i *S. Gallinarum* ona se pokazala korisnom u diferencijaciji sojeva, ali kod *S. Enteritidis* koja poseduje mali broj plazmida ova metoda ima ograničenu moć (Rychlik et al., 2000; İçgen et al., 2002). Naime, većina *S. Enteritidis* poseduje svega jedan plazmid virulencije. Neki plazmidi vezani su za određene fagotipove salmonela. Mobilnost i nestabilnost ovih genetičkih elemenata i mogućnost horizontalnog prenošenja među sojevima čine plazmidni sastav sojeva promenljivom karakteristikom koja se mora uzeti sa rezervom prilikom epidemiološke analize.

PFGE metoda bazira se na razdvajanju fragmenata velikih molekulskih težina dobijenih nakon sečenja celokupne DNK bakterije pomoću restrikcionih enzima koji imaju malo restrikcionih mesta u hromozomu. Tokom PFGE smer električnog polja kroz gel se periodično menja (pulsira) omogućavajući velikim fragmentima efikasniji prolazak kroz pore gela, odnosno razdvajanje. Dobijeni profili su stabilni i reproducibilni. PFGE je visoko standardizovana metoda koja se često koristi za tipizaciju salmonela, a podaci se mogu uporediti u PulseNet bazi. Enzimi koji su dali najbolje rezultate u u tipizaciji *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* i *S. Hadar* su *XbaI* i *BlnI* (Tassios et al., 1997; Ling et Wang, 2001; Cardinale et al., 2005; Xia et al., 2009; Vaz et al., 2010; Zou et al., 2010; Zheng et al., 2011). Nedostatak metode je dugotrajna i komplikovana procedura koja zahteva specijalizovanu opremu.

Hibridizacione tehnike genotipizacije se zasnivaju na sečenju celokupne DNK restrikcionim enzimima, razdvajanju fragmenata po veličini elektroforezom, otiskivanju dobijenih profila na nitroceluloznu ili najlonsku membranu i sledstvenoj hibridizaciji sa obeleženim DNK probama u cilju otkrivanja polimorfnih regiona DNK. Varijacije u broju i veličini hibridizovanih fragmenata odražavaju genetičke razlike među sojevima. Za tipizaciju salmonela korišćene su DNK probe za detekciju insercionih sekvenci IS200 koje su nađene kod skoro svih serotipova salmonela, ali sa nedovoljnom diskriminativnom moći za *S. Enteritidis*, *S. Hadar* i *S. Virchow*, a samo sa umerenom

diskriminativnom moći za *S. Typhimurium* i *S. Infantis* (Liebana, 2002). Ribotipizacija ili hibridizacija sa DNK probom za detekciju *rrn* operona dala je kontradiktorne rezultate u različitim tipizacionim studijama, pogotovo kada je *S. Enteritidis* u pitanju i zavisi umnogome od izbora restrikcionog enzima. Automatizovana ribotipizacija koristi sistem koji analizira genomske fragmente generisane restrikcionom digestijom *rrn* operona (De Cesare et al., 2001). Iako su metode RFLP reproducibilne i lako se interpretiraju, nedostatak im je što su komplikovane i skupe.

RAPD-PCR tipizacija se bazira na korišćenju pojedinačnog kratkog prajmera (oko 10 nukleotida) nasumične sekvence koji hibridizuje sa dovoljnim afinitetom sa hromozomalnom DNK na niskim temperaturama vezivanja („low-stringency“ PCR) (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Ako su susedna mesta vezivanja prajmera dovoljno blizu (nekoliko kilobaza), biće moguće PCR umnožavanje fragmenata između prajmera. Razlike u broju i pozicijama vezivanja nasumičnih prajmera odraziće se na dužine umnoženih fragmenata. Dobijeni fragmenti različite dužine se razdvajaju elektroforezom u agaroznom gelu i čine jedinstveni profil izolata koji služi za tipizaciju. Izbor odgovarajućih prajmera koji daju reproducibilne profile i optimizacija uslova PCR reakcije su presudni za povećanje diskriminatorne moći ove metode. Problemi sa reproducibilnošću i ponekad teškoća interpretacije, odnosno razlikovanja artefakata od stvarnog polimorfizma, su ograničenja RAPD PCR-a. Zbog lakoće izvođenja i brzine dobijanja rezultata metoda je intenzivno korišćena u tipizaciji salmonela, naročito *S. Enteritidis* gde je kombinacija pojedinih RAPD prajmera dala dobre rezultate (López-Molina et al., 1998).

ERIC-PCR tipizacija je bazirana na korišćenju prajmera u okviru enterobakterijskih repetitivnih sekvenci od 126 bp koje se u vidu konzervisanih palindromskih ponovaka nalaze na više mesta na hromozomu. Varijabilnost broja i pozicija ovih sekvenci odraziće se na broj i veličinu umnoženih fragmenata. Metoda je dosta korišćena u tipizaciji salmonela, ali sa ograničenom diskriminativnom moći (Weigel et al., 2004; Oliveira et al., 2007)

AFLP je metoda koja kombinuje sečenje DNK sa dve vrste restrikcionih enzima (koji često seku i koji retko seku), ligaciju specifičnih adaptera i PCR amplifikaciju pomoću selektivnih prajmera. Umnoženi fragmenti se razdvajaju na akrilamidnim gelovima za sekvenciranje. Kada je AFLP korišćena u tipizaciji salmonela diskutabilna

je mogućnost interpretacije genetičkih razlika u profilima i nedovoljna diskriminativnost (Chansiripornchai et al., 2000).

PCR-ribotipizacija se bazira na umnožavanju intergenskih 16S-23S regiona *rrn* ribozomalnih operona. Genom salmonele ima 7 *rrn* operona sa različitim stepenom polimorfizma koji se detektuje ili direktnom analizom umnoženih produkata ili nakon digestije restrikcijom enzimima (del Cerro et al., 2002).

„Microarray“ genotipizacija ili CGH („comparative genomic hybridization“) omogućava detekciju prisustva ili odsustva više hiljada gena na osnovu hibridizacije sa specifičnim probama na „microarray“ pločici i tako se otkriva polimorfizam kroz ceo genom (Majtan et al., 2007; Betancor et al., 2010; Huehn et al., 2010).

U novije metode mogu se svrstati i fenotipske metode koje diferenciraju sojeve na osnovu nivoa ekspresije pojedinih gena, odnosno osobina koje kodiraju, kao što su pokretljivost, invazivnost, preživljavanje u albumenu, virulencija (Yim et al., 2010). „Microarray“ fenotipizacija ili PM („phenotype microarray“) može da detektuje mnoštvo fenotipskih osobina, na primer minimalne inhibitorne koncentracije za 240 antibiotika istovremeno (Morales et al., 2005; Guard-Bouldin et al., 2007).

MLVA metoda koristi prirodnu varijabilnost u broju tandemskih DNK ponovaka na VNTR („variable number tandem repeats“) lokusima. Ovakvih lokusa ima više u bakterijskim genomima i sastavljeni su od različitog broja kratkih ponovaka (6 ili više baznih parova). Umnožavanjem VNTR lokusa pomoću PCR-a i preciznim određivanjem veličine fragmenata putem automatizovane kapilarne elektroforeze, moguće je odrediti varijacije u pogledu broja ponovaka kod različitih sojeva. Uz specijalizovanu opremu, metoda se pokazala kao brza i reproducibilna i zadovoljavajuće diskriminativna u tipizaciji salmonela, posebno serotipova. *S. Typhimurium* (Larsson et al., 2009) i *S. Enteritidis* (Heck, 2009; Parker et al., 2010; Hopkins et al., 2011).

MLST analiza je zasnovana na poređenju sekvenci sa više varijabilnih genskih lokusa koji su umnoženi PCR-om i sekvencirani. MLST metoda je ređe primenjivana za tipizaciju salmonela, ali je kod *S. Enteritidis* pokazala bolju diskriminativnu moć nego PFGE i fagotipizacija (Kotetishvili et al., 2002).

1.5.2. Epidemiološki trendovi salmoneloza u svetu

Infekcije salmonelama su široko rasprostranjene u svetu. Ipak, s obzirom da su infekcije salmonelama vezane za konzumaciju kontaminirane vode i hrane, veći broj slučajeva se javlja u nerazvijenim zemljama i u zemljama u razvoju. Poslednje studije procenjuju da u svetu od gastroenteritisa uzrokovanog salmonelama godišnje oboli 93.8 miliona ljudi, sa 155000 smrtnih slučajeva. Salmonela je najčešći bakterijski uzročnik oboljenja uzrokovanih hranom u SAD, uzrokujući oko 44% potvrđenih bakterijskih infekcija hranom, a u Evropi je odmah iza *Campylobacter* sp. Oko 1% infekcija zahteva hospitalizaciju (Hoelzer et al., 2011).

S. Enteritidis i *S. Typhimurium* su serotipovi koji najčešće izazivaju salmoneloze kod ljudi. Kada je epidemiologija salmoneloza u pitanju, od druge polovine 20 veka zabeleženo je nekoliko trendova:

1. Pandemija *S. Enteritidis*, vezana prvenstveno za konzumaciju kokošijih jaja.

Od početka osamdesetih godina beleži se dramatičan porast učestalosti infekcija *S. Enteritidis* u Evropi i širom sveta. Do 1990. godine u SAD i do 1993. godine u Evropi *S. Enteritidis* je već bila najčešće izolovani serotip (1963. godine serotip *Enteritidis* je bio tek na šestom mestu po učestalosti u SAD). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije 1995. godine među 191 zemljom članicom tri najčešća serotipa su bila *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. Typhi* (76.1% svih registrovanih slučajeva). U Evropi gde nema endemskih infekcija sa *S. Typhi*, najučestaliji serotipovi su *S. Enteritidis* (64.5%), *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* i *S. Newport* (ECDC, 2010). Postoji više mogućih objašnjenja za pandemiju serotipa *S. Enteritidis* (Velge et al., 2005): asimptomatsko kliconoštvo kod pilića i sledstveno brzo širenje u jatima kontaminacijom okruženja putem fecesa; teškoća da se detektuje kontaminacija jaja do praga od log 9.0 bakterija po jajetu; praksa u načinu uzgoja na farmama – veliki broj jedinki različitog uzrasta na farmama; ukidanje hrane dok se koke nosilje mitare što dovodi do povećane osetljivosti koka na infekciju *S. Enteritidis*; nedovoljna dezinfekcija i primena higijensko-sanitarnih mera; kontaminirana voda i hrana uzrokuju da jata bivaju inficirana uglavnom direktno iz okruženja na farmi; globalizacija trgovine živinom, jajima i pilećim mesom koja dovodi do međunarodnog klonalnog širenja pojedinih sojeva; glodari kao rezervoar *S. Enteritidis* na farmama; istrebljenje *S. Gallinarum* kod

živine koje je oslobodilo ekološku nišu omogućivši prodor *S. Enteritidis* u živinarska jata (budući da *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* dele imunodominantni antigen O9, matematički modeli predviđaju da koegzistencija dva serotipa inicira kompeticiju gde će lakše prenosiva bakterija eliminisati drugu iz populacije domaćina, odnosno zauzeće ekološku nišu) (Rabsch et al., 2001); sticanje novih faktora virulencije - indikativno je da je *S. Enteritidis* u ekspanziji jer je povezana skoro isključivo sa novim izvorom hrane, kokošijim jajima. *S. Enteritidis* je za razliku od drugih serotipova stekla nove gene (čak 25 ih je identifikovano) koji joj omogućavaju efikasniju infekciju reproduktivnih organa kokošaka sa jedne strane, i bolje preživljavanje antimikrobnih supstanci u belancetu sa druge strane (Lu et al., 2003; Clavijo et al., 2006; Gantois et al., 2008; Van Immerseel, 2010).

2. Epidemija *S. Typhimurium* rezistentne na više antibiotika naročito fagotipa DT104.

3. Pojava i širenje sojeva *Salmonella* sa smanjenom osetljivošću na fluorohinolone ili rezistencijom na ovu grupu antibiotika.

4. Pad broja obolelih od salmoneloza uopšte kao posledica povećane informisanosti konzumenata i primene programa kontrole salmonela na farmama i u procesu proizvodnje (EFSA and ECDC, 2011a); prema nekim autorima pad predstavlja privremenu fluktuaciju (Velge et al., 2005).

5. Epidemija *S. Kentucky* ST198 sa visokom rezistencijom na ciprofloksacin (Le Hello et al., 2011).

6. Epidemija *S. Paratyphi* B varijetet Java među pilićima u više evropskih zemalja (Gobin et al., 2011).

1.5.3. *Epidemiološki trendovi salmoneloza kod ljudi u Vojvodini i Južnobačkom okrugu*

Crevne zarazne bolesti u Vojvodini već godinama zauzimaju drugo mesto po učestalosti, odmah iza respiratornih bolesti (IZJZV, 2006; IZJZV, 2007; IZJZV, 2008; IZJZV, 2009; IZJZV, 2010; IZJZV, 2011). Za većinu crevnih zaraznih bolesti se ne otkrije uzročnik, već se prijavljuju pod dijagnozama dijareja i gastroenteritis verovatno infektivne etiologije, odnosno bakterijske crevne infekcije neutvrđenog uzročnika (Diarrhoea et gastroenteritis, causa infectionis suspecta/Infectio intestinalis bacterialis

non specificata) ili bakterijska trovanja hranom (Intoxicatio alimentaria bacterialis). Od bakterijskih uzročnika crevnih zaraznih bolesti, najčešći je *Salmonella* sp., ispred *Clostridium difficile*, *Campylobacter* sp., *Shigella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, itd. Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti Instituta za javno zdravlje Vojvodine, salmoneloze među ljudima u Vojvodini pokazuju trend opadanja od 2003. godine. Trend opadanja govori sa jedne strane o boljoj kontroli uzgoja na farmama, proizvodnje i prometa mesa i primeni higijensko-sanitarnih mera u ovim procesima, i sve zastupljenijoj primeni HACCP standarda za zdravstvenu bezbednost hrane u Vojvodini, te je manja verovatnoća da kontaminirane namirnice dođu do konzumenata. Sa druge strane, značajna je i prosvećenost stanovništva o rizicima korišćenja termički neobrađenih jaja i pilećeg mesa, kao i poboljšanje higijensko-epidemioloških navika i uslova kod stanovništva na području Vojvodine.

Za epidemije izazvane salmonelama u Vojvodini karakteristično je širenje alimentarnim putem i to uglavnom u porodicama. Najčešće su alimentarne epidemije bile posledica primarne kontaminacije namirnica životinjskog porekla (jaja, meso). Pored porodičnih epidemija, zabeležene su i epidemije u restoranima društvene ishrane, ugostiteljskim objektima, privatnim poslastičarskim radnjama. U poslednjih 6 godina salmonele su izazvale septikemije odnosno težak sistemski oblik oboljenja kod 25 ljudi, a 4 osobe su umrle od posledica infekcije salmonelom. Salmoneloze najviše pogađaju decu do 10 godina (44.4% slučajeva), a najviša specifična incidenca je među decom do 5 godina 178.2/100000 i 16 puta je veća od incidence kod ljudi starijih od 60 godina. Sa epidemiološkog aspekta kao rezervoari zaraze opasnost predstavljaju i kliconoše. Godišnje se u Vojvodini otkrije u proseku 46 slučajeva kliconoštva utvrđenog nakon preležanog oboljenja ili pri zdravstvenim pregledima osoba koje podležu sanitarnom nadzoru. Broj salmoneloza dostiže svoj maksimum tokom letnjih meseci, kada je razmnožavanje salmonela u hrani ubrzano, a minimum je zimi.

Na teritoriji Južnobačkog okruga među salmonelama identifikovanim do nivoa serotipa, u periodu 2005.-2010. iz godine u godinu serotip Enteritidis dominira kao uzročnik salmoneloza u preko 80% slučajeva svake godine. U 4 od 6 godina *S. Typhimurium* je bila druga, sa učestalošću od 1.5 do 2%. Godine 2006. na drugom mestu je bila *S. Agona* (3.2%), a 2008. *S. Senftenberg* (1.9%), verovatno kao posledice klonalnog širenja odnosno epidemije, što je i potvrđeno u slučaju *S. Senftenberg*.

1.6. Antibiotско lečenje infekcija uzrokovanih salmonelama

Gastroenteritis uzrokovan salmonelama obično ne zahteva lečenje antibioticima, već samo nadoknadom tečnosti i elektrolita. Međutim, u nerazvijenim zemljama salmoneloze su obično praćene visokom incidencom invazivnih oboljenja koja izazivaju visok mortalitet i u tim slučajevima neophodna je antibiotska terapija. U razvijenim zemljama češći je gastroenteritis koji je obično izazvan netifusnim *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*. Gastroenteritis pogađa ljude svih uzrasta, iako je incidenca najviša kod dece. Ali u slučaju invazivne salmoneloze, bakterijemije, kao i kod svih rizičnih grupa kao što su imunokompromitovani pacijenti, deca, stariji ljudi i ljudi sa drugim osnovnim oboljenjem treba da budu tretirani antibioticima. Izbor su najčešće fluorihinoloni za oralnu upotrebu, sem kod dece ispod 10 godina i trudnica zbog ozbiljnih kontraindikacija. Stoga se deca i trudnice leče cefalosporinima proširenog spektra, kao što je ceftriakson. Ipak, deca koja imaju tifus ili višestruko rezistentnu netifusnu salmonelu se najefikasnije leče fluorohinolonima. Fluorohinoloni se daju i u slučaju produžene ili jake dijareje izazvane salmonelama (Hohmann, 2001).

Kod netifusnih salmonela, nakon preležane salmoneloze, pacijent ostaje kliconoša još četiri do pet nedelja. Dužina kliconoštva zavisi od serotipa, a neke studije pokazuju da terapija antibioticima koji nisu fluorohinoloni produžava kliconoštvo. Eliminacija salmonela iz kliconoša je uvek bila problem, ali je i tu produžen tretman fluorohinolonima (2 do 3 nedelje) davao dobre rezultate (Gunell, 2010). Za lečenje trbušnog tifusa izazvanog *S. Typhi* obavezno se koriste antibiotici. Od 1948. godine do 1970. koristio se hloramfenikol, ali je tada zbog pojave rezistentnih sojeva zamenjen amoksicilinom i kotrimoksazolom. Od osamdesetih godina prošlog veka počeli su da se koriste fluorohinoloni u terapiji tifusa, a danas i cefalosporini proširenog spektra.

1.7. Rezistencija na antibiotike

Antibiotici su jedinstvena grupa lekova koji napadaju mikroorganizme u pacijentu. Interakcija antibiotika i mikrobioma je složen i fluktuirajući odnos koji ima svoju istoriju i evoluciju i samim tim se stalno menja. Interakcija antibiotika i mikrobioma postoji u prirodi od kada postoje i mikroorganizmi i nije posledica

uvođenja prvih antibiotika u medicinsku praksu. U prirodi antibiotici su supstance mikrobnog porekla koje mikroorganizmi luče da bi se odbranili od drugih mikroorganizama u svojoj okolini. Tako i rezistencija na antibiotike postoji u mikrobiološkom svetu oduvek. Ono što se promenilo je to da je masovna upotreba prirodnih i sintetskih antibiotika, u terapijske i profilaktičke svrhe, dovela do pojačanog selektivnog pritiska na svet mikroorganizama i ubrzane evolucije novih mehanizama rezistencije u svetu mikroba. Bakterije mogu brzo da menjaju svoju genetičku osnovu brzim razmnožavanjem, većom stopom mutacija i sticanjem gena za rezistenciju, dovodeći do brze selekcije i ekspanzije rezistentnih sojeva. Optimizam koji je postojao u ranom periodu nakon otkrića antibiotika vrlo brzo je splasnuo pojavom prvih bakterijskih sojeva rezistentnih na antibiotike. Danas postoji više od 15 klasa antibiotika čija su ciljna mesta osnovne fiziološke i metaboličke funkcije bakterijske ćelije. Nijedna klasa nije izbegla pojavu mehanizma rezistencije u bakterijama.

Različite klase antibiotika deluju na različita ciljna mesta u bakterijama: β -laktami (penicilini, cefalosporini), karbapenemi, daptomicin, monobaktami i glikopeptidi (vankomicin i teikoplanin) inhibiraju sintezu ćelijskog zida; makrolidi (eritromicin, klaritromicin i azitromicin), aminoglikozidi (streptomycin, gentamicin, amikacin), klindamicin, hloramfenikol, oksazolidononi, streptogramini, ketolidi, linkozamidi i tetraciklini inhibiraju sintezu proteina; rifampicin inhibira sintezu RNK; fluorohinoloni inhibiraju DNK žirazu, odnosno replikaciju DNK; trimetoprim i sulfametoksazol inhibiraju sintezu folata (Berkowitz, 1995; Levy and Marshall, 2004). Antimikrobna rezistencija je rezultat interakcija između antimikrobnog agensa, mikroorganizama i okruženja gde se nalaze. Antimikrobna rezistencija se može podeliti na urođenu i stečenu. Ako je bakterija urođeno rezistentna, znači da je velika većina sojeva koja pripada toj grupi bakterija, rodu ili vrsti rezistentna na izvesne antibiotike. Budući da se rezistencija prirodno javlja i nasleđuje, ona je predvidiva. Stečena rezistencija nastaje kao rezultat hromozomalnih mutacija ili zadobijanja determinanti rezistencije u vidu strane DNK, tj. nastaje kao rezultat promena u genetičkoj osnovi bakterija. Stečena rezistencija nije karakteristična za većinu sojeva pojedinih vrsta i stoga je nepredvidiva (Gunell, 2010).

Rezistencija na antibiotike može nastati i širiti se u više različitih okruženja. Prvo takvo okruženje bilo bi zajednica mikroorganizama (mikrobiota) u ljudskom ili

životinjskom telu, gde mikroorganizmi dolaze u direktan kontakt sa dejstvom antibiotika. Druga grupa okruženja gde postoji selektivni pritisak primene antibiotika su bolnice, ustanove za dugotrajnu negu i lečenje bolesnika ili starih i farme, gde je veći broj individua u bliskom kontaktu što pospešuje prenos rezistentnih bakterija. Otpadne vode ili druga vrsta biološkog otpada iz bolnica ili sličnih ustanova sa ekstenzivnom primenom antibiotika su takođe pogodno okruženje za selekciju rezistentnih mutanata (Mach and Grimes, 1982). Konačno, pogodno okruženje je i zemljište kontaminirano otpadnim vodama, gde se rezistentne bakterije mešaju sa slobodnoživećim mikroorganizmima i prenose im determinante rezistencije (Gunell, 2010). U prirodnom okruženju životinje koje se hrane uginulim tretiranim životinjama gajenim za ljudsku ishranu takođe su izložene reziduama antibiotika i na taj način se vrši selekcija rezistentnih bakterija i u divljini (Lemus et al., 2008).

Ono što je posebno zabrinjavajuće je da u svakom od ovih okruženja, ne samo patogene, već i nepatogene i komensalne bakterije koje čine normalnu floru ljudi i životinja ili u spoljašnjoj sredini, postaju rezervoari gena rezistencije i doprinose njihovom širenju u svetu mikroorganizama koji nas okružuje i koji je u nama. Znači postoji ne samo klonalno širenje rezistentnih sojeva, već i horizontalno širenje gena rezistencije između različitih vrsta bakterija (Boerlin and Reid-Smith, 2008). Tako je dokazano da su geni rezistencije na antibiotike koji se koriste ili su se koristili samo kod životinja nađeni ne samo među bakterijama u životinjama, nego i u komensalnoj flori kod ljudi, pa i u patogenim zoonotskim bakterijama kao što je *Salmonella* sp. ali i u striktno ljudskim patogenima kao što je *Shigella* sp. (Velge et al., 2005). Rezistencija može biti uzrokovana mnogim mehanizmima kao što su smanjena akumulacija antibiotika, fizička modifikacija ili destrukcija antibiotika, promena ciljnog mesta za delovanje antibiotika, i mehanizam koji podrazumeva aktivni efluks ili izbacivanje više vrsta antibiotika iz bakterije pomoću efluks pumpe (Velge et al., 2005).

Bakterije mogu postati rezistentne na antibiotike pojavom slučajne mutacije na hromozomu i/ili zadobijanjem mobilnih genetičkih elemenata koji nose gene rezistencije kao što su bakteriofazi, plazmidi, transpozoni, integroni, genske kasete ili fragmenti DNK poreklom iz drugih bakterija. Mobilni genetički elementi su sposobni da se ugrađuju u hromozom bakterije domaćina (transpozoni, integroni, bakteriofazi, DNK) ili da egzistiraju samostalno pored hromozoma (plazmidi, genske kasete), kao i

da „skaču“ sa plazmida na hromozom i obrnuto (transpozoni, integri, genske kasete). Nije retko da mobilni genetički elementi nose vezane različite gene rezistencije i uzrokuju rezistenciju domaćina na više antibiotika istovremeno (White et al., 2001). Mobilni genetički elementi su odgovorni za horizontalno širenje gena rezistencije u raznorodnoj bakterijskoj populaciji. Horizontalno širenje gena, odnosno prelazak iz jedne bakterije u drugu može se desiti putem konjugacije, transdukcije i transformacije. Konjugacija je proces prenosa plazmida iz jedne bakterijske ćelije u drugu preko seks pilusa uz istovremenu replikaciju plazmida, tako da i recipijentna i donorska ćelija završe sa kopijom plazmida. Geni rezistencije na plazmidu se tako mogu eksprimirati u novom recipijentu. Transdukcija je prenos DNK iz bakterije u bakteriju putem faga. Prilikom transdukcije fazi koji su inficirali bakterijsku ćeliju mogu slučajno da upakuju male segmente domaćinske DNK za vreme virusnog reproduktivnog procesa i ubace ga u sledeću bakterijsku recipijentnu ćeliju koju inficiraju. Ova DNK koja može sadržati gene rezistencije može da se ugradi u hromozom i eksprimira. Transformacija je proces uzimanja, integracije i ekspresije strane slobodne DNK u bakteriji. DNK molekuli sa genima rezistencije se mogu naći u okruženju poreklom od raspadajućih ili oštećenih ćelija i virusa (Foley et Lynne, 2008). Zadobijanje gena rezistencije transformacijom karakteristično je za svega nekoliko Gram-pozitivnih vrsta bakterija (Livermore, 2003).

Obično je mutacija na hromozomu odgovorna za niži nivo rezistencije ili smanjenu osetljivost, a geni na mobilnim genetičkim elementima (prenosivi geni) su odgovorni za visok nivo rezistencije. Najčešće nije dovoljna mutacija samo na jednom mestu da bi se dobio visok nivo rezistencije, već je to proces nakupljanja više genetičkih događaja (hromozomalne mutacije udružene sa prenosivim genima rezistencije) koji korak po korak dovode od niskog nivoa (smanjene osetljivosti) do visokog nivoa rezistencije. Tako je nastala rezistencija na penicilin i tetracikline kod *Neisseria gonorrhoeae* i rezistencija na fluorohinolone kod pripadnika *Enterobacteriaceae*. Hromozomalni mutanti *Staphylococcus aureus* intermedijerno rezistentni na vankomicin su se pojavili kao odgovor na upotrebu vankomicina, ali su za njima usledili sojevi sa visokim nivoom rezistencije koji su zadobili transpozonsku rezistenciju od vankomicin-rezistentnog enterokoka. Malo povećanje minimalnih inhibitornih koncentracija na antibiotik bi trebalo da upozori kliničke mikrobiologe na preteću rezistenciju. Iako je još u domenu osetljivog, soj sa smanjenom osetljivošću ukazuje na

eventualnu pojavu sojeva sa višim nivoom rezistencije što bi trebalo da bude indikacija za izbegavanje dalje upotrebe tog antibiotika u datoj sredini.

Dugotrajna upotreba jednog antibiotika (više od 10 dana) može da selektuje bakterije koje su rezistentne ne samo na taj antibiotik nego i na nekoliko drugih („multidrug resistant“ - MDR sojevi). Sklonost bakterija da akumuliraju više determinanti rezistencije je karakteristična za produženu upotrebu tetraciklina kod infekcija urinarnog trakta i za tretman akni kod ljudi. Pod stalnim selektivnim pritiskom, osetljiva crevna flora ili flora kože bivaju kolonizovane mikroorganizmima koji su rezistentni ne samo na tetraciklin, već i na druge nesrodne antibiotike zbog udruživanja gena rezistencije na mobilnim genetičkim elementima koji se prenose u bloku na druge bakterije. Tako selekcija gena rezistencije na jedan antibiotik dovodi do selekcije drugih gena koji su blisko vezani uz taj gen. Sa ekološke tačke gledišta, ako celu populaciju u nekom okruženju (bolnica, dom za negu starih i nemoćnih, farma,...) tretiramo istom klasom antibiotika, osetljivi sojevi će imati malo mogućnosti da rekolonizuju svoju nišu i rezistentni sojevi će steći važnu prednost. Rezultujuća ekološka neravnoteža proizvešće potencijalno opasni spektar gena rezistencije koji ulaze u to okruženje. Pojedini MDR sojevi predstavljaju globalan svetski problem po bolnicama: *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*. U zemljama u razvoju dodatan problem predstavljaju i MDR sojevi *Shigella flexneri*, *S. Enteritidis* i *Vibrio cholerae*. U SAD 40-60% sojeva *Staphylococcus aureus* su meticilin rezistentni (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* - MRSA), koji su rezistentni i na većinu ostalih antibiotika. Sem u humanoj medicini, upotreba antibiotika kod životinja gajenih za ljudsku ishranu i u poljoprivredi (profilaktičko zaprašivanje voćaka antibioticima) značajno doprinosi generalnom problemu rezistencije bakterija kod ljudi. Iako je u Evropskoj Uniji zabranjena, primena subterapijskih doza antibiotika kao promotera rasta u SAD je dozvoljena, ali pod kontrolisanim uslovima. Poznato je da ovakva primena vrlo brzo selektuje rezistentne sojeve bakterija kod životinja. Najveći uticaj na pojavu rezistencije bakterija kod ljudi ima selekcija MDR sojeva crevnih bakterija koje se mogu preneti sa životinja na ljude: *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Listeria* sp., enterokoka i nekih sojeva *E. coli*.

Prilikom lečenja bakterijskih infekcija, osetljivost na pojedine antibiotike je ključna u izboru terapije. Potpuna rezistencija bakterije na neki antibiotik znači da je taj lek beskoristan u lečenju bilo koje infekcije uzrokovane tom bakterijom. Ako je bakterija osetljiva ili sa smanjenom osetljivošću, važno je razmotriti koji lek izabrati i u kojoj terapijskoj dozi. Ovo zavisi od farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava leka. Prema načinu dejstva na bakterije antibiotici se dele na vremenski i koncentracijski zavisne. Fluorohinoloni spadaju u koncentracijski zavisne antibiotike i stoga se preporučuje davanje visokih doza antibiotika u kratkom periodu.

1.7.1. Testiranje osetljivosti na antibiotike

Određivanje osetljivosti na antibiotike je neophodno za uspešno lečenje bakterijskih infekcija. Osetljivost na antibiotike se može testirati pomoću više klasičnih metoda: disk-difuzioni test na agar podlozi, agar-dilucioni test, bujon-dilucioni test, E-test, mikrodilucioni test u mikrotitar pločama. Postoji više standarda koji propisuju način izvođenja ovih testova i interpretaciju rezultata, a u najširoj upotrebi su američki CLSI standard (Clinical and Laboratory Standards Institute) i evropski EUCAST standard (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing). Mnoge zemlje primenjuju CLSI standard, između ostalog i kliničke mikrobiološke laboratorije u našoj zemlji, ali sve više zemalja Evropske Unije prelazi na EUCAST standard. EUCAST je udružio šest evropskih standarda i harmonizovao granične vrednosti osetljivosti na antibiotike. Pomenutim standardnim metodama određuje se osetljivost bakterija *in vitro*. Međutim, dešava se da su neki izolati osetljivi na antibiotik *in vitro*, a on nema efikasnost u *in vivo* uslovima. Zato je za kliničare važna interpretacija rezultata testiranja, koja zavisi i od kliničke efikasnosti antibiotika. Prema svojoj osetljivosti na antibiotike, bakterije se mogu svrstati u osetljive (S), intermedijerne (I) i rezistentne (R). Prema evropskom konsenzusu, kategorija osetljivog se odnosi na nivo antimikrobne osetljivosti koji rezultira visokom verovatnoćom uspeha u terapiji, intermedijaran je nivo osetljivosti koji je povezan sa neizvesnim terapijskim efektom i rezistentan je nivo osetljivosti koji rezultira verovatnim terapijskim neuspehom (Brown et MacGowan, 2010). Da bi se odredile granice između ove tri kategorije, neophodno je odrediti minimalne inhibitorne koncentracije leka (MIC). Minimalna inhibitorna koncentracija

leka za datu bakteriju je najmanja koncentracija koja dovodi do inhibicije rasta bakterija u *in vitro* uslovima. Ova vrednost govori o efikasnosti leka protiv tog soja bakterija.

1.7.2. Rezistencija *Salmonella enterica* subspecies *enterica* na antibiotike

Kod *Salmonella enterica* subspecies *enterica* rezistencija na antibiotike javljala se paralelno u više serotipova na različite ili slične antibiotike, u zavisnosti kakvom selektivnom pritisku su ti serotipovi izloženi. *S. Typhi*, koja je isključivo ljudski patogen i izaziva sistemske infekcije, bila je intenzivno lečena hloramfenikolom od 1948. godine, sve dok se nisu pojavili sojevi rezistentni na ovaj lek sedamdesetih godina. Tada su u terapiju trbušnog tifusa uvedeni amoksicilin i kotrimoksazol. Prvi izolati rezistentni na sva tri leka su se pojavili osamdesetih godina prošlog veka u Jugoistočnoj Aziji, Africi i Indiji, pa je ciprofloksacin postao lek izbora za tifus. Uskoro su se u Indiji (1996.) i Jugoistočnoj Aziji (Vijetnam 1997, Tadžikistan 1998.) pojavili sojevi *S. Typhi* rezistentni na nalidiksičnu kiselinu i smanjene osetljivosti na fluorohinolone, što je ugrozilo i ovaj izbor terapije u endemskim područjima. Rezistentni sojevi počeli su da se pojavljuju i u drugim zemljama gde *S. Typhi* nije endemska, kao uvezeni slučajevi, na primer u Francuskoj (Launay et al., 1997). U Velikoj Britaniji kod povratnika sa indijskog potkontinenta 2000. godine trećina izolata *S. Typhi* imala je smanjenu osetljivost na ciprofloksacin udruženu sa rezistencijom na hloramfenikol, ampicilin i trimetoprim (Threlfall et al., 2001). Prvi nalaz *S. Typhi* rezistentne i na nalidiksičnu kiselinu i na ciprofloksacin objavljen je 2007. godine u Indiji (Kownhar et al., 2007). Zbog rezistencije na hinolone, tifus se može lečiti cefalosporinima proširenog spektra.

Višestruka rezistencija na antibiotike kod netifusnih salmonela ima poreklo iz drugog izvora. S obzirom da se netifusni serotipovi prenose sa životinja na ljude preko hrane, izvore MDR determinanti treba tražiti u životinjskim domaćinima. Mnogi sojevi različitih serotipova salmonela ispoljavaju višestruku rezistenciju na tetracikline, sulfonamide, streptomycin, kanamicin, hloramfenikol i neke β -laktame (peniciline i cefalosporine). Dokazano je da su plazmidi koji nose rezistenciju na više antibiotika uobičajeni među salmonelama i da su ti geni često grupisani u integrone. Integroni kod salmonela mogu da nose gene za rezistenciju na hloramfenikol, sulfonamide,

tetracikline i streptomycin. Uobičajeni nosioci gena rezistencije, integroni klase jedan, koji su česti kod mnogih bakterijskih vrsta, nađeni su i kod salmonela (Rao et al., 2008). Integroni klase jedan sadrže gen koji kodira enzim integrazu (*intI*), mesto rekombinacije (*attI*) i kasetu gena sa genima rezistencije i *attC* mestom za prepoznavanje i mobilizaciju prilikom rekombinacije. Integron može da se ubacuje u hromozom, u transpozone, da biva prenesen sa plazmidom u drugog domaćina i tako se širi u bakterijskoj populaciji, prenoseći višestruku rezistenciju u bloku među salmonelama i drugim mikroorganizmima (Foley and Lynne, 2008).

Kao što je pomenuto, jedan od dominantnih trendova u epidemiologiji salmonela je i ekspanzija višestruko-rezistentnih *S. Typhimurium* u svetu. Rezistencija na više antibiotika postala je uobičajena među izolatima *S. Typhimurium* 1960-tih godina, ali je veliki porast usledio 1990-tih. Problem pojave multirezistentne *S. Typhimurium* među govedima u Engleskoj i Velsu 60-tih godina prošlog veka vezan je za početak intenzivnog uzgajanja goveda na farmama i intenzivne trgovine govedima u ovim područjima. To je dovelo do epidemije fagotipa DT 29 kod ljudi i goveda 1962-64. godine. Za vreme te epidemije životinje su intenzivno lečene raznim antibioticima, što je dovelo do pojave višestruke rezistencije *S. Typhimurium* kod goveda na 8 grupa antibiotika (Rabsch et al., 2001). Od tada u svetu dolazi do stalnog porasta učestalosti višestruko rezistentne *S. Typhimurium* iako se fagotipovi smenjuju u dominaciji. Razlozi za smenjivanje dominacije različitih klonova višestruko rezistentne *S. Typhimurium* nisu sasvim jasni. Po nekima je to vezano za međunarodnu trgovinu govedima, a po drugima za horizontalni transfer gena virulencije putem fagne transdukcije među različitim fagotipovima. Trenutno je od 1990-tih dominantan fagotip DT104 u Velikoj Britaniji, Nemačkoj, Holandiji, Ujedinjenim Arapskim Emiratima, Filipinima, SAD. Dokazano je da je u pitanju klonalno širenje jednog epidemijskog soja prvo kod divljih ptica, zatim kod goveda, a zatim i ostalih životinja gajenih za ljudsku ishranu – živine, svinja i ovaca. Kod prvih izolata DT104 rezistencija je bila ograničena na 5 antibiotika: ampicilin, hloramfenikol, streptomycin, sulfonamide i tetraciklin. Ali do 1990-tih *S. Typhimurium* je zadobila još i rezistenciju na tri grupe lekova: trimetoprim-sulfametoksazol, ciprofloksacin i cefalosporine proširenog spektra (Threlfall et al., 2000). Kada su u pitanju druge *S. Typhimurium*, novi MDR tipovi obično uključuju horizontalni transfer gena rezistencije putem plazmida. Nasuprot tome,

kod DT104 rezistencija je kodirana hromozomalnim genima. MDR profil koji uključuje rezistenciju na sedam antibiotika (ampicilin, hloramfenikol, florfenikol, streptomycin, spektinomycin, sulfametoksazol i tetracikline) je kodiran grupom gena smeštenom na hromozomalnom genomskom ostrvu koje se zove *Salmonella* genomsko ostrvo (SGI1 – „*Salmonella* genomic island 1“). Ovo ostrvo blizu svog 3' kraja sadrži integron klase 1, koji je nosilac kasete pomenutih gena rezistencije. Štaviše, otkriveno je da je došlo do horizontalnog transfera SGI1 u druge serotipove salmonela, gde su ova ostrva takođe nađena na istom mestu u hromozomu *S. Agona*, *S. Paratyphi B*, *S. Albany* i *S. Newport* (Velge et al., 2005).

Sa terapijske tačke gledišta svakako najveću zabrinutost izaziva širenje rezistencije salmonela na fluorohinolone i cefalosporine proširenog spektra. Od pojave MDR *S. Typhi* i *S. Typhimurium* DT104, ciprofloksacin i drugi oralni hinoloni su počeli da se koriste kao alternative za prethodne antibiotike prve linije. Danas je već kod mnogih serotipova zabeležena smanjena osetljivost, ali i rezistencija na fluorohinolone. *Salmonelle* i *E. coli* rezistentne na cefalosporine proširenog spektra su postale globalni problem. Pre 1996. godine rezistencija na cefalosporine proširenog spektra je bila izuzetno retka kod salmonela, a 2000. godine u SAD se pojavila salmonela sa plazmidski prenosivom CMY-2 AmpC β -laktamazom. Za dve godine CMY-2 cefalosporinska rezistencija je detektovana kod salmonela u Kanadi, Španiji, Rumuniji, Tajvanu. Budući da su sojevi sa CMY-2 rezistencijom izazivali epidemije povezane sa goveđim mesom, a da su detektovani i među govedima, pretpostavlja se da je rezistencija selektovana korišćenjem ceftiofura u lečenju goveda. Ceftiofur je cefalosporin proširenog spektra koji se koristi u veterinarskoj medicini, a rezistencija podrazumeva i unakrsnu-rezistenciju na ceftriakson koji se koristi u humanoj medicini. Uskoro su nađene i *salmonelle* sa plazmidski determinisanim CTX-M i drugim β -laktamazama, pa i soj rezistentan na imipenem (Armand-Lefèvre et al., 2003; Batchelor et al., 2005; Weill et al., 2004). Plazmidi koji nose rezistenciju na β -laktame povrh toga mogu kodirati i rezistenciju na druge antibiotike kao što su aminoglikozidi, fenikoli, tetraciklini i sulfonamidi. Primena bilo kojeg od ovih antibiotika favorizuje očuvanje pomenutih plazmida u bakterijama (Velge et al., 2005).

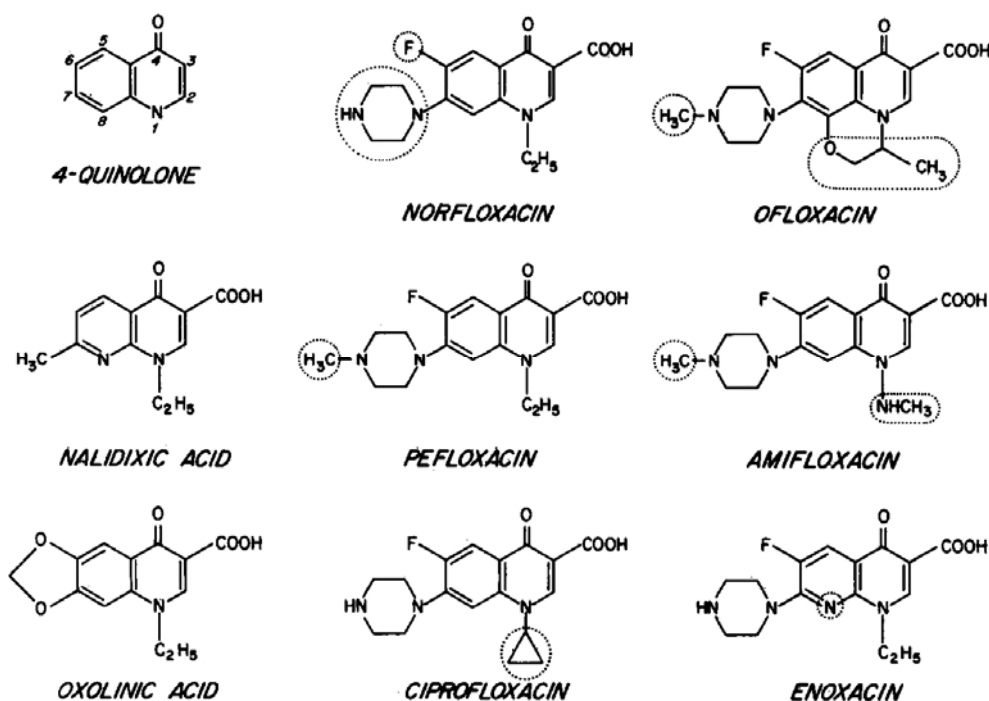
1.7.3. Rezistencija na hinolone

1.7.3.1. Hinolonski antibiotici

Prvi hinolon, nalidiksična kiselina, je sintetisan 1962. godine od strane Leshera i saradnika, kao sporedni proizvod sinteze antimalarika hlorokvina. Ovaj lek bio je korišćen za lečenje urinarnih i crevnih infekcija izazvanih bakterijama iz porodice *Enterobacteriaceae*. U 1970-tim godinama sintetisano je još nekoliko hinolona prve generacije - pipemidinska kiselina, oksolinična kiselina i cinoksacin. Zatim se otkrilo da dodatkom piperazina na C6 i fluora na C7 na osnovni 4-okso-1,4-dihidrohinalon skelet dobija 1000 puta veća antimikrobna aktivnost i prošireni spektar delovanja. Bakterije koje su urođeno rezistentne na nalidiksičnu kiselinu su bile osetljive na novu grupu hinolonskih antibiotika - fluorohinolone. Tako su 80-tih godina pefloksacin, norfloksacin, ciprofloksacin, enoksacin i ofloksacin uvedeni u kliničku upotrebu (Ameyes et Gemmell, 1992). Ciprofloksacin, kao trenutno najčešće korišćen fluorohinolon, je ušao u upotrebu 1987. godine. Fluorohinoloni se oralno dobro apsorbuju i imaju dobru distribuciju u tkivu i ulaz u fagocite, a koncentracija u urinu prevaizlazi MIC za mnoge patogene bakterije. Sve ove osobine dovele su do brze ekspanzije upotrebe fluorohinolona u humano i veterinarskoj kliničkoj praksi. Hinoloni deluju dobro protiv svih pripadnika familije *Enterobacteriaceae* kao i protiv drugih Gram-negativnih bakterija kao što su *Neisseria* sp., *Haemophilus* sp. i *Pseudomonas aeruginosa*.

Aktivnost hinolona se zasniva na hinolonskim prstenovima. Svi derivati hinolona imaju strukturu od dva vezana prstena gde je azot na poziciji 1, karbonilna grupa (C=O) na poziciji 4 i karboksilna grupa (COOH) vezana za C3 prvog prstena. Dodatak atoma fluora na poziciju 6 centralnog sistema prstena povećava potentnost hinolona i to je osnovna struktura svih fluorohinolona. Potentnost protiv Gram-negativnih bakterija postignuta je dodavanjem piperazinil (ciprofloksacin, norfloksacin, enofloksacin), metil-piperazinil (ofloksacin, lomefloksacin, gatifloksacin) ili dimetil-piperazinil grupe (sparfloksacin) na poziciju 7 prstena. Metil substituenti piperazinskog prstena pojačavaju oralnu dostupnost, a pirolidinil substituenti na poziciji 7 (klinafloksacin) pojačavaju aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija, kao i strukture

dvostrukog prstena koje su derivati pirolidinil prstena (moksifloksacin, sitafloksacin) (Slika 1). Postoji više generacija hinolonskih antibiotika. U prvu generaciju spadaju nalidiksična kiselina i cinoksacin. Oni se danas retko koriste, uglavnom za urinarne infekcije, jer imaju najuži spektar dejstva. Drugoj generaciji pripadaju ciprofloksacin, norfloksacin i ofloksacin. Oni imaju veću sistemsku aktivnost protiv Gram-negativnih bakterija. U novije fluorohinolone spadaju levofloksacin, sparfloksacin, grepafloksacin i trovafloksacin, a u još noviju generaciju gatifloksacin i moksifloksacin, čija je specifičnost da imaju širi spektar dejstva i protiv Gram-pozitivnih bakterija i atipičnih patogena.



Slika 1. Struktura hinolonskih prstenova i nekih hinolonskih antibiotika
(preuzeto od: Wolfson and Hooper, 1985)

Fluorohinoloni se danas leče gastrointestinalne infekcije, respiratorne infekcije, infekcije kože i osteomijelitis. Hinoloni su sintetski antibiotici koji inhibiraju replikaciju DNK u bakterijskim ćelijama. Njihova meta su dva fundamentalna bakterijska enzima, topoizomeraza II (DNK žiraza) i topoizomeraza IV. Ovi enzimi menjaju topologiju DNK molekula. Žiraza je tetramer i sastoji se od dve GyrA i dve

GyrB subjedinice, koje su produkti gena *gyrA* i *gyrB*. DNK žiraza je jedini bakterijski enzim koji može da proizvede negativne supernoje u DNK tako što omotava DNK molekul oko sebe. Superspiralizacija igra važnu ulogu u funkcionisanju bakterija. Ona čini hromozom kompaktnijim, reguliše nivo transkripcije gena i utiče na interakciju bakterije sa svojom okolinom. Negativno superspiralizovana DNK omogućava inicijaciju DNK replikacije. Subjedinica GyrA seče oba lanca DNK istovremeno na razmaku od po 4 baze i drži lance razdvojene, ali vezane kovalentno za enzime. Subjedinica GyrB, koristeći ATP kao energiju, uvodi negativne navoje u lanac, koji subjedinica GyrA zatim ponovo sastavi. DNK žiraza takođe omogućava DNK replikaciju uklanjajući pozitivne superspiralizovane navoje koji se akumuliraju ispred replikacione viljuške. Topoizomeraza IV je strukturno srodna DNK žirazi i takođe se sastoji od 4 subjedinice, po dva produkta gena *parC* i *parE* (homologi genima *gyrA* i *gyrB*). Topoizomeraza IV na kraju DNK replikacije razrešava vezane novoreplikovane DNK molekule i omogućava njihovu segregaciju u ćerke ćelije.

Fluorohinoloni inhibiraju ove enzime stabilizujući ili DNK-DNK-žiraza kompleks ili DNK-topoizomeraza IV kompleks. Stabilizovani DNK-DNK-žiraza kompleks blokira napredovanje replikacione viljuške, uzrokujući da prethodno reverzibilni DNK-enzimski kompleksi sada postanu ireverzibilno vezani. Oštećenje DNK generisanjem dvolančanih prekida u DNK lancu koji se ne popravljaju okida sled događaja koji još nisu do kraja definisani, ali dovode do brze inhibicije DNK sinteze i rezultuju smrću bakterijske ćelije (Gunell, 2010; Hooper, 2000; Pallo-Zimmerman et al., 2010).

Fluorohinoloni pokazuju dobru aktivnost protiv salmonela i stoga se koriste u terapiji infekcija salmonelama. Međutim, navedeni terapijski pristup sve više je kompromitovan širenjem pojave smanjene osetljivosti na fluorohinolone kod raznih serotipova salmonela.

1.7.3.2. Smanjena osetljivost na fluorohinolone

Fenomen smanjene osetljivosti na antibiotik odnosi se na situaciju da, pri trenutno prihvaćenim graničnim vrednostima, izolati pokazuju osetljivost u standardnom antibiogramu, ali nisu potpuno osetljivi, i njihove MIC vrednosti su

značajno više od divljih sojeva. Bakterije sa smanjenom osetljivošću na fluorohinolone su obično visoko rezistentne na nalidiksičnu kiselinu. Stoga je testiranje osetljivosti na nalidiksičnu kiselinu u standardnom antibiogramu odličan pokazatelj za smanjenu osetljivost na ciprofloksacin. Nakon toga bi kao potvrdu za sve izolate rezistentne na nalidiksičnu kiselinu trebalo odrediti MIC na ciprofloksacin.

1.7.3.3. Mehanizmi rezistencije na fluorohinolone

Dok je kod Gram-negativnih bakterija DNK žiraza primarno ciljno mesto za dejstvo hinolona, a topoizomeraza IV sekundarno, kod Gram-pozitivnih bakterija je situacija obrnuta. Stoga su i primarne hromozomalne mutacije odgovorne za rezistenciju kod ovih grupa bakterija na različitim ciljnim mestima. Rezistencija na hinolone nastaje na više načina, kao rezultat jednog ili više različitih mehanizama:

1. Hromozomalne mutacije u genima koji kodiraju DNK žirazu i topoizomerazu IV
2. Smanjenje akumulacije hinolona u bakterijskoj ćeliji kao rezultat smanjene permeabilnosti ili povećane ekspresije efluks pumpe (npr. AcrAB-TolC sistema)
3. Plazmidno determinisana zaštita ciljnih enzima od inhibicije hinolonima (*qnr*)
4. Enzimaska modifikacija ili degradacija fluorohinolona (*aac(6')-Ib-cr*)
5. Aktivna hinolonska efluks pumpa (*qepA*)

Hromozomalne mutacije – modifikacija ciljnih enzima: Izolati rezistentni na hinolone imaju jednu ili više mutacija u tzv. QRDR („quinolone resistance determining region“ – region koji determiniše rezistenciju na hinolone) regionima. U QRDR, u okviru 4 hromozomalna gena koji kodiraju subjedinice DNK žiraze i topoizomeraze IV, se dešavaju najčešće mutacije vezane za rezistenciju na hinolone: *gyrA* (kodoni od Ala67 do Gln106), *gyrB* (kodoni od Ala415 do Ile 470), *parC* (kodoni od Tyr47 do Leu133) ili *parE* (kodoni od Ser450 do Arg528) (Eaves et al., 2004). Granice QRDR regiona ova 4 gena se donekle razlikuju u zavisnosti od autora (Eaves et al., 2004; Hopkins et al., 2005; Kilmartin et al., 2005). Mutacije u QRDR *gyrA* gena se uvek javljaju u osnovi mehanizama rezistencije na hinolone kod Gram-negativnih bakterija, pa i u slučaju *E. coli* i *Salmonella* sp. Ovaj region je visoko konzerviran i lociran je blizu 5' kraja gena, blizu kodona za Tyr122, gde dolazi do privremenog kovalentnog vezivanja za fosfatne grupe DNK u inicijalnoj reakciji presecanja lanaca. Kada se

mutacije dese u QRDR regionu *gyrA* koji obuhvata deo od kodona za Ala67 do Gln106 (Giraud et al., 1999), dolazi do konformacionih promena na mestu vezivanja za DNK što smanjuje afinitet hinolona da se vezuje za ovaj modifikovani kompleks DNK-žiraza. Najčešće su mutacije na kodonima 83 (Ser83) i 87 (Asp87), koje dovode do zamene originalne aminokiseline drugom. Kod *E. coli* i *Salmonella* sp. QRDR regioni su analogni i jedna mutacija u *gyrA* je dovoljna da uzrokuje visok nivo rezistencije na nalidiksičnu kiselinu, i smanjenu osetljivost na fluorohinolone. Za visok nivo rezistencije na fluorohinolone neophodno je postojanje najmanje dve mutacije u QRDR ili van njega ili prisustvo drugih mehanizama rezistencije. Sem na kodonima 83 i 87 i na drugim mestima u QRDR su nađene mutacije (Ala67, Asp72, Gly81, Asp82), a kod salmonela nalažene su i van QRDR regiona *gyrA* (Ala119, Ala131, Glu139 i Asp144) (Eaves et al., 2002). Mutacije koje su nađene do sada u genima za DNK žirazu i topozimerazu IV kod salmonela date su u Tabeli 1 (Hopkins et al., 2005).

Tabela 1. Mutacije hromozomalnih gena koje uzrokuju rezistenciju na hinolone kod salmonela (preuzeto od: Hopkins et al., 2005).

Gen	Pozicija kodona	Supstitucija	Gen	Pozicija kodona	Supstitucija
<i>gyrA</i>	Ala67 →	Pro	<i>gyrB</i>	Tyr420 →	Cys
	Asp72 →	Gly		Arg437 →	Leu
	Val73 →	Ile		Ser464 →	Tyr/Phe
	Gly81 →	Cis/Ser/His/Asp	<i>parC</i>	Thr57 →	Ser
	Asp82 →	Gly/Asn		Thr66 →	Ile
	Ser83 →	Tyr/Phe/Ala		Gly78 →	Asp
	Asp87 →	Asn/Gly/Tyr/Lys		Ser80 →	Arg/Ile
	Leu98 →	Val		Glu84 →	Lys/Gly
	Ala119 →	Ser/Glu/Val	<i>parE</i>	Glu453 →	Gly
	Ala131 →	Gly		Ser458 →	Pro
	Glu139 →	Ala		His461 →	Tyr
	Asp144 →	Asp (tiha mutacija)		Ala498 →	Thr
				Val512 →	Gly
		Ser518 →	Cys		

Kod *E. coli* dominira mutacija Ser83Leu, dok kod salmonela nema dominacije pojedinih mutacija (Eaves et al., 2004). Još uvek je nejasno da li su pojedine mutacije u *gyrA* karakteristične za pojedine serotipove salmonela, jer su mnogi autori pokušali da ustanove ovu vezu. Nađeno je da je mutacija Asp87Asn karakteristična za *S. Typhimurium* DT104 kod ljudi i *S. Hadar* i *S. Montevideo* kod farmskih životinja, Ser83Phe za *S. Typhi* i *S. Paratyphi*; Giraud i saradnici (1999), sugerišu da su mutacije na Ser83 prevalentne kod serotipova Newport, Virchow i Typhimurium, a mutacije na Asp87 kod *S. Hadar* i *S. Kottbus*. Ali prevalentnost pojedinih tipova mutacija kod nekih serotipova može se objasniti i uspešnim širenjem klonova tek nakon zadobijanja mutacije u *gyrA*. Takođe, na prevalencu nekih mutacija može da utiče i izbor fluorohinolona koji ih selektuje. Selekcija sa enrofloksacinom podstiče Ser83Phe mutacije, dok selekcija sa ciprofloksacinom favorizuje Asp87Gly mutacije (Hopkins et al., 2005).

Iako su u *gyrB* genu mutacije retke, nalažene su kod salmonela rezistentnih na fluorohinolone na Ser464 kodonu (Heisig, 1993; Heisig et al., 1995; Giraud et al., 1999), a na Asp426 i Lys447 kod *E. coli* (Pidcock 2002). Kod salmonela i ostalih Gram-negativnih bakterija geni za topoizomerazu IV, *parC* i *parE*, su sekundarna ciljna mesta za hinolone. Mutacije na ovim genima su nalažene ređe nego na *gyrA* i to skoro uvek zajedno sa *gyrA* mutacijama, što znači da se mutirana topoizomeraza IV neće javiti sem ako soj već ima mutiranu žirazu A i smanjenu osetljivost na fluorohinolone. Smatra se da je dodatna mutacija u *parC* ili *parE* drugi korak koji dovodi do visokog nivoa rezistencije na fluorohinolone kod *E. coli* i salmonela (Hopkins et al., 2005). Mutacije na *parC* uključuju Thr57 (Eaves et al., 2004), Ser80 i Glu84 (Hooper, 1999). Kod salmonela su mutacije na ovom genu nalažene i kod izolata iz životinja ili ljudi i kod *in vitro* laboratorijskih mutanata, i one su obično bile udružene sa jednom ili dve mutacije u *gyrA*. Takvi izolati bili su visoko rezistentni na fluorohinolone. Međutim Ling i saradnici (2003) su našli mutante samo sa *parC* mutacijom i oni su bili potpuno osetljivi na fluorohinolone (MIC na ciprofloksacin ≤ 0.06 mg/l). Eaves i saradnici (2004), su pronašli da mutacija Thr57Ser na *parC* čini salmonele osetljivijim na ciprofloksacin od sojeva bez mutacija, ali da ne utiče na rezistenciju na nalidiksičnu kiselinu. Čak i kada se porede *gyrA-parC* dvostruki mutanti sa *gyrA* mutantima, dvostruki mutanti imaju manji MIC na ciprofloksacin. Ovo sugeriše da bi *parC* mutacije mogle biti spontane

kompensatorne mutacije i nisu je našli među izolatima *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. Dublin* u Velikoj Britaniji. Mutacije na *parE* su relativno retke kod enterobakterija pa i salmonela (Giraud et al., 2006; Piddock 2002), ali su nalažene kod više serotipova osim kod *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport* i *S. Dublin* (Eaves et al., 2004). Iako je visok nivo rezistencije kliničkih izolata salmonela na fluorohinolone još uvek retka pojava, sojevi koji su otkriveni nose najmanje dve mutacije u *gyrA* genu, često u kombinaciji sa mutacijama u drugim genima za topoizomerase.

Smanjenje akumulacije hinolona: Rezistencija na hinolone se može dogoditi kao rezultat smanjene permeabilnosti ili preterane ekspresije efluks pumpe koja dovodi do smanjene akumulacije hinolona u bakterijskoj ćeliji. Ulazak malih molekula pa i hinolona u ćeliju se odvija kroz ćelijski zid bakterije putem transporta kroz spoljnu i citoplazmatsku membranu. Promene u bilo kojoj membrani mogu dovesti do smanjenja u akumulaciji hinolona u ćeliji i shodno tome rezistenciji na ove antibiotike. Spoljna membrana sadrži proteine od kojih su sačinjene pore, tzv. porine, kao što su OmpC i OmpF koji formiraju kanale za pasivnu difuziju i omogućavaju rastvorenim supstancama uključujući i antibiotike da uđu u ćeliju. Antibioticima je uglavnom potrebno oko 1-2 minuta da se akumuliraju u ćeliji dok se ne uspostavi ravnoteža koncentracija (Gunell, 2010). Uloga smanjene OmpF ekspresije u rezistenciji salmonela nije jasna, jer nekoliko autora nije našlo korelaciju između smanjene akumulacije hinolona sa smanjenjem ili odsustvom bilo kog Omp porina, dok su dva autora našla takvu korelaciju sa smanjenjem OmpF ekspresije (Hopkins et al., 2005).

Sa druge strane, bakterije su sposobne i za aktivan transport određenih supstanci kao što su antibiotici i druge toksične supstance van ćelije. Za ove procese su odgovorne protonske pumpe („proton motive force“ - pmf) koje generišu transport elektrona u jednom pravcu, a protona u drugom i tako stvaraju gradijent naelektrisanja duž membrane. Protonske pumpe su sposobne za aktivan efluks antibiotika van bakterijske ćelije (Gunell, 2010). Aktivan efluks igra važnu ulogu i u urođenoj i u stečenoj rezistenciji bakterija na antibiotike. Postoje razni sistemi efluks pumpi sa niskom specifičnošću za supstrat, koje su sposobne da eliminišu antibiotike koji pripadaju različitim familijama i kad su eksprimirane u većoj meri, mogu u sadejstvu sa drugim mehanizmima da učine bakterije manje osetljivima ili klinički rezistentnima na više antibiotika istovremeno (Van Bambeke et al., 2010). Kod *Salmonella* sp. povećana

ekspresija AcrAB aktivne efluks pumpe proizvodi smanjenje osetljivosti *S. Typhimurium* na fusidinsku kiselinu, hloramfenikol, tetraciklin, norfloksacin i penicilin-G. Navedene pumpe su aktivne i u sojevima koji su visoko rezistentni na ciprofloksacin (Escribano et al., 2004), tako da se može reći da je AcrAB-TolC sistem jedan od glavnih mehanizama rezistencije na fluorohinolone kod salmonela. AcrAB-TolC sistem pripada familiji RND („resistance-nodulation division“) i sastoji se od AcrB - efluksnog proteina citoplazmatične membrane, AcrA - fuzionog proteina membrane i TolC - spoljnog proteina membrane. AcrAB-TolC sistem je pod preciznom transkripcionom kontrolom i ekspresija pumpi je regulisana na više nivoa. Ova ekspresija je modulirana stresnim uslovima kao i opštim regulatorima MarA, SoxS ili RamA. Pomenuti regulatori kontrolišu ekspresiju mnogih gena u organizmu (MarA kontroliše ekspresiju više od 60 hromozomalnih gena *E. coli*). Pored toga, i lokalni represor, AcrR takođe reguliše *acrAB* gene. Mutacija u bilo kom od ovih regulatornih gena (*marA*, *soxS*, *marR*, *acrR*, *acrS*, *ramA*) može dovesti do povećane ekspresije AcrAB-TolC efluks pumpe i pojačanog izbacivanja antibiotika iz bakterije i time dovesti do rezistencije. *Mar* regulatorni lokus je otkriven u više od 40 serotipova salmonela, a potpuno je sekvenciran kod *S. Typhimurium* (Abouzeed et al., 2008; Sáenz et al., 2004; Kehrenberg et al., 2009; Piddock, 2006).

Plazmidno determinisana zaštita ciljnih enzima od inhibicije hinolonima (*qnr*): Dugo se mislilo da se rezistencija na hinolone neće lako širiti među bakterijama, s obzirom da su prvobitno nađene mutacije bile vezane za hromozomalne gene. Sa druge strane, budući da su rezervoari plazmidno prenosive rezistencije urođeno rezistentne bakterije iz životne sredine, očekivalo se da je horizontalan transfer gena rezistencije na hinolone putem plazmida nemoguć, s obzirom da su hinoloni sintetski antibiotici i ne postoje u prirodi. Međutim, 1994. godine otkriven je mehanizam rezistencije na hinolone lociran na konjugativnom plazmidu kod urinarnog izolata *Klebsiella pneumoniae* u SAD (Martinez-Martinez et al., 1998). Ovaj izolat nosio je plazmid pMG252 koji je pored gena *qnrA1* za rezistenciju na nalidiksičnu kiselinu nosio i gene za rezistenciju na još 12 antibiotika. Sve do 2003. godine plazmidno determinisana rezistencija na hinolone identifikovana je u jednoj *E. coli*, četiri *Klebsiella pneumoniae* i jednoj *Klebsiella* sp. iz Alabame u SAD. Od tada nađeno je više plazmidski prenosivih *qnr* gena - *qnrA* (sa varijantama *qnrA2*, *A3*, *A4*, *A5*), *qnrB*

(sa varijantama *qnrB1*, *B2*, *B3*, *B4*, *B5*), *qnrC*, *qnrS* i *qnrD* (Tran and Jakoby, 2002; Robichek et al., 2006; Cavaco et al., 2009). Qnr tip rezistencije na hinolone nađen je u većini enterobakterija širom sveta, sa izuzetkom *Proteus* sp. i klinički značajnih *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter* sp. Pravo iznenađenje izazvao je nalaz *qnr* gena kod bakterija u prirodnoj sredini i smatra se da potiču iz hromozoma akvatičnih bakterija i algi gde se pretpostavlja da ili regulišu ekspresiju gena ili štite DNK žirazu od nekih toksina (Hernandez et al., 2011; Strahilevitz et al., 2009). Kod salmonela *qnr* geni determinišu smanjenu osetljivost na fluorohinolone, ali su ti sojevi osetljivi na nalidiksičnu kiselinu, te se ne mogu detektovati disk-difuzionom metodom, što predstavlja veliku opasnost jer fenomen ostaje neprepoznat čak i kada se bakterija testira na nalidiksičnu kiselinu (Hakanen et al., 2005). Zasad su *qnr* pozitivne salmonele relativno retke, nađene uglavnom u Aziji – Maleziji, Tajlandu, Tajvanu, Kini, Japanu (Asai et al., 2010; Gunell, 2009; Wu et al., 2008; Xia et al., 2009), ali pojavile su se i u Evropi (Kehrenberg et al., 2006; Cattoir et al., 2007; Hopkins et al., 2008) i SAD (Gay et al., 2006; Sjölund-Karlsson et al., 2009). Svi Qnr proteini pripadaju grupi pentapeptidnih ponavljajućih proteina koji čine bakterije rezistentnima tako što štite DNK žirazu i verovatno i topoizomerazu IV od inhibicije hinolonima. Qnr proteini redukuju vezivanje žiraze za DNK i čak se takmiče sa DNK za vezivanje sa žirazom. Vezujući se za žirazu, oni je sprečavaju da učestvuje u letalnom kompleksu žiraza-isečena DNK-hinolone, ali sa druge strane nije jasno kako ne inhibiraju njenu normalnu aktivnost u procesu replikacije (Robichek et al., 2006). Plazmidno prenosiva rezistencija na hinolone je od posebnog značaja jer plazmidi nose i rezistenciju na mnoge antibiotike smeštene na integronu, pa i na β -laktame proširenog spektra (Cattoir et al., 2007). Koegzistencija na istom plazmidu je i objašnjenje zašto je rezistencija na hinolone visoka kod nekih ESBL („extended spectrum β -lactamase“) produkujućih izolata. S obzirom da su *qnr* geni kod salmonela nađeni na plazmidima različite veličine i strukture to govori u prilog širenja *qnr* gena na mobilnim genetičkim elementima kao što su integroni pre nego širenja jednog plazmida rezistencije (Giraud et al., 2006). Iako *qnr* geni sami po sebi uzrokuju nizak nivo rezistencije na fluorohinolone, doprinose i pojavi višeg nivoa rezistencije u prisustvu hinolona. Stoga lateralno širenje *qnr* plazmida među sojevima u kombinaciji sa drugim mehanizmima rezistencije može u budućnosti značajno da kompromituje upotrebu fluorohinolona u terapiji salmoneloza.

Enzimaska modifikacija ili degradacija fluorohinolona: Godine 2004. kod *E. coli* je otkriven još jedan plazmidno determinisan mehanizam rezistencije: enzimaska inaktivacija hinolona. Prvi enzim kod bakterija za koji je dokazano da inaktivira hinolone je ustvari *cr* varijanta aminoglikozidne acetiltransferaze, AAC(6')-Ib. Ovaj enzim je odgovoran za smanjenu osetljivost na ciprofloksacin i rezistenciju na aminoglikozide tobramicin, amikacin i kanamicin. Iako izolati imaju smanjenu osetljivost na ciprofloksacin, potpuno su osetljivi na nalidiksičnu kiselinu pa se teško mogu detektovati u standardnom disk-difuzionom antibiogramu. Enzim AAC(6')-Ib-*cr* ima dve aminokiselinske supstitucije (Trp102Arg i Asp179Tyr) koje mu omogućavaju da izvrši acetilaciju azota u piperazinil grupi molekula ciprofloksacina i norfloksacina. Levofloksacin i moksifloksacin nisu pogođeni mogućnošću acetilacije jer imaju drugačiju građu. Ovo otkriće ukazuje na opasnost od ko-selekcije rezistencije na fluorohinolone prilikom upotrebe aminoglikozida i selekcije sojeva rezistentnih na aminoglikozide. Takođe, *aac(6')-Ib-cr* gen je nađen na *qnr* plazmidima udružen sa *qnr* genima, povećavajući četvorostruko nivo rezistencije na hinolone, a nađen je i plazmidski udružen sa genima koji kodiraju ESBL (Gunell, 2010). Kod salmonela je gen *aac(6')-Ib-cr* tek nedavno nađen i kod netifusnih salmonela iz životinja gajenih za ljudsku ishranu u Koreji (Tamang et al., 2011) i kod humanih izolata u SAD (Sjölund-Karllson et al., 2010).

Aktivna hinolonska efluks pumpa (*qepA*): Još dva plazmidna mehanizma rezistencije koji su nedavno otkriveni kod *E. coli* su plazmidno determinisane efluks pumpe kodirane genima *qepA* i *oqxAB*. QepA pumpa specifično izbacuje hidrofilne fluorohinolone ciprofloksacin, norfloksacin i enrofloksacin iz bakterije, kao i eritromicin, etidijum bromid i akrilflavin. OqxAB pumpa sem hinolona izbacuje i tetraciklin, hloramfenikol i razne biocide (Hernandez et al., 2011). Dosada ovi mehanizmi nisu otkriveni kod salmonela.

Sticanje visokog nivoa rezistencije na fluorohinolone je multifaktorijski proces, odnosno potrebno je više od jednog genetičkog događaja da dovede do rezistencije (Clockaert et Chaslus-Dancla, 2001; Hopkins et al., 2005; Giraud et al., 2006), na primer hromozomalna mutacija u jednom od gena za topoizomeraze udružena sa smanjenom permeabilnošću spoljne membrane ili promenom ekspresije MDR efluks pumpe koja može dovesti i do višestruke rezistencije na antibiotike (Kehrenberg et al.,

2007; O'Regan et al., 2009). Doprinos svakog od mehanizama na nivo rezistencije je različit (Van Bambeke et al., 2005). Pri izloženosti fluorohinolonima, kao posledica stresa i alteracije DNK, može se indukovati SOS sistem reparacije i aktivacija DNK polimeraze koja greši, rezultirajući mutatorskim stanjem. Na taj način povećava se frekvencija i nakupljanje više mutacija i pojava mutanata sa smanjenom osetljivošću, a potom i rezistentnih na fluorohinolone (Livermore, 2003; Boerlin and Reid-Smith, 2008). Sojevi rezistentni na nalidiksičnu kiselinu su na korak bliže rezistenciji na fluorohinolone od osetljivih. Visok nivo rezistencije na fluorohinolone kod kliničkih izolata salmonela je još uvek relativno neuobičajen u odnosu na druge pripadnike enterobakterija kao što je *E. coli*. U Velikoj Britaniji i skandinavskim zemljama izolati rezistentni na fluorohinolone najčešće su poreklom iz inostranstva, i to kod putnika koji su se vratili iz Jugoistočne Azije. Rezistencija je nađena kod *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. Schwarzengrund* i *S. Typhimurium*. Godine 1993. objavljen je prvi nalaz *S. Typhimurium* rezistentne na fluorohinolone, a kod ostalih serotipova 2001. godine i kasnije. Pretpostavlja se da prisustvo mutacija koje uzrokuju rezistenciju na fluorohinolone kod salmonela imaju posledice po zdravlje, kompetitivnost i invazivnost bakterije (manje kolonije, duže vreme generacije, nemogućnost kolonizacije creva), s obzirom da su pogođene vitalne funkcije u bakteriji kao što je replikacija ili aktivan efluks (Giraud et al., 2003; Zhang et al., 2006). To ukazuje na činjenicu da bi u odsustvu selektivnog pritiska prevladali kompetitivniji osetljivi sojevi, što je i dokazano sa *in vitro* mutantima (Enne, 2010; O'Regan et al., 2010).

U svetlu širenja rezistencije na hinolone i smanjene osetljivosti na fluorohinolone u svetu, ispitivanja kod nas započela su 2006. godine na odabranom uzorku sojeva *S. Enteritidis*. U cilju da se obuhvati ceo lanac proizvodnje i konzumacije od farme do potrošača, uzorak je uključio sojeve poreklom od obolelih ljudi, namirnica (jaja i pileće meso) i pilića gajenih za ljudsku ishranu. Izvršena je molekularna tipizacija i rezistotipizacija epidemijski povezanih i sporadičnih izolata *S. Enteritidis*. Detekcija sojeva sa smanjenom osetljivošću na fluorohinolone podstakla je nastavak istraživanja, odnosno selekciju i analizu svih sojeva salmonela rezistentnih na nalidiksičnu kiselinu izolovanih u Institutu za javno zdravlje Vojvodine u periodu od 2005. godine do kraja 2010. godine. Prvi put u Srbiji omogućen je uvid u učestalost i molekularnu prirodu fenomena smanjene osetljivosti na fluorohinolone među sojevima salmonela u

Vojvodini. Istovremeno je testiran i ustanovljen jednostavan sistem za efikasnu tipizaciju koji omogućava epidemiološko praćenje pojave i širenja različitih sojeva salmonela u lancu ishrane.

2. CILJEVI RADA

Salmoneloze spadaju među najznačajnije zoonoze i time predstavljaju veliki javno zdravstveni problem, a *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Enteritidis (*S. Enteritidis*) je najzastupljeniji serotip kod ljudi. U svetlu trenda rastuće učestalosti rezistencije salmonela na antibiotike u svetu, u poslednje dve decenije, a naročito rezistencije na hinolonske preparate koji su lekovi izbora u lečenju ozbiljnih salmoneloza, ciljevi ovog rada bili su:

1. Karakterizacija *S. Enteritidis* u kolekciji nasumično odabranih izolata poreklom od pilića, ljudi obolelih od salmoneloze i namirnica živinskog porekla identifikovanih na području Južnobačkog okruga u periodu 2005.-2006. godine:
 - 1a. Tipizacija izolata metodom RAPD-PCR („randomly amplified polymorphic DNA- polymerase chain reaction“)
 - 1b. Testiranje osetljivosti na antibiotike i određivanje tipova rezistencije
 - 1c. Definisanje molekularnih mehanizama rezistencije na hinolone kod rezistentnih izolata.
2. Analiza učestalosti rezistencije na hinolone na većem uzorku izolata *S. Enteritidis* poreklom od ljudi i namirnica identifikovanih na području Južnobačkog okruga u periodu 2005.-2010. godine.
3. Određivanje tipova rezistencije kod izolata *S. Enteritidis* rezistentnih na hinolone.
4. Analiza pojave fenomena smanjene osetljivosti na fluorohinolone kod izolata *S. Enteritidis* određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija za ciprofloksacin.
5. Detekcija mutacija i analiza polimorfizma mutacija u regionu koji determiniše rezistenciju na hinolone (QRDR) *gyrA* gena odgovornih za rezistenciju na hinolone kod *S. Enteritidis*.
6. Analiza učestalosti rezistencije na hinolone kod drugih serotipova salmonela identifikovanih na području Južnobačkog okruga u periodu 2005.-2010. godine.
7. Određivanje tipova rezistencije kod izolata drugih serotipova salmonela rezistentnih na hinolone.

Karakterizacija izolata salmonela sa područja Južnobačkog okruga omogućiće sagledavanje slike o prirodi i veličini problema rezistencije salmonela na hinolone kod nas, ali i uvođenje efikasnog sistema molekularne tipizacije izolata u cilju definisanja i praćenja različitih sojeva u populaciji salmonela.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Izolati

U istraživanje su uključeni izolati salmonela identifikovani u Naučnom Institutu za veterinarstvo "Novi Sad" i u Institutu za javno zdravlje Vojvodine u periodu od 2005. do 2010. godine. U nameri da se istraživanjem obuhvate razni stadijumi prenosa salmonela u lancu ishrane, kolekcija je formirana da uključi izolate poreklom iz pilića (veterinarski izolati), fecesa obolelih ljudi (humani izolati) i namirnica pilećeg porekla. Za rezistotipizaciju i RAPD („randomly amplified polymorphic DNA“) tipizaciju izabrano je 30 izolata *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Enteritidis (*S. Enteritidis*) poreklom iz pilića gajenih za ljudsku ishranu sa farmi iz Južnobačkog okruga i 30 izolata poreklom iz fecesa pacijenata obolelih od salmoneloze i iz namirnica (jaja, pripravci od jaja i živinsko meso) namenjenih ljudskoj ishrani, takođe sa područja Južnobačkog okruga (opštine Bač, Bačka Palanka, Bački Petrovac, Beočin, Bečej, Vrbas, Žabalj, Srbobran, Temerin, Titel, Sremski Karlovci, grad Novi Sad) (Tabela 2. i 3.). U istraživanje su uključeni samo izolati identifikovani prvi put kod nekog pacijenta ili iz namirnice (primoizolati). U cilju ispitivanja genetičke prirode rezistencije salmonela na hinolone i njihove udruženosti sa drugim determinantama rezistencije analizom je obuhvaćeno 900 izolata *Salmonella* Enteritidis i 259 izolata drugih serotipova. Izolati su humanog porekla ili poreklom iz namirnica i prikazani su u Tabeli 4.

Uzorci za identifikaciju veterinarskih salmonela bili su jetra, cekum, crevo, feces i papirna stelja; humani izolati identifikovani su iz fecesa, a namirnice su uključivale pripravke od sirovih jaja (majonez, tartar sos, ruska salata, testo za biskvit) i živinsko meso.

Kao referentni sojevi korišćeni su *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 i *Salmonella* (*S.*) Typhimurium ATCC 14028.

Tabela 2. Veterinarski izolati *S. Enteritidis* korišćeni za rezistotipizaciju i RAPD tipizaciju

Veterinarski izolati		
Broj protokola/godina	Uzorak	Poreklo izolata (lokacija farme)
122/2005	Brojler pre klanja (jetra)	Novi Sad
501/2005	Brojler (jetra)	Novi Sad
7938/2005	Jednodnevna koka nosilja (jetra)	Novi Sad
70/2005	Pile uginulo u transportu (jetra)	Novi Sad
74/2005	Brojler pre klanja (jetra)	Gospođinci
75/2005	Jednodnevni brojler (jetra)	Novi Sad
1982/2005	Jednodnevno pile (jetra)	Bač
3073/2005	Jednodnevni brojler (jetra)	Mladenovac
9097/2005	Jednodnevno pile (jetra)	Srbobran
9568/2005	Brojler pre klanja (jetra)	Stara Pazova
9635/2005	Brojler pre klanja (jetra)	Šid
350/2006	Brojler (jetra)	Bač
386/2006	Jednodnevno pile (jetra)	Šid
494/2006	Koke nosilje u eksploataciji (feces)	Beška
533/2006	Brojler pre klanja (jetra)	Stara Pazova
534/2006	Brojler pre klanja (jetra)	Bač
631/2006	Koke nosilje u eksploataciji (jetra)	Beška
721/2006	Brojler pre klanja (cekum)	Šid
765/2006	Brojler pre klanja (jetra)	Bečej
766/2006	Pile uginulo u transportu (jetra)	Bečej
775/2006	Brojler pre klanja (jetra)	Temerin
921/2006	Brojler pre klanja (jetra)	Stara Pazova
932/2006	Brojler pre klanja (cekum)	Irig
1387/2006	Brojler pre klanja (jetra)	Stara Pazova
1443/2006	Brojler pre klanja (cekum)	Stara Pazova
1845/2006	Šestodnevno pile (crevo)	Žabalj
3557/06	Jednodnevni brojler (jetra)	Novi Karlovci
3560/2006	Jednodnevni brojler (jetra)	Bečej
3568/2006	Pile uginulo u transportu (papirna stelja)	Žabalj
3612/2006	Četvorodnevni brojler (jetra)	Kovilj

Tabela 3. Humani izolati i izolati *S. Enteritidis* iz namirnica korišćeni za rezistotipizaciju i RAPD tipizaciju

Humani izolati i izolati iz namirnica		
Br.protokola/ godina	Uzorak	Poreklo izolata
168335/2005	Feces pacijenta	Novi Sad, starački dom
168347/2005	Feces pacijenta	Novi Sad, epidemija u restoranu
247471/2005	Feces pacijenta	Novi Sad, epidemija u hamburgeriji
349699/2005	Namirnica (majonez)	Novi Sad, epidemija u hamburgeriji
349700/2005	Namirnica (tartar sos)	Novi Sad, epidemija u hamburgeriji
348585/2005	Namirnica (ruska salata sa majonezom)	Vrbas, kiosk brze hrane
337918/2005	Namirnica (pileće meso)	Novi Sad, kantina u obdaništu
85038/2005	Feces pacijenta	Srbobran, Dom zdravlja
202617/2005	Feces pacijenta	Sremska Kamenica, epidemija u školskoj kantini
227467/2005	Feces pacijenta	Novi Sad, Dom zdravlja
239077/2005	Feces pacijenta	Novi Sad, Klinika za infektivne bolesti
33641/2005	Feces pacijenta	Novi Sad, Dom zdravlja
228020/2005	Feces pacijenta	Novi Sad, Dečija bolnica – Klinika za neonatologiju
647/2005	Namirnica (pileći batak)	Maglić, mesara
164067/2006	Feces pacijenta	Novi Sad, Dom zdravlja
201394/2006	Feces pacijenta	Beočin, Dom zdravlja, porodična epidemija
202635/2006	Feces pacijenta	Novi Sad, Dom zdravlja
204843/2006	Feces pacijenta	N. Sad, Dom zdravlja, trovanje kolačom sa jajima
323476/2006	Feces pacijenta	Novi Sad, Klinika za infektivne bolesti
148323/2006	Feces pacijenta	Novi Sad, Klinika za infektivne bolesti
173264/2006	Feces pacijenta	Novi Sad, Dom zdravlja
212328/2006	Feces pacijenta	Žabalj, sanitarni pregled
317526/2006	Feces pacijenta	Novi Sad, Dom zdravlja
751/2006	Namirnica (pileći batak)	Titel, mesara
2249/2006	Namirnica (jaja iz tanka sa testom za biskvit)	Crvenka, fabrika biskvita
5693/2006	Namirnica (smrznuto pileće meso)	Maglić, fabrika za preradu pilića
5717/2006	Namirnica (pileći batak)	Maglić, fabrika za preradu pilića
5814/2006	Namirnica (pileći batak)	Pančevo, fabrika za preradu pilića
641/2006	Namirnica (jaja iz tanka sa testom za biskvit)	Crvenka, fabrika biskvita
1898/2006	Namirnica (testo pre depozita)	Crvenka, fabrika biskvita

Tabela 4. Salmonele obuhvaćene analizom rezistencije na hinolone

Serotip	2005.	2006.	2007.	2008.	2009.	2010.	Ukupno izolata
<i>S. Enteritidis</i>	200	200	100	200	83	117	900
<i>S. Typhimurium</i>	23	16	8	17	7	15	86
<i>S. Infantis</i>	1	2	3	11	5	15	37
<i>S. Agona</i>		24	5	3		2	34
<i>S. Senftenberg</i>	2	9	4	10	1	4	30
<i>S. Hadar</i>	10	5		2	1	2	20
<i>S. Derby</i>	3					9	12
<i>S. Bovismorbificans</i>	1				6		7
<i>S. Heidelberg</i>	4						4
<i>S. Tennessee</i>				1	1	1	3
<i>S. Goldcoast</i>	2	1					3
<i>S. Abony</i>			1		2		3
<i>S. Anatum</i>				3			3
<i>S. Mbandaka</i>				3			3
<i>S. Virchow</i>			1	1			2
<i>S. Wien</i>		1			1		2
<i>S. Thompson</i>		2					2
<i>S. London</i>		1					1
<i>S. Oranienburg</i>				1			1
<i>S. Jerusalem</i>				1			1
<i>S. Strasbourg</i>				1			1
<i>S. Ahuza</i>					1		1
<i>S. Kottbus</i>					1		1
<i>S. Saintpaul</i>						1	1
<i>S. Stanleyville</i>						1	1

3.1.2. *Medijumi za rast, kultivaciju i potvrdnu identifikaciju bakterija, testiranje osetljivosti na antibiotike i određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija*

Za čuvanje kolekcije izolata iz veterinarskih uzoraka, fecesa i namirnica korišćen je 0.8% hranljivi meki agar (Himedia, Indija)

Za kultivaciju bakterija korišćena je selektivna podloga SS (Salmonella – Shigella) agar. Za potvrdnu biohemijsku identifikaciju salmonela korišćen je modifikovani Kligler agar sa dvostrukim šećerom sa dodatkom 0.3% urea karbamida, andrade-saharoza-peptonska voda, andrade-laktoza-peptonska voda, andrade-dekstroza-peptonska voda, Simmons-citratni agar, andrade-manitol-peptonska voda, urea po Christensen-u, SIM (sumpor-indol-motility) agar, andrade-adonitol-peptonska voda, podloga sa natrijum malonatom, podloga za KCN ogled i kontrolu. Sve tečne i čvrste podloge su napravljene su prema preporuci proizvođača (Himedia).

Za kultivaciju referentnih sojeva *E. coli* ATCC 25922 i *S. Typhimurium* ATCC 14028 korišćeni su liofilizovani sojevi proizvođača Microbiologics (SAD) kultivisani na krvnom agaru koji je napravljen prema preporuci proizvođača (Himedia).

Za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike disk-difuzionom metodom kao i određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) antibiotika korišćena je podloga Müeller-Hinton agar (MHA) koji je napravljen prema preporuci proizvođača (Himedia).

Za izolaciju ukupne DNK iz bakterija, koja je korišćena u PCR („polymerase chain reaction”) reakciji za umnožavanje regiona koji determiniše rezistenciju na hinolone (QRDR) *gyrA* gena, salmonele su kultivisane u dekstroznom bujonu koji je sadržao: 15 g/l pepton-1, 3 g/l mesni ekstrakt, 10 g/l dekstrozu, 5 g/l NaCl, 0.3 g/l K₂PO₄ pH 7.3).

3.1.3. *Serumi, antibiotici, kitovi za izolaciju DNK, kitovi za PCR, rastvori, puferi*

Za serološku tipizaciju salmonela korišćeni su serumi za aglutinaciju proizvođača Denka Seiken (Japan) i Statens Serum Institute (Danska). Za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike disk-difuzionom metodom korišćeni su diskovi antibiotika proizvođača BioRad (SAD). Izbor diskova i njihove koncentracije prikazani

u Tabeli 5. Za određivanje MIC antibiotika korišćeni su antibiotici ciprofloksacin (CIP) i nalidiksična kiselina (NAL) u supstanci (Sigma, Nemačka).

Tabela 5. Antibiotici i njihove koncentracije u komercijalnim diskovima korišćene u testu osetljivosti na antibiotike

Antibiotik	Skraćenica	Koncentracija (µg)
Ampicilin	AMP	10
Cefalotin	CFT	30
Ceftriakson	CRO	30
Tetraciklin	TET	30
Kotrimoksazol (trimetoprim+sulfametoksazol)	SXT	1.25+23.75
Ciprofloksacin	CIP	5
Nalidiksična kiselina	NAL	30

Za izolaciju ukupne DNK iz ćelija, koja je korišćena za RAPD-PCR sa OPB-17 prajmerom korišćen je kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Francuska). Za RAPD-PCR i PCR umnožavanje QRDR *gyrA* gena korišćen je kit Taq PCR Core Kit (Qiagen).

U radu su korišćeni sledeći rastvori i puferi: sterilni fiziološki rastvor sastava 0.9% NaCl u destilovanoj vodi; etidijum bromid koncentracije 10 mg/l, finalna koncentracija u gelu 0.5 mg/l; 1xTBE (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina i 2 mM EDTA, pH 8.3).

3.2. Metode

3.2.1. Potvrдна identifikacija salmonela

Izolati iz kolekcije koji su identifikovani i sačuvani na 0.8% hranljivom mekom agaru osveženi su zasejavanjem na krvni agar i nakon inkubacije od 24 h na 37°C prenošeni na SS agar. Karakteristične providne laktoza-negativne kolonije sa crnim centrom sa SS agara dalje su potvrđivane kao salmonele na osnovu svojih biohemijskih osobina i antigenske građe. Pojedinačne kolonije su zasejane na biohemijski niz i inkubirane 24 h na 37°C. Sve dalje inkubacije prilikom identifikacije i kultivacije

salmonela i referentnih sojeva vršene su u trajanju od 24 h na 37°C u aerobnim uslovima.

Pripadnost određenom serotipu potvrđena je metodom aglutinacije na pločici u odgovarajućim komercijalnim aglutinišućim serumima, tako što je uzet materijal sa kosine Kligler agara i pomešan sa jednom kapi odgovarajućeg aglutinišućeg seruma nakon čega je posmatrano prisustvo aglutinacije antigena (izolat) i antitela (serum). Paralelno je proveravano odsustvo aglutinacije u fiziološkom rastvoru (ako su kolonije u R formi, aglutiniraju nespecifično pa se ne mogu na taj način identifikovati). Nakon aglutinacije u polivalentnom O aglutinišućem serumu, korišćeni su aglutinišući serumi za određivanje prisustva grupnih O i flagelarnih H antigena.

3.2.2. *Izolacija DNK*

3.2.2.1. *Izolacija ukupne DNK za RAPD-PCR*

Izolacija ukupne DNK iz salmonela uradjena je po metodi koju su opisali Betancor i saradnici (2004). Izolati su zasejani na SS agar i inkubirani 24 h na 37°C u cilju dobijanja pojedinačnih kolonija. Sa čvrste podloge uzeto je nekoliko kolonija svakog izolata kalibrisanom ezom od 1 µl i razmućeno u 150 µl sterilne bidestilovane vode. Nakon kuvanja u trajanju od 5 min uzorci su ohlađeni na ledu i centrifugirani u trajanju od 3 min na 14000 rpm (centrifuga: 5415C, Eppendorf, Nemačka). Dobijeni supernatant nakon centerifugiranja je korišćen kao uzorak u RAPD-PCR reakcijama za prajmere P1254, 23L i OPA-4. Za prajmer OPB-17 bilo je neophodno izolovati DNK pomoću QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), prema uputstvima proizvođača.

3.2.2.2. *Izolacija ukupne DNK za PCR umnožavanje QRDR regiona gyrA gena*

Sa čvrste podloge je nekoliko kolonija svakog izolata *S. Entritidis* zasejano u dekstrozni bujon i inkubirano 24 h na 37°C. Po 1.5 ml tečnih kultura svakog izolata je centrifugirano na 14000 rpm (centrifuga: 5415C, Eppendorf). Nakon odlivanja supernatanta, pelet je resuspendovan u 200 µl bidestilovane sterilne vode i kuvan 5 min. Nakon hlađenja na ledu suspenzije su centrifugirane na 14000 rpm u trajanju od 5 min,

a dobijeni supernatant je korišćen u PCR reakcijama za umnožavanje *gyrA* gena (Giraud et al., 1999).

3.2.3. RAPD tipizacija

RAPD tipizacija je rađena PCR metodom po metodi Betancor i saradnika (2004) sa po 4 prajmera za svaki izolat. Po 10 µl svakog uzorka DNK dodato je u PCR reakciju zapremine 50 µl, koja je sadržala 3.5 mmol/l MgCl₂, 0.2 mmol/l dNTP-ova, 2.5 µmol/l jednog od RAPD prajmera, 1 x PCR pufera i 1 U Taq polimeraze (Taq PCR Core Kit, Qiagen). Sekvence svih prajmera koji su korišćeni u RAPD tipizaciji i umnožavanju QRDR regiona *gyrA* gena su navedene u Tabeli 6.

Tabela 6. Sekvence RAPD prajmera i prajmera za umnožavanje QRDR regiona *gyrA* gena korišćenih u ovom radu

Oznaka RAPD prajmera	Sekvenca
P1254	5'-CCG CAG CCA A-3'
23L	5'-CCG AAG CTG C-3'
OPB-17	5'-AGG GAA CGA G-3'
OPA-4	5'-AAT CGG GCT G-3'
Oznaka prajmera za umnožavanje QRDR <i>gyrA</i> gena	Sekvenca
STGYRA1	5'-TGT CCG AGA TGG CCT GAA GC-3'
STGYRA12	5'-CGT TGA TGA CTT CCG TCA G-3'

Umnožavanje za RAPD tipizaciju je vršeno u PCR aparatu Eppendorf Mastercycler (Nemačka) pod sledećim uslovima: 4 inicijalna ciklusa koja su se sastojala od denaturacije 4 min na 94°C, vezivanja prajmera 4 min na 35°C, ekstenzije 4 min na 72°C; 35 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije 30 sec na 94°C, vezivanja prajmera 1 min na 35°C, ekstenzije 2 min na 72°C; i finalne ekstenzije 10 min na 72°C. PCR produkti su razdvojeni horizontalnom elektroforezom u 2% agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u 1 x TBE puferu. U gel je dodat etidijum

bromid u koncentraciji 0.5 mg/l. Za elektroforezu je korišćen 1 x TBE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 100 V. Veličine analiziranih fragmenata su određivane upoređivanjem dužine pređenog puta dobijenih fragmenata sa pređenim putem DNK fragmenata poznate dužine pri čemu je korišćen standard molekularnih masa koji se sastojao od fragmenata veličine 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija). RAPD profili su vizuelizovani na transiluminatoru i fotografisani digitalnom kamerom u mračnoj komori (Biometra, Nemačka) uz korišćenje BioDocAnalyze softvera za obradu digitalnih fotografija.

3.2.4. *Selekcija za utvrđivanje rezistencije na NAL*

Selekcija izolata rezistentnih na NAL među 1159 izolata salmonela (900 *S. Enteritidis* i 259 salmonela koje su pripadale drugim serotipovima) izvršena je zasejavanjem po 3 µl prekonoćnih tečnih kultura salmonela na selektivnu čvrstu podlogu MHA koja je sadržala po 64 mg/l NAL dodate u vodenom rastvoru pred razlivanje. Rast bakterija na ovoj koncentraciji NAL dokazuje rezistenciju izolata.

3.2.5. *Testiranje osetljivosti na antibiotike*

Osetljivost bakterija na antibiotike testirana je na reprezentativnom uzorku *S. Enteritidis* od po 30 veterinarskih i 30 humanih izolata i namirnica, kao i kod izolata salmonela koji su u selekcionom eksperimentu pokazali rezistenciju na NAL. Za određivanje osetljivosti korišćena je disk-difuziona metoda na agaru prema standardnoj proceduri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2008). Nekoliko morfološki identičnih kolonija resuspendovano je u sterilnom fiziološkom rastvoru da se dobije optička gustina 0.5 McFarlanda. Sterilni bris je natopljen ovom suspenzijom, očeđen o zidove epruvete i gustim potezima zasejan po celoj površini MHA podloge u tri sloja pod uglom od 60°. Nakon 10 min sterilnom pincetom postavljeni su antibiotski diskovi na podlogu, Petri šolje su prevrnute i tako inkubirane 24 h na 37°C. Testirana je osetljivost na antibiotike koji se koriste u terapiji salmoneloza (Tabela 5.). Nakon inkubacije merene su zone inhibicije rasta bakterija oko svakog diska i na osnovu kriterijuma CLSI standarda i proizvođača izolati su prema ovim zonama svrstavani u

osetljive (S), intermedijerne (I) ili rezistentne (R). Izolati koji su dali intermedijernu zonu inhibicije za pojedine antibiotike svrstani su u rezistentne. U Tabeli 7. dati su kriterijumi za osetljivost.

Tabela 7. Kriterijumi za utvrđivanje osetljivosti na antibiotike prema prečnicima zona inhibicije

Antibiotik	Rezistentan (R)	Intermedijeran (I)	Osetljiv (S)
	Prečnici zona inhibicije (mm)		
AMP	≤ 13	14-16	≥ 17
CFT	≤ 14	15-17	≥ 18
CRO	≤ 13	14-20	≥ 21
TET	≤ 14	15-18	≥ 19
SXT	≤ 10	11-15	≥ 16
CIP	≤ 15	16-20	≥ 21
NAL	≤ 13	14-18	≥ 19

3.2.6. Određivanje MIC za antibiotike

Određivanje MIC antibiotika izvršeno je agar-dilucionom metodom prema standardnoj proceduri CLSI (CLSI, 2006). Pripremljene su čvrste podloge sa dvostrukim serijskim razblaženjima antibiotika odnosno MHA u koji je pred razlivanje dodavana odgovarajuća koncentracija antibiotika NAL i CIP (rastvorenih u vodi), tako da su konačne koncentracije u Petri šoljama iznosile:

NAL – 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512; 1024; 2048 mg/l

CIP – 0.002; 0.004; 0.008; 0.016; 0.032; 0.064; 0.128; 0.256; 0.512; 1; 2; 4 mg/l

Određivane su minimalne inhibitorne koncentracije na NAL i CIP kod 65 izolata *S. Enteritidis*:

1. iz kolekcije od 60 *S. Enteritidis*: 30 reprezentativnih izolata osetljivih na NAL – 15 veterinarskih i 15 humanih i 9 izolata rezistentnih na NAL
2. iz kolekcije od 900 *S. Enteritidis*: 26 izolata rezistentnih na NAL otkrivenih selekcijom

Izolati *S. Enteritidis* su pripremljeni tako što su pojedinačne kolonije zasejane u dekstrozni bujon i inkubirane 24 h na 37°C. Potom je svaka tečna kultura razblažena u fiziološkom rastvoru do optičke gustine od 0.5 McFarlanda (oko 10^8 ćelija/ml), a zatim je napravljeno novo desetostruko razblaženje (10^7 ćelija/ml). Iz razblaženja je 3 μ l zasejavano u vidu kapi (finalna količina u kapi je 10^4 ćelija) na MHA sa serijskim dvostrukim razblaženjima NAL i CIP. Nakon inkubacije od 24 h na 37°C očitavani su rezultati, odnosno MIC-ovi. Pod MIC-om je podrazumevana ona koncentracija antibiotika na kojoj nije bilo vidljivog porasta bakterija ili je taj porast zanemarljiv (2-3 kolonije). Referentni soj *E. coli* ATCC 25922 korišćen je kao kontrolni soj, čiji se MIC za NAL kreće u intervalu 1 – 4 mg/l, a za CIP se kreće u intervalu 0.008 – 0.03 mg/l. Sojevi su klasifikovani prema kliničkim graničnim vrednostima CLSI standarda: za NAL – osetljiv MIC \leq 16 mg/l, rezistentan MIC \geq 32 mg/l; za CIP – osetljiv MIC \leq 1 mg/l, rezistentan MIC \geq 4 mg/l.

Kao granična vrednost za smanjenu osetljivost na CIP uzet je MIC \geq 0.125 mg/l (Wybo et al., 2004; Aarestrup et al., 2003).

3.2.7. Umnožavanje QRDR regiona *gyrA* gena PCR-om i sekvenciranje

QRDR regioni *gyrA* gena svih izolata *S. Enteritidis* koji su pokazali rezistenciju na NAL (35 izolata) umnoženi su u PCR reakciji sa prajmerima: STGYRA1 i STGYRA12 čije su sekvence navedene u Tabeli 6. PCR smesa od 25 μ l po uzorku je uključivala 25 pmol svakog prajmera, 200 μ mol/l dNTP smese, 1.5 mmol/l MgCl₂, 0.5 U Taq polimeraze, 1 x PCR pufera i 5 μ l uzorka DNK. Korišćen je Taq PCR Core Kit (Qiagen), a amplifikacija je izvršena u Eppendorf Mastercycler-u pod sledećim uslovima: početna denaturacija 3 min na 94°C; 30 ciklusa: denaturacija 1 min na 94°C, vezivanje prajmera 1 min na 55°C, ekstenzija 1 min na 72°C; i finalna ekstenzija 10 min na 72°C (Giraud et al., 1999). Umnoženi PCR fragment je potvrđen horizontalnom elektroforezom u 2% agaroznom gelu u 1 x TBE puferu. U gel je dodat etidijum bromid u koncentraciji 0.5 mg/l. Za elektroforezu je korišćen 1 x TBE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 100 V. Veličina PCR produkta je određena poređenjem dužine pređenog puta PCR produkta sa pređenim putem DNK fragmenata poznate dužine, pri čemu je korišćen standard molekulskih masa koji se sastojao od

fragmenata veličine 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija). PCR produkti su potvrđeni vizuelizacijom na transiluminatoru i fotografisanjem u UV komori (Biometra), uz korišćenje BioDocAnalyze softvera za obradu digitalnih fotografija. Umnoženi QRDR regioni *gyrA* gena su prečišćeni pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen) i sekvencirani u MacroGen-u (Seoul, Republika Koreja i Holandija). DNK izolovana iz referentnog soja *S. Typhimurium* ATCC 14028 je uključena u amplifikaciju i sekvenciranje QRDR regiona *gyrA* gena. Poravnavanje sekvenci i pronalaženje mutacija je izvršeno pomoću CLUSTALW programa, a nukleotidne sekvence su upoređene sa fragmentom od 261 bp *gyrA* gena *S. Typhimurium* NCTC 74, pristupnog broja X78977 u EMBL GenBank bazi podataka (Griggs et al., 1996).

3.2.8. Određivanje Simsonovog indeksa diverziteta (*D*)

U cilju procene diskriminativne moći metoda tipizacije, za svaku od njih određivan je indeks diskriminacije koji se definiše kao verovatnoća da dva nasumično izabrana izolata pripadaju različitim tipovima. Ovaj indeks se izračunava pomoću Simpsonovog indeksa diverziteta:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

Gde je *N* ukupan broj izolata, *s* je ukupan broj različitih tipova a *n_j* je broj izolata koji pripadaju *j*-tom tipu. (Hunter and Gaston, 1988)

3.2.9. Određivanje Dice koeficijenta

Sličnost između 2 RAPD profila je određena Dice koeficijentom (DC):

$$DC = 2X/Y$$

Gde je *X* broj identičnih traka u profilima kod oba izolata, a *Y* je ukupan broj traka. DC vrednost može da se kreće od 0 (potpuno različiti profili) do 1 (identični profili). Smatra se da su izolati sa $DC \geq 0.8$ visoko srodni, odnosno istog klonalnog porekla (Lima et al., 1997).

4. REZULTATI

4.1. Karakterizacija kolekcije od 60 izolata *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Enteritidis (*S. Enteritidis*) poreklom od pilića, ljudi i namirnica živinskog porekla

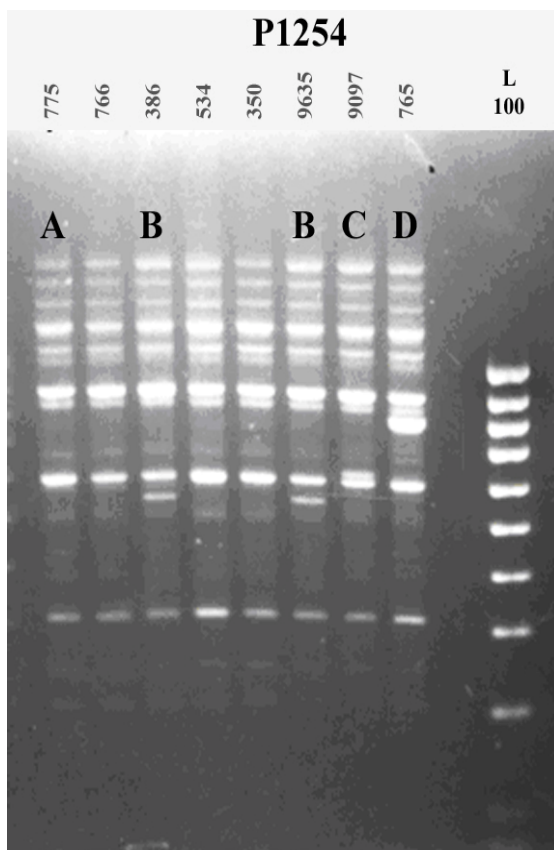
Karakterizacija 60 izolata iz kolekcije je obuhvatala RAPD („randomly amplified polymorphic DNA”) tipizaciju sa četiri različita prajmera, određivanje osetljivosti na antibiotike odnosno rezistotipizaciju, dokazivanje fenomena smanjene osetljivosti na fluorohinolone određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) za ciprofloksacin (CIP) i nalidiksičnu kiselinu (NAL) i određivanje mehanizma rezistencije kod izolata rezistentnih na NAL detekcijom mutacija u regionu koji determiniše rezistenciju na hinolone (QRDR) *gyrA* gena.

4.1.1. RAPD tipizacija

RAPD tipizacija sastojala se od po četiri PCR („polymerase chain reaction”) reakcije za svaki izolat iz kolekcije *S. Enteritidis* poreklom od ljudi, pilića i iz namirnica. Svaka PCR reakcija za pojedini izolat uključivala je po jedan od četiri kratka nasumična prajmera (P1254, OPA-4, 23L ili OPB-17) koji su služili i kao uzvodni i kao nizvodni prajmer. Svaki izolat je nakon RAPD tipizacije sa jednim od četiri prajmera dao niz nasumičnih PCR produkata koji su nakon elektroforetskog razdvajanja činili jedinstveni RAPD profil izolata za dati prajmer. Prilikom određivanja RAPD profila, prvo je definisan osnovni, preovlađujući tip za svaki prajmer i nazvan tip A, a zatim je svaki novi tip koji se razlikovao od osnovnog tipa u jednom ili više fragmenata označen kao tip B, C, D ili E. Zatim je određen zbirni RAPD tip za svaki izolat tako što su se spojila slova koja označavaju tipove dobijene sa svakim od prajmera i to u redosledu: P1254, OPA-4, 23L, OPB-17 (Slike 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. i 9.).

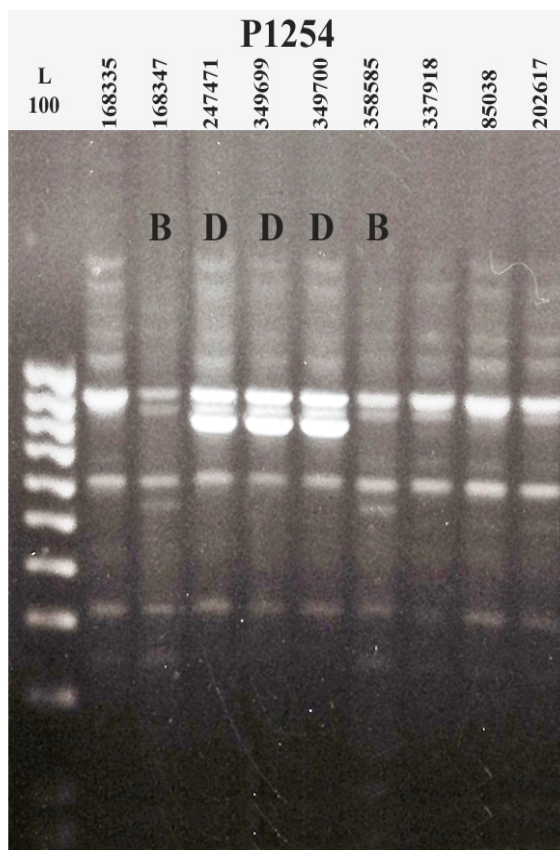
Prajmer P1254: Osnovni tip A je imao deset fragmenata. A tip nađen je kod 45 izolata (75%) i to 21 veterinarskog, 15 humanih i devet namirnica. Tip B je imao jedan dodatni fragment od 550 bp i nađen je kod devet izolata (15%) i to sedam veterinarskih, jednog humanog i jedne namirnice. Tip C je imao jedan dodatni fragment od 620 bp u

odnosu na tip A i imao ga je jedan veterinarski izolat iz jetre jednodnevnog pileta. Tip D je imao jedan dodatni fragment od 800 bp u odnosu na tip A i nađen je kod četiri izolata, od kojih je tri poreklom iz epidemije u novosadskoj hamburgeriji, a jedan iz brojlera pre klanja iz Bečeja. Tip E je imao jedan dodatni fragment od 580 bp u odnosu na tip A i imao ga je jedan humani izolat. Na Slici 2. i 3. prikazani su odabrani RAPD profili dobijeni nakon PCR umnožavanja izolovane DNK sa P1254 prajmerom.



Slika 2. RAPD profili dobijeni sa prajmerom P1254 nakon razdvajanja PCR-om umnoženih fragmenata dobijenih sa DNK izolovanom iz veterinarskih izolata. Slova su obeleženi pojedini tipovi.

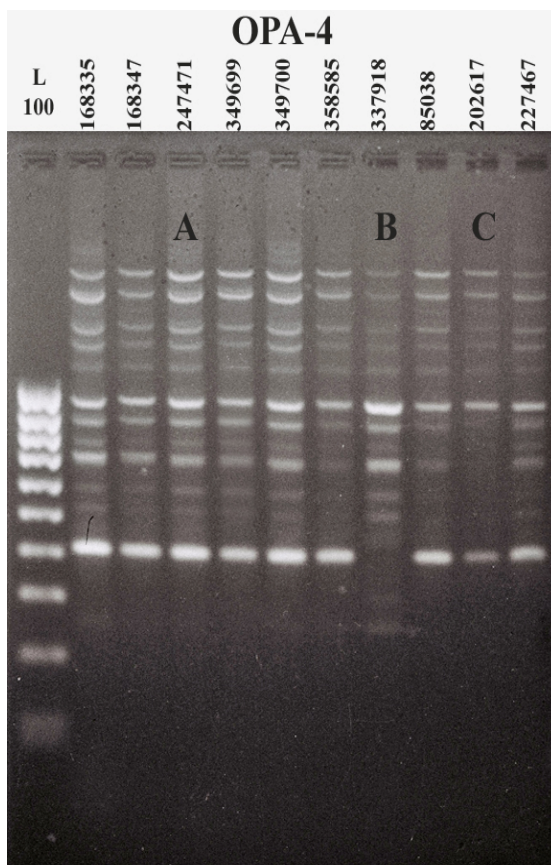
L100 - marker molekulske mase 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija).



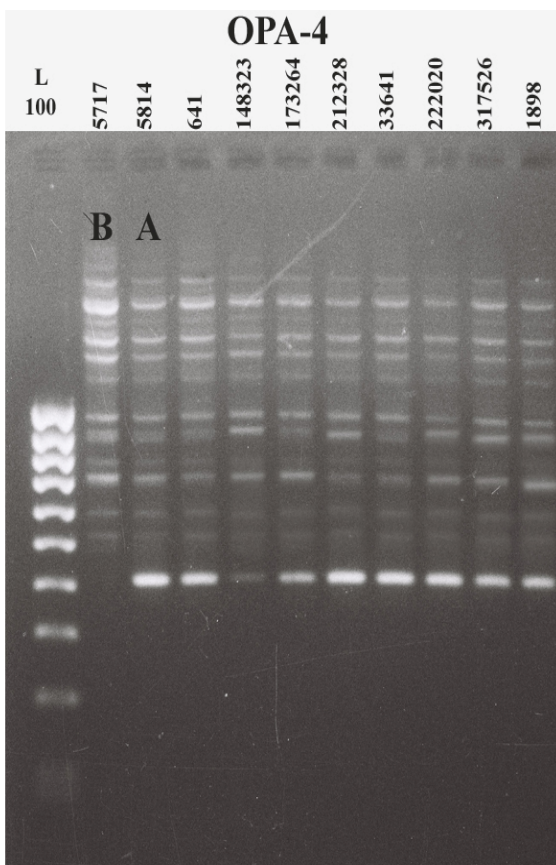
Slika 3. RAPD profili dobijeni sa prajmerom P1254 nakon razdvajanja PCR-om umnoženih fragmenata dobijenih sa DNK izolovanom iz humanih izolata i izolata iz namirnica. Slova su obeleženi pojedini tipovi.

L100 - marker molekulske mase 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija).

Prajmer OPA-4: Osnovni tip A je imao deset fragmenata i nađen je kod 57 izolata (95%) iz svih grupa izolata. Kod tipa B je nedostajao jedan fragment od 420 bp i imala su ga dva izolata iz namirnica. Tipu C je nedostajao jedan fragment od 750 bp u odnosu na tip A i uočen je kod jednog humanog izolata. Na Slici 4. i 5. prikazani su odabrani RAPD profili dobijeni sa OPA-4 prajmerom.

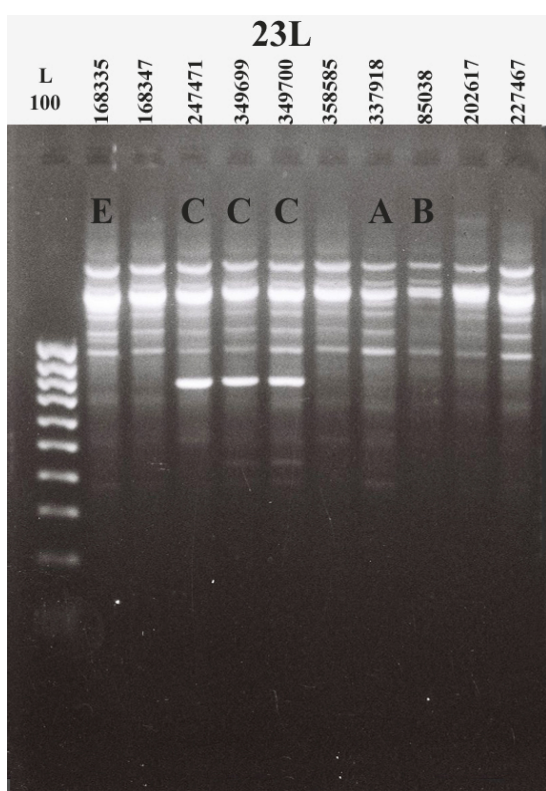


Slika 4. RAPD profili dobijeni sa prajmerom OPA-4 nakon razdvajanja PCR-om umnoženih fragmenata dobijenih sa DNK izolovanom iz humanih izolata i izolata iz namirnica. Slovim su obeleženi pojedini tipovi. L100 - marker molekulske mase 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija).

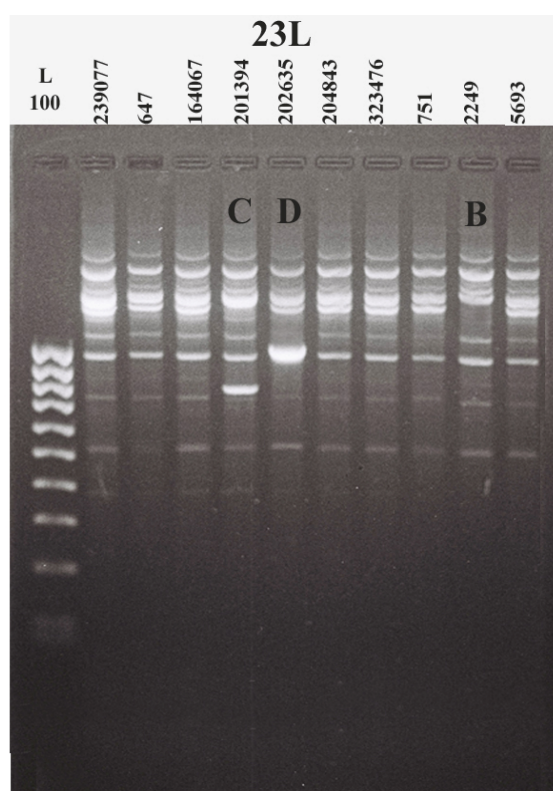


Slika 5. RAPD profili dobijeni sa prajmerom OPA-4 nakon razdvajanja PCR-om umnoženih fragmenata dobijenih sa DNK izolovanom iz humanih izolata i izolata iz namirnica. Slovim su obeleženi pojedini tipovi. L100 - marker molekulske mase 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija).

Prajmer 23L: Osnovni tip A se sastojao od šest fragmenata i nađen je kod 42 izolata (70%) iz svih grupa izolata. Kod tipa B je nedostajao jedan fragment veći od 1000 bp i imalo ga je deset izolata (16.7%). Tipu C je nedostajao jedan fragment veći od 1000 bp u odnosu na tip A, ali imao je jedan dodatni fragment od oko 800 bp i ovakav profil nađen je kod šest izolata (10%). Tipu D je nedostajao jedan fragment od oko 1200 bp u odnosu na tip A i nađen je kod jednog izolata. Tip E je imao jedan dodatni fragment od oko 1100 bp u odnosu na osnovni tip A i imao ga je jedan izolat. Na Slici 6. i 7. prikazani su odabrani RAPD profili dobijeni sa 23L prajmerom.

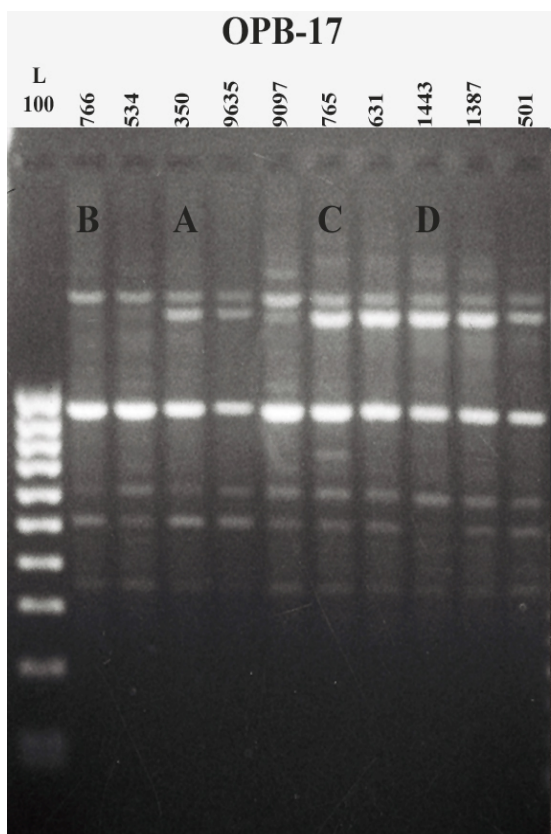


Slika 6. Slika 4. RAPD profili dobijeni sa prajmerom 23L nakon razdvajanja PCR-om umnoženih fragmenata dobijenih sa DNK izolovanom iz humanih izolata i izolata iz namirnica. Slova su obeleženi pojedini tipovi. L100 - marker molekulske mase 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija).

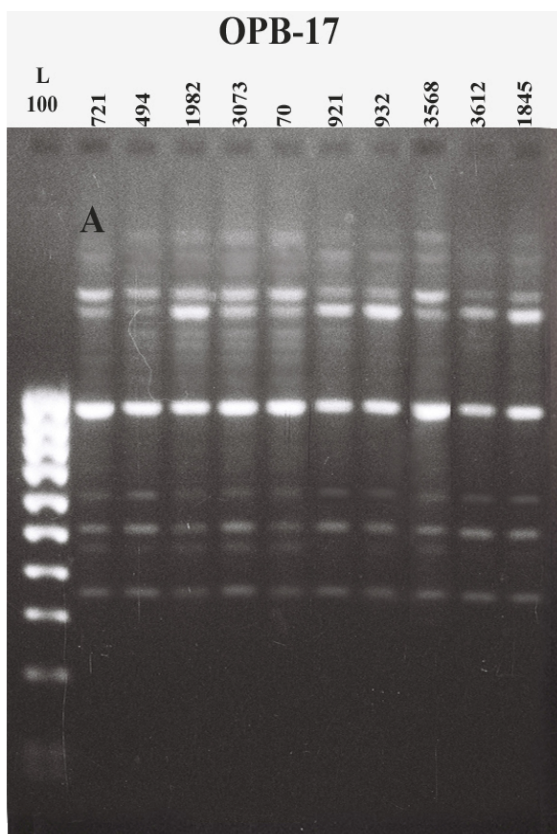


Slika 7. Slika 4. RAPD profili dobijeni sa prajmerom 23L nakon razdvajanja PCR-om umnoženih fragmenata dobijenih sa DNK izolovanom iz humanih izolata i izolata iz namirnica. Slova su obeleženi pojedini tipovi. L100 - marker molekulske mase 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija).

Prajmer OPB-17: Osnovni tip A je imao pet fragmenata. Ovaj tip nađen je kod 56 izolata (93.3%) i to 26 veterinarskih, 18 humanih i 12 namirnica. Tipu B je nedostajao jedan fragment veći od 2000 bp i nađen je kod dva veterinarska izolata. Tip C je imao jedan dodatni fragment od oko 800 bp u odnosu na tip A i nađen je kod jednog izolata, a tipu D je nedostajao jedan fragment od oko 500 bp u odnosu na tip A i imao ga je jedan veterinarski izolat. Na Slici 8. i 9. prikazani su RAPD profili dobijeni sa OPB-17 prajmerom.



Slika 8. RAPD profili dobijeni sa prajmerom OPB-17 nakon razdvajanja PCR-om umnoženih fragmenata dobijenih sa DNK izolovanom iz veterinarskih izolata. Slovim su obeleženi pojedini tipovi. L100 - marker molekulske mase 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija).



Slika 9. RAPD profili dobijeni sa prajmerom OPB-17 nakon razdvajanja PCR-om umnoženih fragmenata dobijenih sa DNK izolovanom iz veterinarskih izolata. Slovim su obeleženi pojedini tipovi. L100 - marker molekulske mase 100-1000 bp (Fermentas, Litvanija).

Prajmeri P1254 i 23L su diskriminisali po pet tipova, prajmer OPB-17 četiri tipa, a prajmer OPA-4 tri različita tipa među 60 ispitanih izolata. Rezultati RAPD analize dobijene sa četiri prajmera omogućili su razlikovanje 16 genetičkih grupa. Najzastupljenija je bila AAAA grupa kojoj je pripadalo 17 veterinarskih, deset humanih i šest izolata iz namirnica ili 55% *S. Enteritidis*. Sledeća po brojnosti je bila grupa BABA sa 10% izolata (pet veterinarskih i jedan iz namirnica). Jedinstvena grupa DACA se sastojala od tri epidemijski povezana izolata koja potiču iz epidemije u hamburgeriji i uključuju jedan izolat od obolelog konzumenta i dva izolata iz inkriminiranih namirnica. Distribucija RAPD tipova među izolatima je pokazana u Tabeli 8.

Tabela 8. RAPD tipovi klasifikovani među *S. Enteritidis* izolatima različitog porekla

Broj i poreklo izolata				RAPD tipovi			
Ukupno izolata	Veterinarski izolati	Humani izolati	Namirnica	Prajmer P1254	Prajmer OPA-4	Prajmer 23L	Prajmer OPB-17
33	17	10	6	A	A	A	A
3	2	1		B	A	A	A
6	5		1	B	A	B	A
1	1			C	A	A	A
3*		1*	2*	D	A	C	A
1	1			D	A	C	C
1		1		E	A	A	A
1			1	A	B	A	A
1			1	A	B	B	A
1		1		A	C	B	A
2		1	1	A	A	B	A
2	1	1		A	A	C	A
1		1		A	A	D	A
1		1		A	A	E	A
2	2			A	A	A	B
1	1			A	A	A	D

* Izolati iz jedne epidemije u hamburgeriji: dva izolata iz namirnica i jedan iz fecesa obolelog pacijenta

4.1.2. Testiranje osetljivosti na antibiotike disk-difuzionom metodom

Određivanje osetljivosti svakog od 60 izolata na antibiotike poslužilo je za definisanje različitih tipova rezistencije u kolekciji *S. Enteritidis* poreklom od pilića, ljudi i namirnica. Tip rezistencije ili rezistotip izolata označava se nizom antibiotika na koje je izolat rezistentan (markeri rezistencije) i predstavlja vid tipizacije. Izolati osetljivi na sve ispitane antibiotike nemaju nijedan marker rezistencije, što takođe predstavlja jedan rezistotip. Rezultati testiranja osetljivosti na antibiotike dobijeni za 30 izolata poreklom od pilića (veterinarski izolati) prikazani su u Tabeli 9.

Tabela 9. Testiranje osetljivosti veterinarskih izolata *S. Enteritidis* na antibiotike disk-difuzionom metodom

Broj izolata <i>S. Enteritidis</i>	Tip rezistencije
24 (80%)	Osetljiv
4 (13.3%)	NAL
1 (3.3%)	AMP
1 (3.3%)	AMP CFT NAL TET
Ukupno: 30 izolata (100%)	

Rezultati testiranja osetljivosti 18 humanih izolata i 12 izolata iz namirnica živalskog porekla *S. Enteritidis* prikazani su u Tabeli 10.

Tabela 10. Testiranje osetljivosti humanih izolata i izolata iz namirnica *S. Enteritidis* na antibiotike disk-difuzionom metodom

Broj izolata <i>S. Enteritidis</i>	Tip rezistencije
23 (76.7%)	Osetljiv
4 (13.3%)	NAL
1 (3.3%)	AMP
2 (6.7%)	AMP TET SXT
Ukupno: 30 izolata (100%)	

Višestruka rezistencija je definisana kao rezistencija na tri ili više antibiotika. U ovom istraživanju višestruka rezistencija na četiri antibiotika je nađena kod jednog izolata izolovanog iz pileta starog jedan dan (izolat 75 – AMP CFT NAL TET), a na tri antibiotika kod dva izolata, oba izolovana iz fecesa obolelih ljudi (izolati 168347 i 168335 - AMP TET SXT).

Rezistencija samo na AMP nađena je kod dva izolata, jednog izolovanog iz pileta (izolat 1982) i jednog humanog (izolat 202635). Rezistencija na NAL nađena je

kod pet izolata iz živine (izolati 9568, 501, 7938, 75, 74), jednog iz uzorka namirnice (izolat 1898) i tri iz fecesa pacijenata sa dijarejom (izolati 33641, 228020, 317526). Kod veterinarskog izolata 75 rezistencija na NAL bila je udružena sa rezistencijom na lekove iz grupe penicilina (AMP), cefalosporina (CFT) i tetraciklina (TET), dok je kod ostalih osam izolata iz ove kolekcije bila jedini marker rezistencije. Time je u ovoj kolekciji rezistencija na NAL bila najzastupljenija sa 9 izolata (15%), zatim AMP sa pet izolata (8.3%), TET sa tri izolata (5%) i CFT sa jednim izolatom (1.7%). Rezistencija na fluorohinolone, odnosno CIP nije otkrivena disk-difuzionom metodom.

4.1.3. *Određivanje MIC za NAL i za CIP agar-dilucionom metodom*

Određivanje MIC vrednosti za NAL, kao predstavnika hinolona starije generacije i za CIP kao predstavnika fluorohinolona (hinolona novije generacije) omogućilo je uvid u postojanje fenomena smanjene osetljivosti na fluorohinolone kod izolata rezistentnih na hinolone starije generacije. Iz kolekcije od 60 izolata *S. Enteritidis* za ovaj eksperiment odabrano je po 15 humanih i veterinarskih izolata osetljivih na NAL i devet izolata koji su bili rezistentni na NAL u disk-difuzionoj metodi.

Izolati koji su bili osetljivi na NAL i na CIP u disk-difuzionoj metodi većinom su imali MIC za CIP od 0.032 mg/l (70% izolata). Sa druge strane, izolati koji su bili rezistentni na NAL, a osetljivi na CIP u disk-difuzionoj metodi imali su značajno smanjenu osetljivost i na CIP. Kod ovih izolata MIC vrednosti za CIP su bile 0.256 ili 0.512 mg/l, odnosno blizu granične vrednosti za osetljivost od 1 mg/l. Kod NAL osetljivih izolata vrednosti MIC za NAL nisu prelazile 8 mg/l, dok je za NAL rezistentne izolate karakteristično da su MIC vrednosti za NAL veće ili jednake od 128 mg/l. Ove vrednosti su poslužile u definisanju koncentracije NAL (64 mg/l) u podlogama koje su se koristile za selektovanje NAL rezistentnih salmonela u većem uzorku (900 izolata serotipa *S. Enteritidis* i 259 izolata drugih serotipova). Vrednosti MIC za referentni soj *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 uklapale su se u dozvoljene granice za ovaj soj. U Tabeli 11. prikazana je distribucija MIC-ova na NAL i CIP kod NAL osetljivih i NAL rezistentnih izolata.

Tabela 11. Distribucija kombinovanih MIC-ova na NAL i CIP među izolatima osetljivim na NAL i CIP (30 izolata) i među izolatima rezistentnim na NAL i osetljivim na CIP u disk-difuzionoj metodi (9 izolata)

	MIC (mg/l)		Broj izolata (broj protokola izolata)
	NAL	CIP	
Osetljivi na NAL i CIP (30 izolata)	2	0.016	1
	4	0.016	7
	4	0.032	20
	4	0.064	1
	8	0.032	1
	Rezistentni na NAL, osetljivi na CIP (9 izolata)	128	0.256
256		0.256	5 (9568, 501, 75, 228020, 317526)
256		0.512	2 (74, 33641)
512		0.512	1 (7938)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	0.016	

4.1.4. Detekcija mutacija u QRDR regionu *gyrA* gena kod *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL metodom sekvenciranja

Određivanje redosleda nukleotida u QRDR regionu *gyrA* gena i poređenje sekvence sa fragmentom od 261 bp *gyrA* gena soja *Salmonella* Typhimurium NCTC 74 (osetljiv na NAL) omogućilo je uvid u mesto i vrstu mutacija koje čine molekularnu osnovu fenomena smanjene osetljivosti na fluorohinolone kod izolata *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL. Polimorfizam tačkastih mutacija („single nucleotide polymorphism” – SNP) koji postoji kod različitih sojeva bakterija predstavlja sredstvo za tipizaciju izolata, u ovom slučaju *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL.

Umnožavanjem i sekvenciranjem QRDR regiona *gyrA* gena kod svih devet izolata, koji su pokazivali rezistenciju na NAL, otkrivene su tačkaste mutacije na 83. ili 87. poziciji koje su dovele do aminokiselinskih supstitucija (Tabela 12.). Supstitucija na Asp87Asn je prisutna kod sedam izolata, četiri veterinarska i tri humana. Jedan izolat *S.*

Enteritidis nađen u uzorku testa uzetom iz procesa proizvodnje u fabrici biskvita imao je na istom kodonu Asp87Gly supstituciju, a mutacija na 83. kodonu koja dovodi do Ser83Phe supstitucije je nađena samo kod jednog veterinarskog izolata. Nijedan izolat nije imao mutacije na oba lokusa istovremeno.

Tabela 12. Priroda mutacija u QRDR regionu *gyrA* gena pronađena kod devet izolata *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL; **V** – veterinarski izolat; **H** – humani izolat; **N** – izolat iz namirnice

Izolat	Mutacija u kodonu	Aminokiselinska supstitucija
V: 9568	87: GAC→AAC	Asp87Asn
V: 501	87: GAC→AAC	Asp87Asn
V: 74	87: GAC→AAC	Asp87Asn
V: 75	87: GAC→AAC	Asp87Asn
V: 7938	83: TCC→TTC	Ser83Phe
H: 33641	87: GAC→AAC	Asp87Asn
H: 317526	87: GAC→AAC	Asp87Asn
H: 228020	87: GAC→AAC	Asp87Asn
N: 1898*	87: GAC→GGC	Asp87Gly

* Izolat iz fabrike biskvita

Sekvenciranjem QRDR regiona referentnog soja *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (osetljiv na NAL) nisu otkrivene mutacije ni na jednom od ovih lokusa.

4.1.5. Objedinjeni rezultati tipizacije za 60 izolata *S. Enteritidis*

Korišćenjem više metoda tipizacije dobijena je značajno veća moć diskriminacije izolata i omogućeno razlikovanje više genetičkih grupa u ispitivanoj kolekciji *S. Enteritidis* nego kod pojedinačnih metoda.

Kombinovanjem različitih metoda i to poređenjem RAPD profila dobijenih sa četiri različita prajmera, rezistotipizacije i polimorfizma mutacija u QRDR regionu *gyrA* gena, u kolekciji od 60 *S. Enteritidis* izolata otkrivene su 22 genetički različite grupe. U Tabeli 13. prikazane su sve genetičke grupe, odnosno objedinjeni rezultati tipizacije.

Tabela 13. Objedinjeni rezultati tipizacije dobijeni za 60 *S. Enteritidis* izolata. **V** - veterinarski izolati, **H** – humani izolati i **N** - izolati iz namirnica

Izolati	RAPD profili				Osetljivost na antimikrobne lekove	Mutacija u QRDR regionu <i>gyrA</i> gena
	Prajmer P1254	Prajmer OPA-4	Prajmer 23L	Prajmer OPB-17		
V: 775, 350, 533, 494, 70,3073, 921, 1387, 3612, 3557, 3560 H: 227467, 239077, 164067, 204843, 323476, 148323, 173264, 212328 N: 647, 751, 5693, 5814, 641	A	A	A	A	Osetljiv	
V: 9568, 501, 74 H: 33641, 317526	A	A	A	A	NAL	Asp87Asn
N: 1898	A	A	A	A	NAL	Asp87Gly
V: 7938	A	A	A	A	NAL	Ser83Phe
V: 1982	A	A	A	A	AMP	
V: 75	A	A	A	A	AMP CFT NAL TET	Asp87Asn
V: 721, 932	B	A	A	A	Osetljiv	
H: 168347	B	A	A	A	AMP TET SXT	
V: 386, 9635, 631, 1845, 3568 N: 348585	B	A	B	A	Osetljiv	
V: 9097	C	A	A	A	Osetljiv	
H: 247471* N: 349699*,349700 *	D	A	C	A	Osetljiv	
V: 765	D	A	C	C	Osetljiv	
H: 228020	E	A	A	A	NAL	Asp87Asn
N: 337918	A	B	A	A	Osetljiv	
N: 5717	A	B	B	A	Osetljiv	
H: 202617	A	C	B	A	Osetljiv	
H: 85038 N: 2249	A	A	B	A	Osetljiv	
V: 122 H: 201394	A	A	C	A	Osetljiv	
H: 202635	A	A	D	A	AMP	
H: 168335	A	A	E	A	AMP TET SXT	
V: 766, 534	A	A	A	B	Osetljiv	
V: 1443	A	A	A	D	Osetljiv	

* Izolati iz epidemije u hamburgeriji: 247471 – stolica obolelog; 349699 –majonez; 349700 - tartar sos

Najveća grupa se sastojala od 24 izolata ili 40% (11 veterinarskih, osam humanih i pet iz namirnica). Ovu grupu karakterisao je RAPD tip AAAA i osetljivost na sve ispitane antibiotike. Sledeću grupu predstavljalo je šest izolata (pet veterinarskih i jedan iz namirnice) osetljivih na sve antibiotike sa RAPD tipom BABA. Treći tip po brojnosti je RAPD tip AAAA rezistentan na NAL sa identičnom mutacijom na 87 kodonu QRDR regiona, Asp87Asn (tri veterinarska i dva humana izolata). 14 izolata različitog porekla ili 23.3% je predstavljalo 14 jedinstvenih genetičkih grupa. Izolati različitog porekla su bili nasumično raspoređeni po grupama.

4.1.6. *Određivanje diskriminacione moći tipizacionih metoda pomoću indeksa diskriminacije*

Diskriminaciona moć odabranih metoda tipizacije određena je na osnovu broja grupa koje su izdiferencirane i broja izolata u tim grupama. Vrednost indeksa diskriminacije može se kretati od 0 – svi izolati pripadaju istoj grupi, što znači da metoda tipizacije nema nikakvu moć diskriminacije do 1 – svaki izolat pripada različitoj grupi, odnosno metoda je diskriminisala onoliko grupa koliko ima izolata. Što više grupa se otkrije, veća je i diskriminaciona moć metode.

Tabela 14. Indeksi diskriminacije za pojedinačne RAPD prajmere

Prajmeri	D
P1254	0.412
OPA-4	0.098
23L	0.480
OPB-17	0.250

Kombinovani indeks diskriminacije za sva četiri prajmera, odnosno za RAPD tipizaciju svih 60 izolata iznosio je 0.688 (16 genetičkih grupa). Indeksi diskriminacije za svaki RAPD prajmer pojedinačno su pokazani u Tabeli 14. U odabranoj kolekciji od 60 izolata rezistotipizacija je diskriminisala pet grupa sa indeksom diskriminacije $D = 0.372$.

Kada je RAPD tipizacija iskombinovana sa rezistotipizacijom, indeks diskriminacije je porastao na $D = 0.820$ (20 genetičkih grupa). Sa definisanjem mutacija kod izolata rezistentnih na NAL, osam izolata rezistentnih na NAL moglo je da se izdiferencira u tri genetičke grupe, što je podiglo diskriminatornu moć ovog sistema tipizacije na $D = 0.828$. Indeksi diskriminacije za pojedinačne i kombinovane metode tipizacije za izolate različitog porekla prikazani su u Tabeli 15.

Tabela 15. Indeksi diskriminacije pojedinačnih i kombinovanih metoda tipizacije za kategorije veterinarskih, humanih izolata i namirnica

Indeksi diskriminacije D	RAPD tipizacija	Rezistotipizacija	Rezistotipizacija + RAPD tipizacija	Rezistotipizacija + RAPD tipizacija + SNP
Veterinarski izolati	0.660	0.352	0.832	0.839
Humani izolati	0.706	0.542	0.810	0.810
Namirnice	0.758	0.167	0.833	0.833
Ukupno	0.688	0.372	0.820	0.828

4.1.7. Određivanje Dice koeficijenta

Dice koeficijenti govore o nivou srodnosti izolata na osnovu sličnosti RAPD profila. Kada se uporede razlike između profila, za svaki prajmer Dice koeficijent je viši od 0.8, što govori o visokoj srodnosti svih izolata.

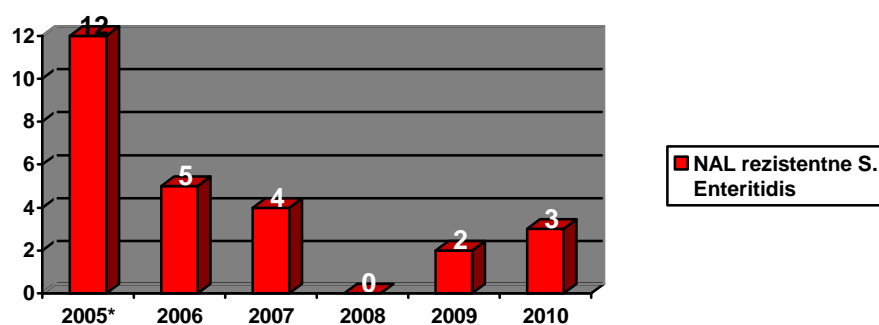
4.2. Ispitivanje prirode rezistencije na NAL i smanjene osetljivosti na fluorohinolone kod *S. Enteritidis* u šestogodišnjem periodu

Otkriće prisustva salmonela rezistentnih na NAL u kolekciji od 60 izolata iniciralo je dalje istraživanje ovog fenomena koji ukazuje na smanjenu osetljivost na fluorohinolone. Ovo istraživanje je uključilo analizu 900 izolata *S. Enteritidis* poreklom od ljudi i namirnica identifikovanih u laboratoriji za koprologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine u periodu 2005.-2010. godine, a zatim i drugih serotipova salmonela u cilju selekcije NAL rezistentnih sojeva.

4.2.1. Analiza zastupljenosti rezistencije na NAL kod *S. Enteritidis*

Metoda selekcije na hranljivoj podlozi sa NAL omogućila je brzu detekciju izolata *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL među velikim brojem izolata.

Od 900 ispitanih salmonela izolovanih iz humanog materijala i iz namirnica u periodu 2005.- 2010. godine, a koji su obuhvaćeni ovom analizom, otkriveno je 26 NAL rezistentnih izolata (2.9%). Distribucija ovih izolata po godinama prikazana je na Slici 10. Zanimljivo je da je u 2008. upadljivo odsustvo izolata *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL. U 2005. godini više od polovine NAL rezistentnih izolata čine *S. Enteritidis* nađene u uzorcima testa uzetim na različitim lokacijama i stadijumima proizvodnje u fabrici biskvita, gde se ogromna količina jaja meša u smesu za biskvit, te je teško razlučiti da li se radi o jednom ili više sojeva.



Slika 10. Zastupljenost NAL rezistentnih *S. Enteritidis* po godinama u periodu 2005.- 2010.

*U 2005. godini sedam izolata je bilo poreklom iz fabrike biskvita

4.2.2. Ispitivanje osetljivosti NAL rezistentnih izolata *S. Enteritidis* na ostale antibiotike

Osetljivost 26 NAL rezistentnih izolata na ostale antibiotike ispitana je disk-difuzionom metodom koristeći panel antibiotika prikazan u Tabeli 6. Kod polovine izolata rezistencija na NAL bila je jedini marker rezistencije (50%), a rezistencija na AMP je najčešće bila udružena sa rezistencijom na NAL (12 izolata ili 46.1%). Tip AMP NAL je bio vrlo uniformno zastupljen po godinama, osim što je u 2005. dominirao tip NAL. Rezistencije na TET i CFT bile su retke i javile su se udružene sa NAL samo u 2006. godini (jedan izolat NAL TET i dva izolata AMP CFT NAL). Tipovi rezistencije prikazani su u Tabeli 16.

Tabela 16. Zastupljenost tipova rezistencije *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL po godinama u periodu 2005.-2010. godina

Tip rezistencije	Ukupno izolata	Godina				
		2005.	2006.	2007.	2009.	2010.
NAL	13	11		2		
AMP NAL	10	1	2	2	2	3
NAL TET	1		1			
AMP CFT NAL	2		2			

4.2.3. Određivanje MIC za NAL i za CIP kod *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL agar-dilucionom metodom

Da bi se detektovao fenomen smanjene osetljivosti na fluorohinolone (MIC CIP ≥ 0.125 mg/l) kod 26 NAL rezistentnih *S. Enteritidis* iz veće kolekcije određene su MIC vrednosti za NAL i CIP.

U Tabeli 17. su prikazane kombinovane vrednosti MIC za NAL i CIP za 26 *S. Enteritidis* izolata gde se kao najčešća kombinacija MIC-ova izdvaja MIC NAL 256 mg/l i MIC CIP 0.256 mg/l, a bila je prisutna kod 53.8% izolata. Zapažen je i jedan soj sa MIC CIP 0.064 mg/l, što se ne smatra smanjenom osetljivošću prema usvojenim kriterijumima. Kod ostalih izolata osetljivost na CIP je smanjena, ali ispod granične

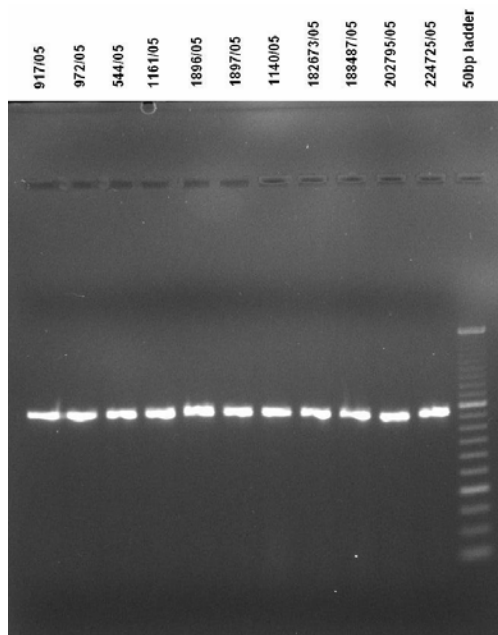
vrednosti od 1 mg/l. MIC vrednosti kod referentnog *E. coli* ATCC 25922 padaju u opseg dozvoljenih vrednosti za ovaj soj.

Tabela 17. Distribucija kombinovanih MIC vrednosti za NAL i CIP kod 26 izolata *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL detektovanih u periodu 2005.-2010. godina

<i>S. Enteritidis</i> rezistentne na NAL	MIC (mg/l)		Broj izolata
	NAL	CIP	
	128	0.064	1
	128	0.256	4
	256	0.125	2
	256	0.256	14
	512	0.256	4
	1024	0.512	1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2	0.008	

4.2.4. Detekcija mutacija u QRDR regionu *gyrA* gena kod *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL metodom sekvenciranja

Region QRDR *gyrA* gena kod 26 NAL rezistentnih izolata je, nakon izolacije njihove DNK umnožen PCR metodom. Umnoženi QRDR fragmenti, razdvojeni na agaroznom gelu, prikazani su na Slici 11.



Slika 11. Elektroforeza PCR fragmenata dobijenih nakon umnožavanja QRDR regiona *gyrA* gena kod NAL rezistentnih *S. Enteritidis* izolata pomoću prajmera STGYRA1/STGYRA12; L500 - marker molekulske mase 100-1000bp (Fermentas).

U Tabeli 18. prikazani su rezultati sekvenciranja QRDR regiona *gyrA* kod svih 26 *S. Enteritidis*, odnosno pozicije mutacija i vrste aminokiselinskih supstitucija koje su ove mutacije izazvale, kao i MIC vrednosti za NAL i CIP pojedinačnih izolata.

Tabela 18. Mutacije u QRDR regionu *gyrA* gena otkrivene kod 26 NAL rezistentnih *S. Enteritidis* izolata, aminokiselinske supstitucije i MIC za NAL i CIP

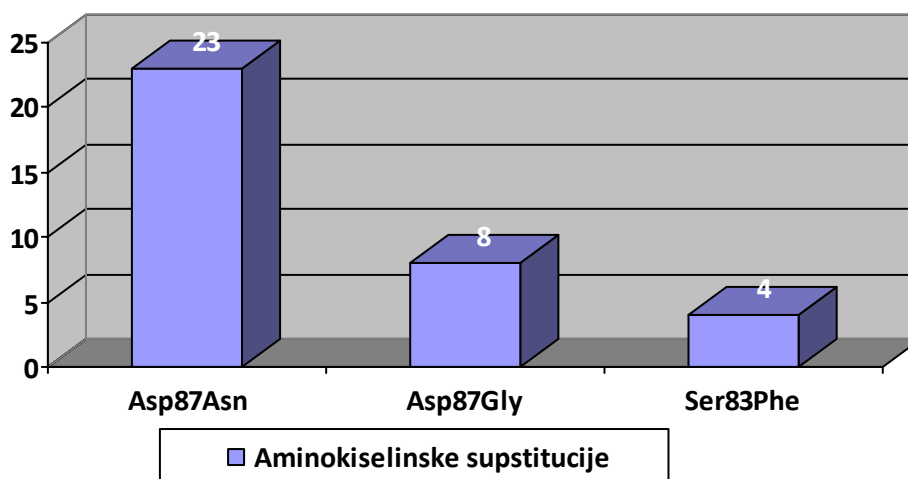
Izolat Broj protokola/ godina	Pozicija mutacije		Aminokiselinska supstitucija	MIC (mg/l)	
	Kodon 83 (NAL osetljiv =TCC)	Kodon 87 (NAL osetljiv = GAC)		NAL	CIP
917/05*		AAC	Asp87Asn	256	0.256
972/05*		AAC	Asp87Asn	256	0.256
544/05*		AAC	Asp87Asn	512	0.256
1161/05*		AAC	Asp87Asn	256	0.256
1896/05*		AAC	Asp87Asn	128	0.256
1897/05*		AAC	Asp87Asn	256	0.256
1140/05*		AAC	Asp87Asn	512	0.256
182673/05		AAC	Asp87Asn	256	0.256
188487/05		GGC	Asp87Gly	128	0.256
202795/05		GGC	Asp87Gly	256	0.256
224725/05		AAC	Asp87Asn	256	0.256
260110/05		GGC	Asp87Gly	256	0.256
2989/06	TTC		Ser83Phe	256	0.256
120599/06	TTC		Ser83Phe	1024	0.512
207096/06		GGC	Asp87Gly	128	0.256
220035/06		AAC	Asp87Asn	256	0.256
337167/06		GGC	Asp87Gly	128	0.064
91766/07		AAC	Asp87Asn	256	0.256
110574/07	TTC		Ser83Phe	128	0.256
138591/07		AAC	Asp87Asn	512	0.256
252107/07		AAC	Asp87Asn	512	0.256
54979/09		AAC	Asp87Asn	256	0.256
129066/09		AAC	Asp87Asn	256	0.256
122658/10		GGC	Asp87Gly	256	0.125
149323/10		GGC	Asp87Gly	256	0.125
248292/10		AAC	Asp87Asn	256	0.256

*Izolati iz fabrike biskvita

4.3. Objedinjeni rezultati ispitivanja prirode mutacija kod svih *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL u ovom istraživanju

Kada se analiziraju svi NAL rezistentni izolati *S. Enteritidis* otkriveni u ovom istraživanju, nađene su tri vrste mutacija u QRDR regionu *gyrA* gena kod ukupno 35 NAL rezistentnih *S. Enteritidis* izolata, i to na 87. ili 83. kodonu ovog regiona. Kod svakog izolata nađena je samo po jedna mutacija na jednom od ova dva lokusa, odnosno nije bilo dvostrukih mutacija. Kod 88.6% izolata mutacija se desila na 87. kodonu. Najučestalija supstitucija kod svih NAL rezistentnih *S. Enteritidis* je bila Asp87Asn. Ona je bila uzrok rezistencije na NAL kod 65.7% izolata, sledi Asp87Gly nađena kod 22.8% izolata, a kod 11.4% izolata mutacija je bila na 83. kodonu uzrokujući Ser83Phe supstituciju.

Učestalost različitih mutacija kod svih 35 NAL rezistentnih *S. Enteritidis* izolata otkrivenih u ovom istraživanju: devet izolata iz kolekcije od 60 (pet poreklom od pilića, jednog iz namirnice i tri humana) i 26 izolata iz veće kolekcije od 900 (osam iz namirnice i 18 humanih) prikazana je na Slici 12.



Slika 12. Zastupljenost aminokiselinskih supstitucija odgovornih za rezistenciju na NAL kod 35 *S. Enteritidis* izolata.

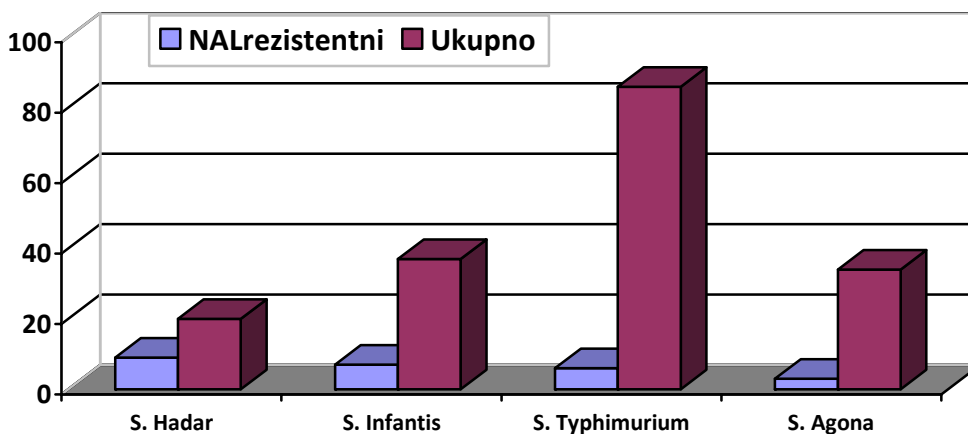
Od osam izolata iz fabrike biskvita, sedam je imalo Asp87Asn supstituciju, dok je jedan imao Asp87Gly supstituciju. Ovaj izolat sa različitom supstitucijom nalazio se u prvobitnoj kolekciji od 60 nasumično odabranih izolata *S. Enteritidis*.

4.4. Rezistencija na NAL kod različitih serotipova salmonela

Zastupljenost rezistencije na NAL kod drugih serotipova salmonela detektovana je testiranjem na selektivnoj podlozi sa NAL svih izolata *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (*S.*) identifikovanih do nivoa serotipa sem serotipa Enteritidis. Izolati su identifikovani u laboratoriji za koprologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine u periodu 2005.-2010. godine i uključuju i humane i izolate poreklom iz namirnica.

4.4.1. Analiza rezistencije na NAL različitih serotipova salmonela

Analizom je obuhvaćeno 259 salmonela koje su pripadale drugim serotipovima osim *S. Enteritidis*. Od 24 identifikovana serotipa (izuzimajući *S. Enteritidis*), rezistencija je otkrivena kod četiri serotipa. Ovim ispitivanjem je otkriveno ukupno 25 izolata rezistentnih na NAL ili 9.7% od ukupno ispitanih. Od toga je devet pripadalo serotipu *S. Hadar*, sedam su bile *S. Infantis*, šest *S. Typhimurium* i tri *S. Agona*. Na Slici 13. prikazan je udeo izolata rezistentnih na NAL kod različitih serotipova.



Slika 13. Učestalost NAL rezistentnih izolata kod različitih serotipova salmonela

Iako je *S. Typhimurium* drugi najčešći serotip posle *S. Enteritidis* izolovan kod nas, rezistencija na NAL je bila najučestalija među izolatima *S. Hadar* (45% izolata), a zatim kod *S. Infantis* (18.9% izolata). Kod *S. Agona* 8.8% izolata je bilo NAL rezistentno, dok ih je kod *S. Typhimurium* bilo 7%.

4.4.2. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike različitih serotipova salmonela rezistentnih na NAL

Udruženost rezistencije na NAL sa drugim markerima različitih serotipova salmonela, ispitana je testiranjem na odabrani panel antibiotika (Tabela 5.). U ovoj grupi nije bilo izolata koji su bili rezistentni samo na NAL (Tabela 19.). Rezistencija na NAL najčešće je bila udružena sa rezistencijom na AMP (kod 23 izolata) i na TET (kod 20 izolata). Višestruka rezistencija na tri ili četiri antibiotika je nađena kod većine izolata (76% ili 19 izolata). AMP NAL TET rezistotip je bio najučestaliji (40% ili deset izolata) i nađen je kod sva četiri serotipa. Rezistencija na CFT karakteristična je samo za serotip Hadar, a na SXT je nađena kod serotipova *S. Typhimurium* i *S. Infantis*.

Tabela 19. Tipovi rezistencije NAL rezistentnih izolata različitih serotipova salmonela u periodu 2005.- 2010. godina

Godina	Serotip	Broj protokola	Tip rezistencije
2005.	<i>S. Hadar</i>	124824	AMP CFT NAL TET
	<i>S. Hadar</i>	124930	AMP CFT NAL TET
	<i>S. Hadar</i>	151462	AMP CFT NAL
	<i>S. Hadar</i>	204078	AMP NAL
	<i>S. Hadar</i>	324536	AMP NAL
2006.	<i>S. Hadar</i>	17670	AMP CFT NAL TET
	<i>S. Infantis</i>	33859	AMP SXT NAL TET
	<i>S. Hadar</i>	75984	AMP NAL
	<i>S. Agona</i>	157039	AMP NAL
2007.	<i>S. Typhimurium</i>	56415	AMP SXT NAL TET
	<i>S. Typhimurium</i>	56416	AMP SXT NAL TET
	<i>S. Infantis</i>	236430	NAL TET
	<i>S. Agona</i>	245052	NAL TET
	<i>S. Agona</i>	287998	AMP NAL TET
2008.	<i>S. Infantis</i>	208664	AMP NAL TET
	<i>S. Infantis</i>	287878	AMP NAL TET
	<i>S. Typhimurium</i>	363582	AMP CFT NAL TET
2009.	<i>S. Infantis</i>	270494	AMP NAL TET
	<i>S. Typhimurium</i>	320673	AMP SXT NAL TET
	<i>S. Hadar</i>	397968	AMP NAL TET
2010.	<i>S. Infantis</i>	89585	AMP NAL TET
	<i>S. Typhimurium</i>	152136	AMP NAL TET
	<i>S. Infantis</i>	164466	AMP NAL TET
	<i>S. Typhimurium</i>	162794	AMP NAL TET
	<i>S. Hadar</i>	219177	AMP NAL TET

5. DISKUSIJA

Prema podacima sa raznih kontinenata *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Enteritidis (*S. Enteritidis*) je najučestaliji serotip kod ljudi u većem delu Azije, Evropi i Južnoj Americi a sledi ga *S. Typhimurium*, dok je u Severnoj Americi i Africi redosled obrnut (Xia et al., 2009). Na evropskom nivou, *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* zajedno čine oko tri četvrtine potvrđenih slučajeva salmoneloza (*S. Enteritidis* 64% u 2007. do 52% u 2009., a *S. Typhimurium* od 16% u 2007. do 23% u 2009.). U istom periodu dominacija *S. Enteritidis* je u Južnobačkom okrugu u mnogo izraženija (93% u 2007. do 81% u 2009. od svih salmonela), a zastupljenost *S. Typhimurium* mnogo manja (2% u 2007. do 5% u 2009.) kod ljudi nego u Evropskoj Uniji. To može biti posledica prehrambenih navika, odnosno češće upotrebe sirovih jaja za pravljenje domaćih majoneza, sosova, krema i kolača u našoj ishrani nego u zemljama Evropske unije, gde se više koriste gotovi proizvodi. Incidenca salmoneloza u okruženju vrlo varira, od Grčke sa 4.3/100000 do Slovenije sa 118.1/100000 i Mađarske sa 134.6/100000 stanovnika (EFSA and ECDC, 2011). Iz toga proizilazi da je prosečna incidenca u Vojvodini za isti period 2007-2009. od 26.3/100000 (IZJZV, 2008; IZJZV, 2009; IZJZV, 2010) relativno niska, čak niža od Danske (inc. 33.1/100000), koja ima najrazvijeniji sistem nadzora i kontrole nad salmonelama. Iako je već pomenut trend opadanja incidence u Vojvodini, ova povoljna slika je odraz još uvek nedovoljno razvijenog sistema mikrobiološke identifikacije, odnosno potvrde i prijavljivanja salmoneloza, jer svakako nije dostignut evropski nivo primene higijensko-epidemioloških mera i kontrole u lancu proizvodnje, distribucije i konzumiranja hrane.

Kod izolata salmonela poreklom od živine sa farmi iz okruženja (Južnobački i Sremski okrug), u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ 2007. godine *S. Enteritidis* je bila zastupljena sa 71%, na drugom mestu je bila *S. Infantis* (16%) i na trećem *S. Typhimurium* (5%). Od tada zastupljenost *S. Infantis* raste, pa je 2010. njen udeo među salmonelama nađenim kod živine skoro 40%, odmah iza *S. Enteritidis* (56%). Sa druge strane, *S. Typhimurium* je pala na manje od 3% svih izolovanih salmonela, a u jednakom procentu je nađena i *S. Hadar* (Stojanov et al., 2008; Stojanov et al., 2010; Stojanov et al., 2011). Rastuća učestalost *S. Infantis* kod živine verovatno je posledica trendova u okruženju, jer je *S. Infantis* dominantna kod brojlera i ljudi u

Mađarskoj i kod brojlera u Rumuniji 2009. godine. Sumirajući rezultate istraživanja u zemljama Evropske Unije, Evropsko telo za bezbednost hrane („European Food Safety Authority“ - EFSA) izveštava da je *S. Enteritidis* ipak najčešće izolovani serotip kod pilića u 9 od 15 zemalja Evropske Unije u 2009. godini, a sledi ga *S. Typhimurium*. U zemljama EU postoji zakonska obaveza primene programa kontrole salmonela pri uzgoju živine od 1993. godine koji se odnose na kontrolu celog lanca ishrane od farme do trpeze. Ove mere dovele su do smanjenja broja zaraženih jata i jaja sa *S. Enteritidis* a to je dovelo do pada incidence humanih oboljenja i epidemija izazvanih *S. Enteritidis* za 44% u periodu 2007.-2009. godine. Uprkos generalnom trendu smanjenja slučajeva *S. Enteritidis*, Austrija i Italija beleže značajan porast učestalosti *S. Enteritidis* kod živine (EFSA and ECDC, 2011a). U SAD 2005. godine kod pilića je najčešća bila *S. Heidelberg*, slede *S. Kentucky*, *S. Typhimurium*, a tek četvrta je *S. Enteritidis* (Foley and Lynne, 2008).

Što se tiče namirnica, oko trećine salmonela nalaženih u kontaminiranim truplima brojlera u EU 2008. godine su bile *S. Infantis*, a slede *S. Enteritidis* i *S. Kentucky*, dok je tek na četvrtom mestu bila *S. Typhimurium*, podjednako učestala kao i *S. Bredeney* i *S. Virchow*, sa značajnim razlikama među zemljama EU (EFSA and ECDC, 2011a).

Razlike u zastupljenosti serotipova među živinom i ljudima na području Južnobačkog okruga su evidentne. Iako je *S. Enteritidis* najzastupljenija i kod pilića i kod ljudi, ona je dominantniji serotip među ljudima. Sa druge strane, kod ljudi je *S. Typhimurium* zauzela drugo mesto sem 2006. godine kada je došlo do epizode klonalne ekspanzije *S. Agona*, dok je kod živine na trećem mestu po učestalosti. *S. Infantis* koja je česta kod živine, među ljudima je od osmog mesta po učestalosti u 2005. godini došla na to da deli drugo mesto sa *S. Typhimurium* u 2010. godini. Međutim, ta učestalost nije prelazila 7%, što je mnogo manje nego kod živine. Ova neslaganja se mogu objasniti načinom ishrane ljudi u Vojvodini, odnosno većom verovatnoćom da će se inficirati konzumacijom namirnica koje sadrže sirova jaja (u kojima preovlađuje serotip *Enteritidis*) nego mesom ili iznutricama, koji se najčešće termički obrađuju (u kojima se mogu naći i drugi serotipovi). Na ovaj način *S. Enteritidis* češće pronalazi put do ljudi u odnosu na ostale serotipove. To je i dokazano u istraživanju veze između tipa, odnosno porekla namirnice i bakterija koje se mogu naći u njima. Naime, *S. Enteritidis* je

najčešće pronađena u jajima, dok su ostali serotipovi salmonela češće nalaženi u živinskom i drugom mesu (Greig and Ravel, 2009). S obzirom na dominaciju serotipa Enteritidis kao najznačajnijeg uzročnika salmoneloza u Južnobačkom okrugu, fokus ovog istraživanja bio je na *S. Enteritidis*.

Imajući u vidu činjenicu da su izvori, putevi i načini širenja salmonela u lancu ishrane neraskidivo vezani za rizike inficiranja i oboljevanja ljudi, epidemiološka istraživanja moraju uključivati praćenje i tipizaciju ovih patogena kako kod ljudi tako i kod životinja namenjenih ljudskoj ishrani u svim stadijumima u procesima proizvodnje i distribucije namirica životinjskog porekla. Intenzivna nacionalna i međunarodna trgovina hranom među zemljama koje imaju različite nivoe higijene u proizvodnji životinja i hrane animalnog porekla ubrzale su uvođenje i širenje novih sojeva salmonela u pojedinim zemljama. Stoga je primena pouzdanih i dovoljno diskriminativnih metoda tipizacije sojeva postala imperativ. Pri tome je nivo genetičkog polimorfizma u populaciji ključni činilac za molekularnu epidemiologiju. Zbog činjenice da serotip Enteritidis čine sojevi visoko klonalne populacione strukture (Zheng et al., 2011), potrebne su vrlo moćne tehnike za detekciju malih razlika u genotipovima izolata. Do sada ne postoji konsenzus koje su to najbolje metode tipizacije za salmonele. Kada se razmatra izbor molekularne metode tipizacije koje će se uvesti u laboratoriju potrebno je uzeti u razmatranje mnoge kriterijume kao što su lakoća izvođenja, lakoća interpretacije, moć diskriminacije, vreme trajanja, reproducibilnost, troškovi (Olive and Bean, 1999). Iako pojedine tehnike mogu imati veliku diskriminativnu moć i dobru reproducibilnost, njihova kompleksnost i teškoća interpretacije rezultata, kao i troškovi uvođenja mogu biti problematični. U takve metode spadaju metoda PFGE („pulsed-field gel electrophoresis“), koju mnogi autori smatraju zlatnim standardom kada je u pitanju diskriminacija salmonela, kao i MLVA („multiple locus variable number of tandem repeats analysis“), metoda koja u novije vreme parira PFGE metodi u tipizaciji salmonela, naročito *S. Enteritidis* (Boxrud et al., 2007), zbog standardizovanosti, reproducibilnosti i uporedivosti tipova u internacionalnim bazama podataka. Iako su PFGE i MLVA metode koje daju dobre rezultate u širim populacionim studijama velikih kolekcija izolata salmonela, često nisu dovoljno diskriminativne same za sebe kada se pokušaju tipizirati manje kolekcije izolata ispod nivoa serotipa. Kada je u pitanju *S. Enteritidis*, primena PFGE je samo u kombinaciji sa više drugih metoda

tipizacije kao što je RAPD („randomly amplified polymorphic DNA“), fagotipizacija ili rezistotipizacija imala zadovoljavajuću diskriminativnu moć ispod nivoa serotipa (Laconcha et al., 1998; Biendo et al., 2003; Fernandez et al., 2003).

Za rutinski rad u kliničkim laboratorijama potrebne su pre svega metode tipizacije koje su brze, lako se izvode, i ne zahtevaju skupu opremu i reagens. Tipizacija bazirana na PCR („polymerase chain reaction“) tehnologiji zadovoljava pomenute kriterijume jer je već izvesno vreme dostupna u mnogim laboratorijama, a cene reagenasa su sve niže, te je mogućnost i svrsishodnost uspostavljanja sistema PCR tipizacije salmonela bila predmet našeg istraživanja.

ERIC-PCR („enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence“) tehnika korišćena za tipizaciju salmonela je pokazala manju diskriminativnu moć od ostalih metoda u mnogim studijama (Millemann et al., 1996; López-Molina et al., 1998; Lim et al., 2005). S druge strane, mnoga istraživanja ističu RAPD tipizaciju kao vrlo pogodnu metodu za diskriminaciju salmonela jer je brza i laka za izvođenje, a u korišćenjem različitih prajmera i u kombinaciji sa drugim tehnikama tipizacije daje dobre rezultate. Sam izbor RAPD prajmera za pojedine bakterijske vrste je presudan za dobijanje dovoljne diskriminativnosti. RAPD metodologiju su na salmonelama primenili mnogi autori (Millemann et al., 1996; Landeras et al., 1998; Ling et al., 1998; Chansiripornchai et al., 2000; De Cesare et al., 2001; Maré et al., 2001; Khoodoo et al., 2002; Biendo et al., 2003; Lim et al., 2005; Morshed et Peighambari, 2010; Smith et al., 2011). U radu del Cerra i koautora (del Cerro et al., 2002) RAPD tipizacija se pokazala kao diskriminativnija u tipizaciji ispod nivoa serotipa nego PCR ribotipizacija. Mnogi autori poput ovih primenjuju metode tipizacije na kolekciji koja uključuje više serotipova, pa samim tim dobijaju i veću diskriminativnu moć metode (Lim et al., 2005; Smith et al., 2011). Međutim, pravi je izazov diskriminisati izolate unutar serotipa. Zbog manjeg diverziteta *S. Enteritidis*, metode tipizacije pokazuju manju diskriminativnost. Lin i saradnici (1996) su ispitivali 65 RAPD prajmera i selektirali šest prajmera koji su pokazali najveću diskriminativnu moć za *S. Enteritidis* izolate. Navedeni autori ustanovili su sistem RAPD tipizacije *S. Enteritidis* koji je kasnije korišćen u mnogim studijama, uključujući i ovaj rad (u ovom radu su koriscena četiri od šest pomenutih prajmera). RAPD tipizacija je u istraživanju Lin i saradnika diskriminisala više genetičkih grupa nego fagotipizacija, ribotipizacija i PFGE tipizacija, a postignuta je i

zadovoljavajuća reproducibilnost. Tipizacija sa pet od šest istih prajmera (P1254, 23L, OPA-4, OPB-15, OPB-17) korišćena je i u radovima u Urugvaju i u Koreji (Betancor et al., 2004; Choi et al., 2005) i pokazala se kao efikasna i reproducibilna metoda pri tipizaciji *S. Enteritidis* izolata iz pilića i ljudi, koja je uspela da diskriminiše genetičke grupe unutar fagotipova. RAPD sistem tipizacije sa prajmerima OPB-17 i P 1254 je imao mnogo veću diskriminacionu moć ($D=0.664$) nego automatizovana ribotipizacija sa 3 restrikciona enzima ($D=0.082$) u analizi izolata *S. Enteritidis* iz pilića i živinskih namirnica u Italiji. *S. Enteritidis* su pokazale znatno manji polimorfizam nego *S. Typhimurium* (De Cesare et al., 2001). Pored brzine i jednostavnosti kojom se dobijaju rezultati, RAPD tipizacija ima prednost u odnosu na ribotipizaciju i zato što se detektuju razlike u celom genomu, dok ribotipizacija analizira samo razlike u kopijama vrlo konzerviranih ribozomalnih gena tj. operona i njihovih restrikcioniha mesta. Problemi sa reproducibilnošću koji mogu da postoje kod RAPD tipizacije mogu se prevazići optimizacijom PCR uslova i standardizacijom koncentracije DNK uzoraka (Pereira et al., 2008).

Prema dostupnoj literaturi, u Srbiji i zemljama u okruženju dosada nisu sprovedene studije koje bi obuhvatile izolate iz pilića, ljudi i namirnica živinskog porekla u pokušaju da se ispita njihova eventualna klonalna povezanost kao dokaz cirkulacije sojeva kroz lanac ishrane, te je ovo prvo istraživanje u tom pravcu. Takođe nisu nađeni podaci da je RAPD tipizacija korišćena za utvrđivanje nivoa diverziteta među izolatima *S. Enteritidis* različitog porekla u Srbiji.

Prvi deo istraživanja fokusirao se na karakterizaciju kolekcije od 60 nasumično odabranih izolata *S. Enteritidis* poreklom od živine, ljudi obolelih od salmoneloze i namirnica živinskog porekla identifikovanih na području Južnobačkog okruga u periodu 2005.-2006. godine. Karakterizacija je podrazumevala tipizaciju izolata metodom RAPD-PCR, rezistotipizaciju i određivanje polimorfizma mutacija u regionu *gyrA* gena koji determiniše rezistenciju na hinolone (QRDR).

U našem istraživanju kombinacija RAPD tipizacije, rezistotipizacije i polimorfizma mutacija u QRDR regionu *gyrA* gena je pokazala zadovoljavajuću diskriminatornu moć ($D = 0.828$), razdvojivši 60 nasumično odabranih izolata u 22 genetičke grupe. Međutim, 40% izolata iz sve tri kategorije pripadalo je glavnoj genetičkoj grupi osetljivoj na sve antibiotike, koju je karakterisao RAPD tip AAAA

(Tabela 13). Ostali izolati bili su nasumično raspoređeni u preostalim grupama. Dobijeni rezultati govore o cirkulaciji genetički vrlo sličnih izolata *S. Enteritidis* kroz lanac hrane, što potvrđuje i činjenica da je Dice koeficijent preko 0.8 za svaki korišćeni RAPD prajmer (profili se razlikuju u 1-2 trake), a to ukazuje na verovatnu klonalnu povezanost izolata. Kada se primenjuje RAPD tehnika tipizacije, obično se koristi više prajmera u cilju dobijanja bolje diskriminatorne moći. Tako je i u ovom istraživanju svaki RAPD prajmer za sebe razlikovao svega tri do pet tipova i imao nizak indeks diverziteta (Tabela 14), ali kombinacija sva četiri prajmera podigla je broj tipova na 16 ($D = 0.688$).

Štaviše, RAPD tipizacijom sa četiri prajmera epidemiološki povezani izolati iz epidemije u hamburgeriji (dva iz namirnica i jedan iz stolice obolelog koji je jeo u toj hamburgeriji) dali su jedinstveni tip DACA, što znači da je ova metoda uspela da izdvoji pomenute izolate od ostalih sporadičnih *S. Enteritidis*. Nalaz istog soja *S. Enteritidis* kod pacijenta i u majonezu i tartar sosu govori o tome da se epidemija u hamburgeriji desila verovatno preko kontaminiranih jaja. Epidemije salmoneloza u restoranima predstavljaju značajan faktor rizika za oboljevanje u SAD, moguće su i putem dasaka za meso, pribora i ruku kontaminiranih prilikom pripreme zaraženih namirnica (Kimura et al., 2004).

U našem istraživanju jaja su najverovatnije bila izvor kontaminacije u tehnološkom procesu proizvodnje keksa u fabrici biskvita. Zabeležena su tri genetički različita soja *S. Enteritidis* (izolati 641, 1898 i 2249) koja su izolovana iz rezervoara i iz testa za biskvit.

Nalaz različitih sojeva *S. Enteritidis* u organima jednodnevnih pilića sa različitih farmi (izolati 7938, 70, 75, 1982, 3073, 9097, 386, 766, 3557 i 3560) govori o tome koliko je kontaminacija *S. Enteritidis* veliki problem u živinarskoj industriji i sledstveno tome najčešći uzrok epidemija uzrokovanih *S. Enteritidis* među ljudima (Gast and Holt, 1998). Kada su u pitanju veterinarski izolati, nije bilo moguće isključivo vezati sojeve za pojedine farme odakle je identifikovano više *S. Enteritidis* izolata, sem u slučaju žabaljske farme gde su oba okarakterisana izolata pripadala soju BABA-osetljiv. Ali, taj soj se javio i kod dva izolata u Šidu i jednog u Beškoj. Od pet izolata sa novosadske farme svaki je pripadao različitoj genetičkoj grupi, iz Bača sva tri izolata su iz različitih grupa, kao i u Bečeju. Sa šidske farme dva izolata su predstavljala jedan soj, a treći se

razlikovao. U slučaju farme u Staroj Pazovi od pet izolata tri je pripadalo najčešćem soju AAAA-osetljiv, a dva su predstavljala posebne sojeve. Dobijeni podaci govore o tome da na farmama cirkuliše više sojeva *S. Enteritidis*, a čak i pilići mogu biti kolonizovani sa više sojeva *S. Enteritidis* istovremeno (Mayrhofer et al., 2004). Na našim farmama pilića se nažalost nedovoljno primenjuju savremeni načini gajenja i adekvatne higijensko-sanitarne mere, te se razna jata i uzrasti gaje paralelno i dolazi do šire kontaminacije različitim sojevima salmonela. Međutim, i na farmama pilića koje praktikuju savremeni „all in – all out“ sistem koji podrazumeva gajenje pilića u turnusima i potpunu dezinfekciju farmi između turnusa, moguće je da se soj unet u jednom turnusu prenosi na piliće iz sledećeg turnusa usled nedovoljne dezinfekcije, preko hrane i odeće, glodara, kokošijih grinja itd. Nedavno je dokazano da endemske zajednice bakteriofagnih protozoa mogu da perzistiraju na farmama brojlera tako što u nepovoljnim uslovima formiraju ciste, što ih čini otpornim na dezinfekciju. Mnoge od ovih vrsta su poznati vektori za patogene bakterije, pa i salmonele, te je ovo verovatan način kako pojedini sojevi salmonela opstaju na farmama duže vremena (Baré et al., 2011). Liljebjelke i saradnici (2005) dokazali su da salmonele izolovane iz raznih uzoraka sa farme brojlera, živinske hrane, miševa uhvaćenih na farmi, kao i pilećih trupova sa farme predstavljaju isti soj, odnosno PFGE tip. Takođe je moguće da se sa novim turnusom u farmu unosi novi soj koji koegzistira sa starim. Dominantni soj AAAA-osetljiv je nađen na devet farmi u različitim mestima, kod humanih izolata i u namirnicama vrlo različitog porekla i iz različitih godina. To se može objasniti cirkulacijom visoko srodnih *S. Enteritidis* u ljudskoj i živinskoj populaciji u Južnobačkom okrugu, ali i možda ograničenim mogućnostima tipizacije *S. Enteritidis* generalno.

Iz rezultata ovog istraživanja se jasno vidi koliko je kombinovanje raznih tipizacionih tehnika povećalo moć diskriminacije sojeva *S. Enteritidis*. Kombinacija RAPD profila sa rezistotipizacijom je očekivano imala veću diskriminativnu moć nego ove dve metode odvojeno ($D = 0.820$). Ona je dominantni RAPD tip AAAA diskriminisala u četiri nove genetičke grupe (AAAA-osetljivi, AAAA-NAL, AAAA-AMP i AAAA-AMP CFT NAL TET), a tip BAAA razdvojila u dve grupe (BAAA-osetljiv i BAAA-AMP TET SXT). Analiza prirode mutacija u QRDR regionu u ovom istraživanju pomogla je i u diskriminaciji nekoliko sojeva. Polimorfizam mutacija u

QRDR regionu („single nucleotide polymorphism“ - SNP) kao tipizaciona metoda ima svoja ograničenja jer može da diskriminiše samo sojeve koji nose mutaciju u ovom regionu (Ji and Manak, 2002). SNP metoda nije doprinela diferencijaciji više sojeva od kombinacije RAPD i rezistotipizacije kod humanih izolata i *S. Enteritidis* iz namirnica ($D = 0.810$ i $D = 0.833$). Ipak, polimorfizam je postojao i SNP metoda je RAPD-rezistotip AAAA-NAL diskriminisala u tri genetičke grupe (AAAA-NAL-Asp87Asn, AAAA-NAL-Asp87Gly i AAAA-NAL-Ser83Phe). Time je i indeks diverziteta u kombinaciji tri metode povećan sa 0.820 na 0.828, razlikujući 22 genetičke grupe među 60 izolata *S. Enteritidis*.

Određivanje markera rezistencije u kolekciji od 60 nasumično odabranih izolata *S. Enteritidis* je sa jedne strane poslužilo kao metod tipizacije izolata, a sa druge strane je imalo za cilj utvrđivanje učestalosti pojave rezistencije na antibiotike kod *S. Enteritidis* na području Južnobačkog okruga. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike pokazuju da je od 60 izolata iz kolekcije 78% (47 izolata) osetljivo na sve testirane antibiotike i da je taj procenat sličan i za veterinarske i za humane izolate. Samo 5% (tri izolata) *S. Enteritidis* je bilo višestruko rezistentno na tri odnosno četiri antibiotika istovremeno, a 15% (devet izolata) na nalidiksičnu kiselinu (NAL). Najčešća je bila rezistencija upravo na NAL, zatim na ampicilin (AMP) (8.3%), na tetraciklin (TET) (5%), a jedan soj je bio rezistentan na cefalotin (CFT) (1.7%). Ukupno gledano (Tabele 9. i 10.), učestalost rezistencije kod *S. Enteritidis* je još uvek relativno niska na području Južnobačkog okruga i to kod sve tri kategorije izolata (pilići, ljudi, namirnice). Nametnulo se pitanje da li su dobijene učestalosti realne ili su odraz slučajno odabranog uzorka. Dobijeni rezultati na uzorku od 60 izolata su inicirali šira istraživanja rezistencije, naročito rezistencije na hinolone na većem uzorku od 900 *S. Enteritidis*.

Kada su u pitanju humani izolati, u laboratoriji Odeljenja za koprologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine rutinski se ne testira osetljivost svih identifikovanih salmonela na antibiotike zato što se nekomplikovane intestinalne lokalizacije salmoneloze retko leče antibioticima. Po zahtevu kliničara uradi se mali broj antibiograma (testiranja osetljivosti na antibiotike disk-difuzionom metodom). Među 900 ispitanih *S. Enteritidis* urađeno je 254 antibiograma (interni podaci laboratorije za koprologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine).

U većem uzorku, među 900 izolata *S. Enteritidis* iz ljudi i namirnica nađeno je svega 4.3% (11 izolata) sa nekim markerom rezistencije. Zabeležene su rezistencije na AMP, TET i kotrimoksazol (SXT). Svega jedan izolat je bio rezistentan na tri antibiotika (AMP SXT TET). Najčešća je bila rezistencija na AMP (3.5%). Učestalost rezistencije na TET ne može se realno sagledati jer je testirana kod svega 17 izolata (otkriveno je dva rezistentna), budući da se TET ne primenjuje u kliničkoj praksi za lečenje ljudi, te ne ulazi u standardni panel antibiotika prilikom testiranja osetljivosti. Kao marker rezistencije TET je značajan zbog primene u veterinarskoj medicini i verovatno je da bi se ova rezistencija češće nalazila da se redovno ispituje osetljivost *S. Enteritidis* na TET. U većoj kolekciji od 900 izolata *S. Enteritidis* nađena je manja zastupljenost rezistentnih sojeva i trostruko manja učestalost rezistencije na AMP nego među humanim izolatima iz manje kolekcije od 60 izolata.

Prilikom ispitivanja osetljivosti na antibiotike u prvobitnoj kolekciji od 60 izolata *S. Enteritidis* izolovanih iz pilića, ljudi i namirnica pronađen je relativno visok procenat izolata rezistentnih na NAL u periodu 2005.-2006. godine (15%), a samo kod ljudi i namirnica taj procenat iznosio je 13.3%. Pojava NAL rezistentnih *S. Enteritidis* i na području Južnobačkog okruga je pokazatelj prisutne opasnosti od smanjene osetljivosti salmonela na fluorohinolone. Prema zajedničkom naučnom mišljenju Evropskog centra za kontrolu bolesti („European Centre for Disease Prevention and Control“ – ECDC), Evropskog tela za bezbednost hrane („European Food Safety Authority“ – EFSA) i Evropske agencije za lekove, rezistencija na hinolone (uključujući fluorohinolone) i rezistencija na cefalosporine (uključujući treću i četvrtu generaciju) su prepoznati kao najznačajnije opasnosti za javno zdravlje kada su salmonele u pitanju (EFSA and ECDC, 2011b). U Srbiji ne postoji harmonizovani sistem praćenja zastupljenosti rezistencije na antibiotike kod salmonela poreklom od životinja, u namirnicama i kod ljudi. Takođe ne postoji ni sistem za praćenje potrošnje antibiotika u živinarstvu, veterini i u humanoj medicini, kao vrlo važan činilac za pojavu i širenje rezistentnih sojeva među ljudima i pilićima. Ovo je prvo istraživanje u Srbiji koje se bavi rezistencijom salmonela na hinolone, kao jednim od najznačajnijih problema salmoneloza. Adekvatni harmonizovani sistemi postoje u mnogim zemljama EU (Plym Forshell and Wierup, 2006) i uključivanje Srbije u evropske tokove podrazumevaće

uvođenje stroge kontrole potrošnje antibiotika i kod životinja i kod ljudi, kao i sistema praćenja rezistencije na antibiotike i višestruko rezistentnih sojeva salmonela.

Zbog značaja koji se pridaje fenomenu rezistencije na hinolone, urađena je dalja analiza učestalosti rezistencije na NAL kod 57.8% (900) od ukupnog broja *S. Enteritidis* identifikovanih u periodu 2005.-2010. godine (prema internim podacima laboratorije za koprologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine identifikovano je ukupno 1558 primoizolata *S. Enteritidis*) i 100% salmonela drugih serotipova koje su identifikovane do nivoa serotipa (259) u istom periodu iz pacijenata i namirnica. Kada je u pitanju serotip *Enteritidis*, pokazalo se da je učestalost rezistencije na NAL generalno ipak mnogo manja nego što se to pokazalo u prvobitnoj kolekciji od 60 izolata. Ona je na uzorku od 900 *S. Enteritidis* iznosila svega 2.9% nasuprot 13.3% NAL rezistentnih *S. Enteritidis* koji su nađeni u prvobitnoj kolekciji iz 2005. i 2006. godine. Poređenjem istog perioda, od 393 ispitanih izolata *S. Enteritidis* iz 2005. i 2006. godine nađeno je 10 NAL rezistentnih izolata, odnosno svega 2.5%. U 2008. godini, nije bilo registrovanih NAL rezistentnih *S. Enteritidis*, a učestalost u ostalim godinama se ujednačeno kretala oko 2.5%, sem u 2007. godini kada je iznosila 4% od 100 ispitanih *S. Enteritidis* i u 2005. godini gde su na učestalost NAL rezistentnih *S. Enteritidis* značajno uticali izolati iz fabrike biskvita (6%). Može se zaključiti da je veličina uzorka stoga bitno uticala na sagledavanje stvarne slike o učestalosti rezistencije na antibiotike pa i na NAL kod *S. Enteritidis* na području Južnobačkog okruga i ukazala na mogućnost izvođenja pogrešnih zaključaka prilikom ispitivanja male kolekcije izolata. S obzirom da je pregledano više od polovine ukupnog broja primoizolata *S. Enteritidis* identifikovanih na području Južnobačkog okruga, mala je verovatnoća da bi se u većem uzorku naišlo na neke značajnije razlike kada je rezistencija na hinolone u pitanju. Izuzetno mala učestalost rezistencije *S. Enteritidis* na antibiotike uključujući i NAL iznenađuje s obzirom na podatke iz zemalja u okruženju (EFSA and ECDC, 2011b).

Među otkrivenih 26 NAL rezistentnih *S. Enteritidis* jasno se izdvajaju dve grupe: kod polovine izolata rezistencija na NAL je bila jedini marker, dok 46% izolata pokazuje udruženost rezistencije na NAL sa rezistencijom na AMP (Tabela 16.). S obzirom da su rezistencije na NAL i AMP uobičajeno najučestaliji markeri kod *S. Enteritidis* i u Evropi, pojedini autori su izučavali genetičke mehanizme u osnovi navedenih pojava. Soto i saradnici (2003) su ustanovili da je rezistencija na AMP

determinisana *bla_{TEM}* genima lociranim najčešće na autotransferabilnim plazmidima, a da je rezistencija na NAL uzrokovana hromozomalnim mutacijama na *gyrA* genu (87. ili 83. kodon). To znači da ne postoji direktna genetička povezanost dva markera rezistencije, već se oni javljaju u istoj bakteriji nezavisno.

Istraživanja rezistencije na antibiotike *S. Enteritidis* kod ljudi, životinja i namirnica u svetu su brojna poslednjih godina, a najinteresantnije za poređenje su studije iz evropskih zemalja. Još u periodu 1994.-1997. u Francuskoj na mnogo većem uzorku animalnih i humanih izolata zabeležena pojava rezistencije na AMP, NAL i još pet antibiotika u jednocifrenim procentima, sa izuzetkom TET na koji je rezistencija bila oko 20% (Breuil et al., 2000). Veliko istraživanje rezistencije salmonela u Holandiji iz humanih i životinjskih izvora u periodu 1984-2001. godine otkriva čak oko 90% izolata *S. Enteritidis* osetljivih na sedam ispitanih antibiotika i zanemarljiv broj višestruko rezistentnih. U ovo istraživanje ipak nije uključeno testiranje na NAL, što bi značajno uticalo na rezultate (Van Duijkeren et al., 2003). Veliki problem sa rezistencijom *S. Enteritidis* kod životinja, namirnica i ljudi, naročito na AMP i NAL beleži se u nekoliko studija u Španiji od sredine devedesetih godina, tako da je 2009. godine polovina humanih izolata bila rezistentna na hinolone (Cruchaga et al., 2001; Marimón et al., 2004; Soler et al., 2006; EFSA and ECDC, 2011b). Za razliku od Španije, situacija je nešto povoljnija u drugim zemljama. U Turskoj je dve trećine humanih izolata *S. Enteritidis* u periodu 2000-2002. bilo osetljivo na svih 7 testiranih antibiotika (Erdem et al., 2005). Slična je situacija bila i u bližem okruženju, u Austriji (dve trećine osetljivih *S. Enteritidis*), ali kod izolata *S. Enteritidis* životinjskog porekla (Mayrhofer et al., 2004). Situacija u Evropi se menja do 2009. godine, jer se beleži značajan porast rezistentnih i humanih i životinjskih izolata, naročito na hinolone. U zvaničnom izveštaju EFSA o rezistenciji salmonela u 2009. godini u zemljama EU (EFSA and ECDC, 2011b) navodi se da je od svih antibiotika najučestalija rezistencija kod *S. Enteritidis* bila na NAL (21.1% humanih i 16% *S. Enteritidis* iz živine) i na CIP (13.1% humanih i 17% *S. Enteritidis* iz živine). Podatke za CIP treba uzeti sa rezervom, jer se uglavnom odnose na zemlje EU koje smanjenu osetljivost na CIP izveštavaju kao rezistenciju (epidemiološke granične vrednosti), dok u zemljama koje primenjuju više, kliničke granične vrednosti (sojevi sa smanjenom osetljivošću se izveštavaju kao osetljivi na CIP) za CIP poput Srbije, nema *S. Enteritidis* rezistentnih na CIP.

Rezistencija na cefalosporine treće generacije koji su takođe klinički značajni za lečenje generalizovanih salmoneloza, naročito kod dece, bila je zabeležena samo kod jednog izolata među 60 u ovom istraživanju *S. Enteritidis*, a retko se beleži i u zemljama EU. Dosta visoka učestalost rezistencije *S. Enteritidis* na sulfonamide u Rumuniji (41.5%) signalizira eventualnu potrebu za testiranjem na ovaj antibiotik (EFSA and ECDC, 2011b). Naime, sulfonamidi su testirani u našem istraživanju samo u kombinaciji sa trimetoprimom (kotrimoksazol ili SXT) zbog njihovog sinergističkog dejstva, ali rezistencija je nađena samo kod dva izolata. Moguće je da neki od izolata osetljivih na SXT ipak nose determinante rezistencije na sulfonamide. Rezistencija na TET nije bila visoka kod 60 *S. Enteritidis* u našem istraživanju (5%, odnosno jedan veterinarski i dva humana izolata), a ne predstavlja problem kod *S. Enteritidis* ni u zemljama EU. Na drugom kraju sveta situacija se nešto razlikuje. U četiri istraživanja sprovedena u poslednjih 10 godina na izolatima *S. Enteritidis* različitih kolekcija iz pilića, ljudi i namirnica u Brazilu uočava se porast učestalosti rezistentnih izolata *S. Enteritidis* u svim grupama, naročito na AMP, NAL i TET, pa je u poslednjem istraživanju (Okamoto et al., 2009) kod pilića nađeno 41% izolata rezistentnih na AMP, 18% na TET i čak 57% rezistentnih na NAL. Nađen je i jedan izolat rezistentan na CIP. De Oliveira i saradnici nalaze značajno veću zastupljenost rezistencije na NAL i višestruko rezistentnih izolata među pilićima, nego kod ljudi, što u našem istraživanju nije slučaj (de Oliveira et al., 2005). Kod izolata *S. Enteritidis* iz namirnica koje su izazvale humane epidemije u toku 2001.-2002. u Brazilu, takođe je najčešća bila rezistencija na NAL (21.5%). S obzirom da su namirnice bile pretežno živinskog porekla, autori ovu rezistenciju objašnjavaju upotrebom enrofloksacina u živinarskoj industriji u Brazilu (de Oliveira et al., 2006), što se potvrđuje i nalazom 3.75% *S. Enteritidis* rezistentnih na fluorohinolon enrofloksacin u pilećim trupovima u Brazilu (Cardoso et al., 2006). U Koreji je među kliničkim izolatima nađeno 21.6% NAL rezistentnih *S. Enteritidis* (Choi et al., 2005). Livermore (2003) zapaža da je učestalost rezistencije na svim kontinentima veća što se ide južnije (jug Evrope, Južna Amerika, Afrika, Indija i Jugoistočna Azija).

Poređenje rezultata kada je višestruka rezistencija u pitanju je teže zbog različitog broja i izbora antibiotika koje su pojedini autori koristili. Iako bi testiranje na više antibiotika možda otkrilo i druge markere rezistencije, kao što su ustanovili

Morshed i Peighambari (2010) testirajući izolate *S. Enteritidis* na čak 29 antibiotika, ovaj pristup nije praktičan ukoliko se testira veća kolekcija izolata ili se radi redovno praćenje osetljivosti, jer bi za svaki izolat trebalo uraditi testiranje disk-difuzionom metodom na 4-5 Petrijevih šolja. Stoga je panel koji je korišćen u ovom istraživanju sveden na sedam antibiotika koji je saglasan standardnoj proceduri za testiranje osetljivosti salmonela CLSI („Clinical Laboratory Standard Institute“). Problem uporedivosti rezultata prepoznalo je i evropsko telo koje se bavi problemima rezistencije bakterija kod životinja gajenih za ljudsku ishranu, EFSA. EFSA je dala preporuke za harmonizovano testiranje osetljivosti salmonela na značajne grupe antibiotika u zemljama Evropske Unije (EFSA, 2008).

Generalno, dobijeni rezultati u ovom istraživanju ukazuju na veću osetljivost odabranih izolata *S. Enteritidis* na antibiotike i znatno nižu učestalost rezistencije na NAL nego u većini evropskih i svetskih studija. Moguće objašnjenje za dobijene nalaze bi se moglo naći u činjenici da se u veterinarskoj živinarskoj praksi na području Južnobačkog okruga još uvek ne koriste antibiotici u toliko velikoj meri, naročito ne kao promotori rasta u hrani. Razlog tome je možda što je šira primena antibiotika skupa za uzgajivače, što u ovom slučaju predstavlja srećnu okolnost kada je problem rezistencije u pitanju. Pri tome, tretman fluorohinolonima (enrofloksacinom) se na lokalnim farmama ređe primenjuje kod koka nosilja nego kod brojlera gajenih za proizvodnju mesa, a ne primenjuje se uopšte u toku perioda nošenja jaja (prema usmenoj komunikaciji sa dr veterinarske medicine Dubravkom Potkonjak, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“), te bi se time mogla objasniti i manja verovatnoća selekcije NAL rezistentnih *S. Enteritidis* u jajima. Stoga su salmonele na živinarskim farmama kao izvori za humane infekcije manje izložene pritisku primene antibiotika u pravcu selekcije rezistentnih sojeva. Sa druge strane, uticaj na učestalost rezistentnih sojeva *S. Enteritidis* bi mogao imati i uvoz živine, odnosno roditeljskih jata od kojih se uzgajaju koke nosilje (laka roditeljska jata). Prema usmenoj komunikaciji sa dr veterinarske medicine Dubravkom Potkonjak, roditeljska jata se na farme Južnobačkog okruga uvoze uglavnom iz Mađarske, Nemačke, Bosne i Hercegovine. Za Mađarsku i Bosnu i Hercegovinu ne postoje dostupni podaci o rezistenciji *S. Enteritidis* na NAL kod pilića uopšte, ali je u Nemačkoj učestalost rezistencije *S. Enteritidis* na NAL kod pilića veoma niska (2008. i 2009. nije ni detektovana) (EFSA and ECDC, 2011b), pa je i rizik pri

uvozu roditeljskih jata nosilja manji. Pored toga, svako jato pri uvozu podleže obaveznom pregledu na salmonele, a naročito pilići uginuli pri transportu i samo jato sa negativnim rezultatom pregleda na salmonele može biti uvezeno. Navedenim faktorima koji su prisutni u uzgoju pilića na teritoriji Južnobačkog okruga može se objasniti mala učestalost rezistencije *S. Enteritidis* na NAL pa i na ostale antibiotike kod ljudi. Nažalost, za širu analizu potencijalne opasnosti od unošenja rezistentnih sojeva salmonela sa uvezenim pilićima ne postoje objedinjeni zvanični podaci o intenzitetu uvoza, poreklu i destinaciji uvezenih pilića, te ovo istraživanje nameće potrebu uspostavljanja harmonizovanog sistema praćenja uvoza i rezultata ispitivanja uvezenih jata u Srbiji.

Pojava jednog NAL rezistentnog izolata od tri koja su izolovana po epidemiološkim indikacijama iz fabrike biskvita uslovlila je ispitivanje osetljivosti ostalih izolata iz te fabrike na NAL. Uzorci koji su uzeti sa različitih mesta u proizvodnom procesu u fabrici biskvita uključivali su jaja iz dva različita tanka, gotovo testo ispred depozitora, bris elevatora za ljusku, jaja iz prihvatnog tanka, bris poda u prostoriji za lupanje jaja. U svih 14 uzoraka nađen je samo jedan serotip – *Enteritidis*, od toga je šest salmonela bilo osetljivo na NAL, a osam rezistentno. Među NAL rezistentnim izolatima postojao je polimorfizam mutacija u QRDR regionu *gyrA* gena, odnosno sedam izolata imalo je Asp87Asn mutaciju, a jedan Asp87Gly. Različiti tipovi rezistencije, polimorfizam mutacija u QRDR regionu *gyrA* gena, kao i rezultati RAPD tipizacije gde je tri izolata iz fabrike biskvita pripadalo različitim tipovima ukazuju na široku kontaminaciju sa najmanje četiri različita soja *S. Enteritidis*. S obzirom da se u testo dodaje ogromna količina jaja, navedeni rezultati su dokaz da je izvor kontaminacije bilo više kontaminiranih jaja. Nalaz isključivo jednog serotipa u svim uzorcima iz fabrike biskvita snažno ukazuje na povezanost serotipa *Enteritidis* sa jajima kao izvorom kontaminacije. U literaturi nisu pronađena slična istraživanja kontaminacije u tehnološkim procesima proizvodnje u Srbiji, a dobijeni rezultati ukazuju na potrebu nadzora i kontrole u industriji koja nema direktnu vezu sa živinarskom proizvodnjom, ali koristi jaja kao sirovinu.

U ovom istraživanju prvi put u Srbiji analizirana je priroda mutacija koje determinišu smanjenu osetljivost na fluorohinolone. Analiza QRDR regiona *gyrA* gena pokazala je postojanje tri tipa mutacija na jednom od dva lokusa kod svih 35 NAL

rezistentnih *S. Enteritidis* izolata detektovanih u ovom istraživanju: Asp87Asn kao najčešći, Asp87Gly i Ser83Phe (Slika 12). Upečatljiva je dominacija mutacija na 87. poziciji (88.6% izolata). Nije bilo dvostrukih mutacija na oba lokusa, što je i bilo očekivano s obzirom da su dvostruke mutacije dosada nalažene samo kod izolata rezistentnih na fluorohinolone (San Martín et al., 2005). San Martín i saradnici su kod više serotipova salmonela kod pilića na španskim farmama našli podjednak broj pojedinačnih mutacija na 87. i 83. lokusu i to Asp87Asn i Ser83Phe. U jednom od prvih istraživanja mutacija u QRDR regionu 1988.-1995. godine u Velikoj Britaniji je među izolatima salmonela uglavnom od živine nađena dominacija Asp87Gly (76% izolata), ali su zabeležene i Asp87Asn, Asp87Tyr, Ser83Phe i Ser83Tyr (Piddock et al., 1998). U periodu 1997.-2000. kod raznih *S. Enteritidis* izolata nađene su iste mutacije, ali nije bilo dominacije nego je po četvrtina izolata imalo Ser83Phe i Asp87Tyr mutacije (Eaves et al., 2005). Asp87Asn je bila jedina mutacija kod humanih, a Ser83Phe kod animalnih NAL rezistentnih *S. Enteritidis* u Litvaniji (Šeputienė et al., 2006). U analizi NAL rezistentnih *S. Enteritidis* u Irskoj 2000. godine autori su našli dominaciju Asp87Tyr mutacije koju objašnjavaju klonalnim širenjem (Kilmartin et al., 2005). U Španiji je u tri istraživanja takođe dominirala mutacija kod NAL rezistentnih *S. Enteritidis* na 87. poziciji i to Asp87Tyr (Soto et al., 2003; Cabrera et al., 2004; Marimón et al., 2004). U Hong Kongu podjednako su zastupljene Asp87Asn i Asp87Gly, ali su nađene i Asp87Tyr i Ser83Phe, a iste mutacije nađene su i u Nemačkoj 2001.-2005. godine (Ling et al., 2003; Kehrenberg et al., 2007). Postoji teza da mutatorski fenotipovi defektni u metil-dirigovanoj “mismatch” reparaciji, koji postoje u prirodnoj populaciji bakterija, igraju veliku ulogu u nastanku mutacija upravo na lokusima 83 i 87 QRDR regiona koji predstavljaju takozvane vruće tačke za genetičku varijabilnost u *gyrA*, koji je inače visoko konzervisan među mnogim vrstama (Levy et al., 2004). Objašnjenje za ovako ograničenu varijabilnost supstitucija na 83. i 87. poziciji kod rezistentnih izolata leži u tome da zamena male polarne aminokiseline (Ser) na 83. poziciji sa velikom hidrofobnom aminokiselinom (npr. Phe) dovodi do smanjenog nivoa vezivanja fluorohinolona, dok je za supstitucije na 87. poziciji presudan gubitak negativno naelektrisanne aminokiseline (Asp) koja je važna u interakciji hinolona i žiraze (Griggs et al., 1996). Zanimljivo istraživanje sprovedli su Haugum i saradnici (2007) pokušavajući da ustanove vezu između tipa *in vitro* mutanata i hinolonskih antibiotika

koji su ih selektovali. Kod serotipa Enteritidis fluorohinolon levofloksacin je jedini izazvao Asp87Asn i Asp87Gly mutacije, dok su CIP i enrofloksacin uglavnom izazivali Ser83Phe mutacije. Teško da se dominacija mutacija na 87. poziciji u našem istraživanju može objasniti selekcijom putem upotrebe levofloksacina, jer se on ne koristi u Srbiji ni u humanoj, ni u veterinarskoj medicini. Levofloksacin nije u upotrebi u živinarskoj industriji ni u zemljama EU, uglavnom su kao i kod nas u upotrebi enrofloksacin i flumekvin, koji su najverovatnije usloveli selekciju rezistencije na NAL kod *S. Enteritidis* kod pilića. Evidentno je da *in vitro* eksperimenti ponekad ne mogu u potpunosti da simuliraju uslove *in vivo*.

Analiza fenomena smanjene osetljivosti na fluorohinolone omogućena je određivanjem MIC vrednosti za CIP kod NAL rezistentnih *S. Enteritidis*. Prilikom testiranja MIC vrednosti za CIP, rezultati su tumačeni prema CLSI standardu koji je u široj upotrebi u razvijenim zemljama. Prema CLSI standardu sojevi su rezistentni pri $MIC \geq 4$ mg/l, a osetljivi pri $MIC \leq 1$ mg/l. Za fenomen smanjene osetljivosti uzeta je opšteprihvaćena granična vrednost za CIP: $MIC \geq 0.125$ mg/l (Choi et al., 2005; Ercis et al., 2006; Giraud et al., 1999; Kilmartin et al., 2005; Kotilainen et al., 2005; Rodriguez-Avial et al., 2005; Stevenson et al., 2007). Iako se ne može detektovati standardnom disk-difuzionom tehnikom, smanjena osetljivost može dovesti do neuspeha u terapiji salmoneloza kliničkim dozama fluorohinolona (Piddock, 1993). Ekstraintestinalne infekcije izazvane salmonelama, a posebno infekcija *S. Typhi* mogu dovesti do smrtnog ishoda ukoliko se ne leče antibioticima. Upravo kod ekstraintestinalnih infekcija indikovana je terapija fluorohinolonima. Nakon prvih izveštaja o neuspehu terapije zbog smanjene osetljivosti na fluorohinolone, sve češće su počeli da se javljaju slični slučajevi. Stoga su mnogi istraživači predložili preispitivanje graničnih vrednosti za osetljivost na fluorohinolone, odnosno strožije kriterijume za definisanje osetljivosti koji bi ušli u standarde (Crump et al., 2003; Aarestrup et al., 2003). Evropsko telo za testiranje osetljivosti na antibiotike („European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing“ – EUCAST) je 2009. godine usvojio nove, niže kliničke granične vrednosti za osetljivost na CIP koje podrazumevaju da su sojevi rezistentni već pri $MIC > 1$ mg/l, a osetljivi pri $MIC \leq 0.5$ mg/l (EUCAST, 2009). Sa druge strane, EUCAST je definisao i epidemiološke granične vrednosti za CIP. Za svaku bakterijsku vrstu distribucija MIC vrednosti među sojevima omogućava razlikovanje populacije

divljeg tipa bakterija i populacije koja pokazuje neki nivo rezistencije. Kada bakterije steknu rezistenciju jasno definisanim i efikasnim mehanizmom kao što je na primer sticanje gena odgovornog za proizvodnju enzima odgovornog za inaktivaciju antibiotika, distribucija MIC-ova pokazuje dve velike subpopulacije, jednu potpuno osetljivu i drugu potpuno rezistentnu. Rezistencija može biti dostignuta i putem serije malih koraka, kao što su promene u propustljivosti bakterijskog ćelijskog zida i dodatnih drugih mehanizama koji doprinose povećanju stepena rezistencije, što je slučaj sa rezistencijom na hinolone. U ovom slučaju, može se pojaviti populacija bakterija koja se nalazi između potpuno osetljive populacije i više rezistentne populacije (fenomen smanjene osetljivosti). Epidemiološka granična vrednost označava MIC iznad koga bakterije imaju neko detektabilno smanjenje osetljivosti i smatraju se rezistentnima. Za CIP prema EUCAST standardu izolati sa $MIC \geq 0.06$ mg/l su epidemiološki rezistentni (Kahlmeter et al., 2003). Epidemiološke granične vrednosti detektuju bilo kakvu devijaciju u osetljivosti od divljeg tipa, ali nisu odgovarajuće za određivanje uspešnosti terapije antibiotikom. Međutim, u svrhu određivanja terapijske efikasnosti koriste se kliničke granične vrednosti, ali se može desiti da se ne detektuje rezistencija u nastajanju (EFSA and ECDC, 2011b).

U našem istraživanju ukupno 34 od 35 NAL rezistentnih *S. Enteritidis* izolata pokazalo je fenomen smanjene osetljivosti na CIP ($MIC_{CIP} \geq 0.125$ mg/l) (Tabele 11., 17.). I prema CLSI i prema EUCAST kliničkim graničnim vrednostima takvi izolati spadaju u osetljive. Tokom ovih istraživanja nije nađen nijedan izolat *S. Enteritidis*, pa ni ostalih serotipova salmonela, klinički rezistentan na CIP u disk-difuzionom testiranju (Tabele 9., 10., 16. i 19.). Ali ako bi se rezultati interpretirali prema epidemiološkim EUCAST kriterijumima (što je tendencija širom EU kada se vrši izveštavanje za EFSA), svi izolati NAL rezistentnih *S. Enteritidis* u ovom istraživanju bili bi rezistentni na CIP, ali bilo bi svega 2.9% *S. Enteritidis* rezistentnih na CIP, što je neobično u odnosu na učestalost CIP rezistentne *S. Enteritidis* u Velikoj Britaniji (30.5%), Danskoj (11%) i Holandiji (15%) koje primenjuju EUCAST kriterijume pri izveštavanju.

Jedan NAL rezistentan izolat *S. Enteritidis* je imao $MIC_{CIP} 0.064$ mg/l. Ovaj izolat je ipak imao mutaciju u *gyrA* - Asp87Gly. U istraživanju Ling i saradnika (2003), ovako niska vrednost za CIP nađena je kod jednog izolata *S. Enteritidis* sa jedinom mutacijom u *parC* genu Tyr57Ser, dok su mutacije u *gyrA* davale više vrednosti MIC

CIP. Ovo je prvi poznati nalaz da je mutacija na poziciji 87 u QRDR *gyrA* gena uslovlila MIC CIP ispod 0.125 mg/l.

Kod svih NAL rezistentnih izolata MIC vrednosti za NAL su se kretale od 128 do 1024 mg/l, što su za oko šest razređenja ili 60 puta veće vrednosti nego kod osetljivih izolata, jasno razdvajajući osetljivu i rezistentnu subpopulaciju. Kod NAL osetljivih izolata međutim, MIC vrednosti za CIP su bile od 0.016 do 0.064 mg/l, a kod NAL rezistentnih MIC CIP su se kretale od 0.064 do 0.512 mg/l. To znači da se subpopulacija rezistentna na NAL nadovezala na osetljivu populaciju po MIC CIP vrednostima, demonstrirajući fenomen smanjene osetljivosti. Nije se mogla ustanoviti korelacija između tipa mutacije i MIC na NAL i CIP (Tabela 18). Nijedna kombinacija MIC vrednosti nije se mogla vezati za određeni tip mutacije. Kod više izolata sa identičnom Asp87Gly mutacijom MIC za NAL kretao se od 128 do 512 mg/l, a za CIP od 0.064 do 0.512 mg/l (dijapazon od čak četiri razređenja). Vezu između MIC vrednosti za NAL i CIP i tipa mutacija nisu mogli naći ni Piddock i saradnici (1998). Najčešća kombinacija MIC vrednosti u našem istraživanju je bila MIC NAL 256 mg/l i MIC CIP 0.256 mg/l (19 izolata) i nađena je kod sva tri tipa mutacija, ali nije se videla jasna korelacija između MIC vrednosti za NAL i za CIP (viši MIC za NAL nije podrazumevao i viši MIC za CIP i obratno). Međutim, Giraud i saradnici (1999) su našli da kod veterinarskih izolata salmonela MIC za NAL od 128-512 mg/l uslovljava MIC za CIP 0.125-0.5 mg/l, a da više vrednosti MIC za NAL (512-1024 mg/l) koreliraju sa MIC za CIP 1-2 mg/l. Isti autori su sugerisali da kod eksperimentalno selektovanih mutanata mutacije na Ser83 dovode do višeg nivoa rezistencije nego mutacije na Asp87, što u našem istraživanju kod prirodno selektovanih mutanata nije slučaj, te se ponovo ispostavlja da *in vitro* eksperimenti ne mogu simulirati uvek *in vivo* uslove. Ali i ovi autori su ustanovili da izolati sa mutacijama na istoj poziciji imaju različite nivoe rezistencije, i pretpostavljaju postojanje dodatnih mehanizama rezistencije na drugim lokusima. Ta pretpostavka je donekle oborena u radu Choi i saradnika koji su kod NAL rezistentnih a CIP osetljivih salmonela sa različitim MIC vrednostima dokazali postojanje svega po jedne mutacije u QRDR regionu *gyrA* gena i odsustvo mutacija na *gyrB*, *parC* i *parE*, odsustvo *qnr* gena kao i povećane ekspresije efluks pumpe. Štaviše, kod sojeva sa povećanim efluksom nisu zabeležene više MIC vrednosti za CIP i pretpostavlja se da aktivni efluks igra manju ulogu u niskom nivou rezistencije koju

kodiraju pojedinačne *gyrA* mutacije, a veliku ulogu u visokom nivou rezistencije kod sojeva sa duplim *gyrA* mutacijama (Choi et al., 2005).

Važnost određivanja MIC vrednosti na CIP ogleda se i u preispitivanju mogućnosti da se primene i drugi fluorohinoloni u terapiji zbog pojave ukrštene rezistencije među fluorohinolonomima (Rodriguez-Avial et al., 2005; Sahm et al., 2003). U analizi aktivnosti 11 fluorohinolona protiv salmonela u Finskoj ustanovljena je jasna pozitivna korelacija između MIC vrednosti za CIP i enrofloksacin, gatifloksacin, gemifloksacin, levofloksacin, lomefloksacin, moksifloksacin, norfloksacin i ofloksacin. Jedino je za najnovije fluorohinolone klinafloksacin i sitafloksacin pokazano da su im MIC vrednosti niže od CIP kod sojeva sa smanjenom osetljivošću na CIP, što ih čini dobrim kandidatima za efikasnu terapiju čak i kod takvih salmonela (Kotilainen et al., 2005). Iako su još uvek retki kod salmonela, plazmidno determinisani geni (*qnr* i *aac(6')Ib-cr*) koji doprinose smanjenoj osetljivosti na fluorohinolone ne mogu se detektovati u standardnom disk-difuzionom antibiogramu jer su sojevi koji nose ovakve gene osetljivi na NAL. Cavaco i Aarestrup (2009) su dali preporuke za detekciju *qnr* i *aac(6')Ib-cr* gena koje uključuju pre svega analizu smanjenja MIC vrednosti za CIP ili norfloksacin. Ali ako nije dostupno kvantitativno određivanje MIC vrednosti, smanjenje zone inhibicije za fluorohinolone i postojanje zone inhibicije za NAL u disk-difuzionom antibiogramu može da ukazuje na plazmidno determinisanu rezistenciju, dok nedostatak zone inhibicije oko diska sa NAL ukazuje na mutaciju u QRDR regionu. Korišćenje diskova sa smanjenom koncentracijom CIP (1 µg umesto 5 µg) u disk-difuzionom antibiogramu takođe omogućava bolje razlikovanje izolata sa plazmidno determinisanom rezistencijom od osetljivih izolata.

Činjenica da su NAL rezistentni sojevi *S. Enteritidis* sa različitim mutacijama u QRDR regionu *gyrA* gena nasumično zastupljeni tokom izučavanih šest godina, kao i diskontinuitet pojave *S. Enteritidis* rezistentnih na NAL tokom godina kod ljudi (u celoj 2008. godini nije otkriven nijedan NAL rezistentan *S. Enteritidis* izolat) govori o tome da je mala verovatnoća da postoji klonalno širenje NAL rezistentnih sojeva na teritoriji Južnobačkog okruga.

Kada se uporedi učestalost humanih izolata rezistentnih na NAL kod *S. Enteritidis* i kod drugih serotipova salmonela, u ovom istraživanju je dokazano da je ta učestalost mnogo viša kod drugih serotipova, pa i kod *S. Typhimurium* (7%) nego kod

S. Enteritidis (2.9%), dok je u EU situacija obrnuta (21.1% kod *S. Enteritidis* prema 5.4% kod *S. Typhimurium*) (EFSA et ECDC, 2011b). To je posledica pre svega niske učestalosti rezistencije na NAL kod *S. Enteritidis* u našem istraživanju.

U našem istraživanju rezistencija na NAL nađena je kod četiri serotipa koji su ujedno bili i najčešći (ako se izuzme serotip Senftenberg, koji je 2008. godine imao klonalno širenje), čineći dve trećine od 259 salmonela iz 24 serotipa. Rezistencija na NAL dominira kod serotipa Hadar gde gotovo polovina izolata nosi ovu rezistenciju. Breuil i saradnici (2000) našli su izuzetno visok procenat rezistencije na NAL kod *S. Hadar* (72% kod animalnih a 92% kod humanih izolata 1997. godine), kao i Antunes i saradnici (2003) u živinskim proizvodima (100%) u Portugalu. Dominacija NAL rezistentnih izolata kod *S. Hadar* i NAL rezistentnih *S. Enteritidis* na drugom mestu zabeležene su i u dve španske i jednoj turskoj studiji humanih izolata salmonela (Marimón et al., 2004; Rodriguez-Avial et al., 2005; Ercis et al., 2006). U Austriji Mayrhofer i saradnici (2004) su našli visoku učestalost salmonela i *Campylobacter*-a rezistentnih na hinolone i to povezuju sa prevalentnošću dve bakterijske vrste među živinom, koja se pak često tretira ciprofloksacinom radi prevencije salmoneloza i kampilobakterioza. U SAD je kao posledica masovnog tretmana živine enrofloksacinom 41% izolata *Campylobacter*-a kod ljudi bilo rezistentno na fluorohinolone 2001. godine, što je uslovalo zabranu upotrebe enrofloksacina u živinarstvu 2004. godine u nadi da će se smanjiti učestalost rezistencije kampilobaktera i salmonela na hinolone (Nelson et al., 2007). Iako se ljudi ređe zaraze od kućnih ljubimaca, nije zanemarljiv rizik zbog česte upotrebe antibiotika u lečenju pasa i mačaka. Fluorohinoloni su za lečenje malih životinja u Evropi odobreni krajem 1990-tih godina i zabeležena je pojava rezistencije i neuspeha terapije prilikom prolongiranog lečenja hroničnih infekcija uzrokovanih *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus intermedius*. Takođe je dokazana i uloga mačaka i pasa kao rezervoara višestruko rezistentnog soja *S. Typhimurium* DT104 (Guardabassi et al., 2004). Na Dalekom Istoku, u Kini, problem rezistencije na hinolone i fluorohinolone udružene sa višestrukom rezistencijom je izuzetno velik kod najčešćih serotipova *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* kod ljudi. Čak 97% *S. Enteritidis* i 89% *S. Typhimurium* je bilo rezistentno na CIP (Xia et al., 2009). Visoka učestalost rezistencije objašnjava se lakom dostupnošću i nekontrolisanom potrošnjom antibiotika, pa i fluorohinolona u humanoj i veterinarskoj praksi u Kini (Cui et al., 2008) i u Vijetnamu

(Van et al., 2007). Prema nekim autorima porast rezistencije kod netifusnih salmonela u razvijenim zemljama pripisuje se upotrebi antibiotika kod životinja gajenih za ljudsku ishranu, dok je u zemljama u razvoju uzrok tome skoro isključivo korišćenje antibiotika u humanoj medicini (Threlfall et al., 2000). Međutim, ne može se uvek učestalost rezistencije na pojedine antibiotike jednostavno objasniti intenzitetom upotrebe antibiotika kod životinja ili ljudi. Na primer, visoka zastupljenost rezistencije na CIP *Campylobacter-a* kod svinja u Švedskoj je zabeležena dok fluorohinoloni nisu bili korišteni u svinjarstvu. Sa druge strane, pad broja *S. Typhimurium* rezistentnih na hinolone kod goveda u Belgiji i Nemačkoj je bio u periodu 1991-1998. godine, kada nije bilo smanjenja potrošnje hinolona. Verovatno objašnjenje leži u klonalnom širenju pojedinih sojeva na određenom području (Bywater et al., 2004).

Prema nekim autorima uzrok rezistencije netifusnih salmonela na hinolone kod ljudi treba tražiti u čestoj upotrebi fluorohinolona kod životinja, a ne u humanoj medicini. Teško da upotreba fluorohinolona kod ljudi značajno utiče na ovaj fenomen iz sledećih razloga: terapija se primenjuje tek nakon identifikacije salmonele u uzorku; terapijske doze fluorohinolona se daju kratko u velikim dozama, imaju jak baktericidan efekat i malo je verovatno da će selektovati rezistentne sojeve; fluorohinoloni se ne koriste u lečenju dece, a nađena je veća učestalost hinolon-rezistentnih sojeva salmonela kod dece nego kod odraslih (Mølbak et al., 2002). Ono što posebno zabrinjava je da selekcija rezistencije na hinolonske antibiotike može nastati i bez prisustva antibiotika. S obzirom da su hinoloni sintetički antibiotici koji se u prirodi ne mogu naći, za očekivati je da ne može doći do selekcije rezistencije na hinolone u drugom okruženju, sem korišćenjem hinolona na životinjskim farmama. Međutim, pokazano je da je ovo ipak moguće i verovatno, s obzirom da je u eksperimentalnim uslovima selektovan nizak nivo rezistencije na hinolone drugim antibioticima (hloramfenikolom i tetraciklinom), pa i nekim bojama, deterdžentima, antisepticima, žučnim solima i borovim uljem. Neke od ovih supstanci su prisutne u medicinskim ustanovama, a neke u prirodnom okruženju ili u uslovima kontaminacije u prirodi. Izolati *P. aeruginosa* iz prirode i druge bakterije imaju urođene inducibilne MDR mehanizme kao što je efluks pumpa, koji se mogu aktivirati supstancama koje nisu antibiotici, pa mogu indukovati i rezistenciju na hinolone (Martínez et al., 1998; Braoudaki and Hilton, 2004). U radu Davidsona i saradnika (2008) pokazano je da

korišćenje anitimalarika hlorokvina u području gde je malarija veliki problem selektira rezistenciju na CIP kod *E. coli* izolovane kod lokalnog stanovništva. Autori su otkrili prisustvo hlorokvina u vodi za piće, verovatno fekalnog porekla, kao posledica intenzivnog korišćenja ovog leka protiv malarije. Eksperimentalno je dokazano da hlorokvin selektuje mutacije u QRDR regionu *gyrA* gena *E. coli* koje dovode do rezistencije na CIP. S obzirom na slične mehanizme rezistencije kod salmonela, ovaj način selekcije rezistencije je opasan zbog raširenosti salmoneloza u područjima gde vlada i malarija, a naročito u svetlu činjenice da je tako kompromitovano lečenje fluorohinolonima sistemske salmoneloze koja je česta komplikacija kod pacijenata obolelih od AIDS-a, a HIV infekcije su vrlo raširene u Africi u područjima gde je česta i malarija.

Među salmonelama poreklom od ljudi i namirnica iz Južnobačkog okruga (Tabela 19.) zastupljenost izolata rezistentnih na NAL i višestruko rezistentnih izolata je generalno veća među drugim serotipovima (kod *S. Typhimurium* i još više kod *S. Hadar*) nego kod *S. Enteritidis*. Moguće objašnjenje leži u tome da su brojleri i druge životinje od kojih se proizvodi meso za ljudsku ishranu na našim farmama izloženi intenzivnijem tretmanu antibioticima, pa i fluorohinolonima nego koke nosilje (prema usmenoj komunikaciji sa dr veterinarske medicine Dubravkom Potkonjak, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“), selektujući na taj način rezistentne sojeve serotipova koji se češće mogu naći u mesu nego u jajima. I drugi autori beleže veću zastupljenost rezistencije kod drugih serotipova salmonela nego kod serotipa *Enteritidis* (Cardinale et al., 2005; Cruchaga et al., 2001; Erdem et al., 2005; Soler et al., 2006; Van Duijkeren et al., 2003). U austrijskom istraživanju salmonela iz životinja drugi serotipovi salmonela su imali više markera rezistencije i skoro da nije bilo osetljivih izolata. Učestala rezistencija na TET koju su detektovali Mayrhofer i saradnici (2004), zapažena je u istraživanju rezistencije salmonela nađenih u jednoj živinskoj klanici u Španiji (Carramiñana et al., 2004), kao i kod *S. Enteritidis* iz pilećih trupova u Brazilu (Cardoso et al., 2006) i mesa u Vijetnamu (Van et al., 2007) i objašnjava se činjenicom da se ovaj lek dodaje u hranu živine kao promoter rasta. U našem istraživanju rezistencija na TET je ređa kod *S. Enteritidis* iz pilića, ljudi i namirnica (Tabela 9., 10., 16.), ali je vrlo često udružena sa rezistencijom na NAL kod drugih serotipova salmonela (Tabela 19.). Ipak je rezistencija na AMP najčešće udružena sa rezistencijom

na NAL kod naših izolata salmonela bez obzira na serotip (Tabela 16. i 19.). Učestalu udruženost rezistencije na NAL i AMP beleže i drugi autori, u Koreji i SAD (Choi et al., 2005; Cheong et al., 2007; Stevenson et al., 2007). Analizirajući salmonele širom SAD, Stevenson i saradnici su utvrdili da je pojava rezistencije na AMP, gentamicin, kanamicin, TET i SXT češća kod NAL rezistentnih salmonela nego kod osetljivih na NAL. Takođe su zaključili da su NAL rezistentne salmonele češće izolovane iz krvi nego osetljive i time povezane sa ozbiljnim tokom bolesti, što dodatno zabrinjava.

Najnovije pojave epidemijskog širenja po Evropi višestruko rezistentne *S. Paratyphi B* varijetet Java među pilićima (Van Duijkeren et al., 2003) i višestruko rezistentne *S. Kentucky ST198* koja je i visoko rezistentna na CIP (Le Hello et al, 2011) nameću potrebu stalnog praćenja kretanja salmonela u životinjskoj i humanoj populaciji.

Izvanredna sposobnost bakterija, pa i salmonela, da na uvođenje novih antibiotika brzo odgovore raznovrsnim mehanizmima rezistencije kompromitovala je upotrebu mnogih antibiotika i definitivno postavila pred naučnike i javnost pitanje: da li je odnos ljudi i patogenih bakterija borba bez pobednika? Poslednjih godina fokus se pomera i na takozvane uslovno patogene bakterije, bakterije koje su normalni stanovnici ljudskog ili životinjskog organizma. Sve češće uslovno patogene bakterije naoružane determinantama virulencije i invazivnosti udruženim sa višestrukom rezistencijom na antibiotike izazivaju po život opasne infekcije koje se ne mogu lečiti nijednim poznatim antibiotikom. Preostaje nam malo rešenja koja su vrlo složena. Jedno je iznalaženje novih klasa antibiotika, spor i komplikovan proces koji prema dosadašnjem iskustvu ne garantuje trajan uspeh zbog brze pojave rezistencije kod bakterija. Potrebna je harmonizovana akcija nadležnih struktura koje su uključene u proizvodnju, distribuciju i primenu antibiotika u cilju ograničavanja upotrebe antibiotika kako kod ljudi, tako i kod životinja i biljaka, što bi smanjilo selektivni pritisak i favorizovalo ponovnu dominaciju osetljivih sojeva bakterija. Neophodan je i sistem kontrole i sprečavanja širenja infekcija, sprovođenje dobre higijenske prakse u uzgoju životinja i proizvodnji namirnica kao i vakcinacija životinja. Uticaj upotrebe antibiotika kod životinja gajenih za ljudsku ishranu na ljudsko zdravlje naročito je evidentan u slučaju salmoneloza. Međunarodna trgovina životinjama i hranom životinjskog porekla dodatno povećavaju ovaj problem. Stoga se nameće potreba globalne inicijative i ustanovljavanja nadzora

nad potencijalno opasnim bakterijskim sojevima. Budući da smo i mi deo tog globalnog tržišta i razmene ljudi, životinja i hrane, očekivana je pojava rezistentnih sojeva i kod nas. Efikasni sistemi tipizacije sojeva i praćenja rezistencije bakterija u veterini, poljoprivredi i medicini omogućiće nam preduzimanje preventivnih mera u cilju sprečavanja širenja rezistentnih bakterija.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu izloženih rezultata istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. RAPD („randomly amplified polymorphic DNA“) metoda tipizacije sa četiri odabrana prajmera pokazala je zadovoljavajuću diskriminativnu moć u kombinaciji sa rezistotipizacijom i polimorfizmom mutacija u regionu koji determiniše rezistenciju na hinolone (QRDR) *gyrA* gena, razlikujući 22 genetičke grupe u kolekciji od 60 izolata *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Enteritidis (*S. Enteritidis*) poreklom od pilića, ljudi i namirnica žvinskog porekla. Metoda je brza i jednostavna i preporučuje se u tipizaciji sojeva salmonela.
2. Kombinovanjem rezultata dobijenih primenom više metoda tipizacije značajno je povećana mogućnost diskriminacije različitih sojeva *S. Enteritidis* u odnosu na pojedinačne metode.
3. U ljudskoj i žvinskoj populaciji na području Južnobačkog okruga cirkulišu visoko srodni izolati *S. Enteritidis*.
4. Ispitivanjem osetljivosti *S. Enteritidis* na standardni panel od sedam antibiotika ustanovljena je mala učestalost rezistentnih izolata, a naročito višestruko rezistentnih izolata u odnosu na susedne zemlje. Najučestalije su rezistencije na ampicilin i nalidiksičnu kiselinu.
5. Nisu ustanovljene značajne razlike u učestalosti i tipovima rezistencije kod izolata poreklom od pilića, namirnica i ljudi.
6. Problem pojave rezistencije na hinolone i smanjene osetljivosti na fluorohinolone među *S. Enteritidis* na našem području postoji, ali je manji nego u zemljama u okruženju. Manje od 3% izolata *S. Enteritidis* kod ljudi i namirnica je bilo rezistentno na nalidiksičnu kiselinu. Nije nađen nijedan izolat rezistentan na ciprofloksacin prema CLSI („Clinical and Laboratory Standards Institute“) graničnim vrednostima.
7. Testiranje osetljivosti salmonela na nalidiksičnu kiselinu je neophodno kao pokazatelj pojave smanjene osetljivosti na fluorohinolone. Potrebno je određivanje minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin kod svih

- izolata salmonela rezistentnih na nalidiksičnu kiselinu da bi se ustanovio nivo smanjene osetljivosti i kliničarima eventualno preporučila alternativna terapija.
8. Kod svih NAL rezistentnih *S. Enteritidis* nađena je po jedna mutacija na 83. ili 87. poziciji QRDR regiona *gyrA* gena. Najučestalija je bila Asp87Asn mutacija, ali su nađene i Asp87Gly i Ser83Phe mutacije.
 9. 34 od 35 NAL rezistentnih izolata *S. Enteritidis* pokazali su fenomen smanjene osetljivosti na ciprofloksacin. Nije ustanovljena korelacija između tipa mutacija i minimalnih inhibitornih koncentracija za nalidiksičnu kiselinu i za ciprofloksacin.
 10. Distribucija različitih mutanata NAL rezistentnih *S. Enteritidis* kao i diskontinuitet u šestogodišnjem periodu ukazuju da na području Južnobačkog okruga ne postoji klonalno širenje NAL rezistentnih sojeva *S. Enteritidis*.
 11. Rezistencija na nalidiksičnu kiselinu učestalija je kod humanih izolata drugih serotipova salmonela nego kod serotipa *Enteritidis*. Skoro polovina izolata *S. Hadar* bila je rezistentna na nalidiksičnu kiselinu. Kod drugih serotipova rezistencija na nalidiksičnu kiselinu je češće udružena sa više markera rezistencije nego kod serotipa *Enteritidis*.
 12. Rezultati sprovedenog istraživanja ukazuju na potrebu uvođenja adekvatnog sistema molekularne tipizacije sojeva i praćenja pojave rezistencije, naročito rezistencije na hinolone kod salmonela, u laboratorijsku praksu. To bi omogućilo efikasno praćenje i nadzor nad salmonelama u ljudskoj i životinjskoj populaciji i u procesu proizvodnje hrane.

7. LITERATURA

1. Aarestrup FM, Wiuff C, Mølbak K and Threlfall EJ. 2003. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 827-829.
2. Abouzeed YM, Baucheron S and Cloeckaert A. 2008. *ramR* Mutations Involved in Efflux-Mediated Multidrug Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 2428-2434.
3. Ahmed R, Soule G, Demczuk WH, Clark C, Khakhria R, Ratnam S, Marshall S, NG LK, Woodward DL, Johnson WM and Rodgers FG. 2000. Epidemiologic Typing of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in a Canada-Wide Outbreak of Gastroenteritis due to contaminated Cheese. *J Clin Microbiol* **38**: 2403-2406.
4. Amyes SGB and Gemmell CG. 1992. Antibiotic resistance in bacteria. *J Med Microbiol* **36**: 4-29.
5. Antunes P, Réu C, Sousa JC, Peixe L and Pestana N. 2003. Incidence of Salmonella from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* **82**: 97-103.
6. Armand-Lefèvre L, Leflon-Guibout V, Bredin J, Barguellil F, Amor A, Pagès JM and Nicolas-Chanoine MH. 2003. Imipenem Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Wien Related to Porin Loss and CMY-4 β -Lactamase Production. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1165-1168.
7. Asai T, Sato C, Masani K, Usui M, Ozawa M, Ogino T, Aoki H, Sawada T, Izumiya H and Watanabe H. 2010. Epidemiology of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. *Gut Pathog* **2**: 17.
<http://www.gutpathogens.com/content/2/1/17>
8. Baré J, Houf K, Verstraete T, Vaerewijck M and Sabbe K. 2011. Persistence of Free-Living Protozoan Communities across Rearing Cycles in Commercial Poultry Houses. *Appl Environ Microb* **77**:1763-1769.
9. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH and Liebana E. 2005. *bla*_{CTX-M} Genes in Clinical *Salmonella* Isolates Recovered from Humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 1319-1322.
10. Berkowitz FE. 1995. Antibiotic resistance in Bacteria. *Southern Med J* **88**:797-804.
11. Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodriguez MA, Vignoli R, Chabalgoity JA. 2004. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from Humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *J Clin Microbiol* **42**: 1155-1162.
12. Betancor L, Pereira M, Martinez A, Giossa G, Fookes M, Flores K, Barrios P, Repiso V, Vignoli R, Cordeiro N, Algorta G, Thomson N, Maskell D, Schelotto F and Chabalgoity JA. 2010. Prevalence of *Salmonella enterica* in Poultry and

- Eggs in Uruguay during an Epidemic Due to *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *J Clin Microbiol* **48**: 2413-2423.
13. Biendo M, Laurans G, Thomas D, Dechepy O, Hamdad-Daoudi F, Canarelli B and Eb F. 2003. Regional dissemination of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is season dependent. *Clin Microbiol Infect* **9**: 360-369.
 14. Boerlin P and Reid-Smith RJ. 2008. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Anim Health Res Rev* **9**: 115-126.
 15. Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J and Bartkus JM. 2007. Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Phage Typing for Subtype Analysis fo *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. *J Clin Microbiol* **45**: 536-543.
 16. Braoudaki M and Hilton AC. 2004. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *J Clin Microbiol* **42**: 73–78.
 17. Breuil J, Brisabois A, Casin I, Armand- Lefèvre L, Frémy S and Collatz E. 2000. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *J Antimicrob Chemother* **46**: 965-971
 18. Brown D and MacGowan A. 2010. Harmonization of antimicrobial susceptibility testing breakpoints in Europe: implications for reporting intermediate susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **65**: 183-185.
 19. Bywater R, Deluyker H, Deroover E, de Jong A, Marion H, McConville M, Rowan T, Shryock T, Shuster D, Thomas V, Valle M and Walters J. 2004. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* **54**: 744-754.
 20. Cabrera R, Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Arroyo M, Aladuena A, Usera MA, Jiménez De Anta MT, Gascón J and Vila J. 2004. Mechanism of Resistance to Several Antimicrobial Agents in *Salmonella* Clinical Isolates Causing Traveler's Diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3934-3939.
 21. Caldwell KN, Adler BB, Anderson GL, Williams PL and Beuchat LR. 2003. Ingestion of *Salmonella enterica* Serotype Poona by a Free-Living Nematode, *Caenorhabditis elegans*, and Protection against Inactivation by Produce Sanitizers. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4103-4110.
 22. Cardinale E, Perrier Gros-Claude JD, Rivoal K, Rose V, Tall F, Mead GC and Salvat G. 2005. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *J Appl Microbiol* **99**: 968-977.
 23. Cardoso MO, Ribeiro AR, Santos LR, Pillotto F, Morales HLS, Salle CTP, Rocha SLS and Nascimento VP. 2006. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Braz J Microbiol* **37**: 368-371.

24. Carramiñana JJ, Rota C, Augustín I and Herrera A. 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet Microbiol* **104**: 133-139.
25. Cattoir V, Weill FX, Poirel L, Fabre L, Soussy CJ and Nordmann P. 2007. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *J Antimicrob Chemother* **59**: 751-754.
26. Cavaco LM and Aarestrup FM. 2009. Evaluation of Quinolones for Use in Detection of Determinants of Acquired Quinolone Resistance, Inducing the New Transmissible Resistance Mechanisms *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, and *aac(6')Ib-cr*, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and Determination of Wild-Type Distributions. *J Clin Microbiol* **47**: 2751-2758.
27. Cavaco LM, Hasman H, Xia S and Aarestrup FM. 2009. *qnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 603-608.
28. Chansiripornchai N, Ramasoota P, Bangtrakulnonth A, Sasipreeyajan J and Svenson SB. 2000. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunol Med Mic* **29**: 221-225.
29. Cheong HJ, Lee YJ, Hwang IS, Kee SY, Cheong HW, Song JY, Kim JM, Park YH, Jung J and Kim WJ. 2007. Characteristics of non-typhoidal *Salmonella* isolates from human and broiler-chickens in Southwestern Seoul, Korea. *J Korean Med Sci* **22**: 773-778.
30. Chiodini RJ. 1982. Transovarian Passage, Visceral Distribution, and Pathogenicity of *Salmonella* in Snakes. *Infect Immun* **36**: 710-713.
31. Choi S, Woo JH, Lee JE, Park SJ, Choo EJ, Kwak YG, Kim M, Choi M, Lee NY, Lee BK, Kim NJ, Jeong J, Ryu J and Kim YS. 2005. Increasing incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enterica* isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**: 1111-1114.
32. Clavijo RI, Loui C, Andersen GL, Riley LW and Lu S. 2006. Identification of Genes Associated with Survival of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Chicken Egg Albumen. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1055-1064.
33. Cloeckaert A and Chaslus-Dancla E. 2001. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. *Vet Res* **32**: 291-300.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Seventh Edition. CLSI document M7-A7 [ISBN 1-56238-587-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA.

36. Corrente M, Madio A, Friedrich KG, Greco G, Desario C, Tagliabue S, D'Incau M, Campolo M and Buonavoglia C. 2004. Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. *J Appl Microbiol* **96**: 709–715
37. Cruchaga S, Echeita A, Aladueña A, Garcia-Peña J, Frias N and Usera MA. 2001. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *J Antimicrob Chemother* **47**: 315-321.
38. Crump JA, Barret TJ, Nelson JT and Angulo FJ. 2003. Reevaluating Fluoroquinolone Breakpoints for *Salmonella enterica* Serotype Typhi and for Non-Typhi *Salmonellae*. *Clin Infect Dis* **37**: 75-81.
39. Cui S, Li J, Sun Z, Hu C, Jin S, Guo Y, Ran L and Ma Y. 2008. Ciprofloxacin-Resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium, China. *Emerg Infect Dis* **14**: 493-495.
40. Darwin KH and Miller VL. 1999. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clin Microbiol Rev* **12**: 405-428.
41. Davidsson RJ, Davis I, Willey BM, Rizg K, Bolotin S, Porter V, Polsky J, Daneman N, McGeer A, Yang P, Scolnik D, Rowsell R, Imas O and Silverman MS. 2008. Antimalarial Therapy Selection for Quinolone Resistance among *Escherichia coli* in the Absence of Quinolone Exposure, in Tropical South America. *PLoS ONE* **3**(7): e2727. doi:10.1371/journal.pone.0002727
42. De Cesare A, Manfreda G, Dambaugh TR, Guerzoni ME and Franchini A. 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**: 780-785.
43. Del Cerro A, Soto SM, Landeras E, González-Hevia MA, Guijarro JA and Mendoza MC. 2002. PCR-based procedures in detection and DNA-fingerprinting of *Salmonella* from samples of animal origin. *Food Microbiol* **19**: 567-575.
44. De Oliveira FA, Brandelli A and Tondo EC. 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *New Microbiol* **29**: 49-54.
45. De Oliveira SD, Siqueira Flores F, Ruschel dos Santos and Brandelli A. 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *Int J Food Microbiol* **97**: 297-305
46. De Oliveira SD, Bessa MC, dos Santos LR, Cardoso MRI, Brandelli A and Canal CW. 2007. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Salmonella* Enteritidis Isolates. *Braz J Microbiol* **38**: 720-728
47. Dhanoa A and Fatt QK. 2009. Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: Epidemiology, clinical characteristics and it's association with severe immunosuppression. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **8**: 15 <http://www.ann-clinmicrob.com/content/8/1/15>
48. Dijkshoorn L, Ursing BM and Ursing JB. 2000. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J Med Microbiol* **49**: 397-401.

49. Eaves DJ, Randall L, Gray DT, Buckley A, Woodward MJ, White AP and Piddock LJV. 2004. Prevalence of Mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* and Association with Antibiotic Resistance in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4012-4015.
50. Enne VI. 2010. Reducing antimicrobial resistance in the community by restricting prescribing: can it be done? *J Antimicrob Chemother* **65**: 179-182.
51. Ercis S, Erdem B, Hasçelik G and Gür D. 2006. Nalidixic Acid Resistance in *Salmonella* Strains with Decreased Susceptibility to Ciprofloxacin Isolated from Humans in Turkey. *Jpn J Infect Dis* **59**: 117-119.
52. Erdem B, Ercis S, Hascelik G, Gur D, Gedikoglu S, Aysev AD, Sumerkan B, Tatman-Otkun M and Tuncer I. 2005. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000-2002. *Eur J Clin Microbiol* **24**: 220-225.
53. Escribano I, Rodriguez JC, Cebrian L, Royo G. 2004. The importance of active efflux system in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella* spp. *Int J Antimicrob Agents* **24**: 428-432.
54. EUCAST. 2009. „Fluoroquinolones – EUCAST clinical MIC breakpoints“ EUCAST antimicrobial breakpoints www.eucast.org
55. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. 2010. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2009. European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm, Sweden www.ecdc.europa.eu
56. EFSA - European Food Safety Authority. 2008. Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. *Clin Microbiol Infect* **14**: 522-533.
57. EFSA and ECDC - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2011a.. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; *EFSA Journal* **9**(3):2090. [378pp.] www.efsa.europa.eu/efsajournal
58. EFSA and ECDC- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2011b.. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. *EFSA Journal* **9**(7):2154. [321 pp] www.efsa.europa.eu/efsajournal
59. Fernandez J, Fica A, Ebensperger G, Calfullan H, Prat S, Fernandez A, Alexandre M and Heitmann I. 2003. Analysis of Molecular Epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Bacteriophage Typing. *J Clin Microbiol* **41**: 1617-1622.
60. Foley SL, White DG, McDermott PF, Walker RD, Rhodes B, Fedorka-Cray PJ, Simjee S and Zhao S. 2006. Comparison of Subtyping Methods for Differentiating *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates Obtained from Food Animal Sources. *J Clin Microbiol* **44**: 3569-3577.

61. Foley SL and Lynne AM. 2008. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci* **86**: E173-E187. http://jas.fass.org/cgi/content/full/86/14_suppl/E173
62. Foxman B and Riley L. 2001. Molecular Epidemiology: Focus on Infection. *Am J Epidemiol* **153**: 1135-1141.
63. Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD and Marrs CF. 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov* **2**:10. <http://www.epi-perspectives.com/content/2/1/10>
64. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F and Van Immerseel F. 2008. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Genes Induced during Oviduct Colonization and Egg Contamination in Laying Hens. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6616-6622.
65. Gast RK and Holt PS. Persistence of *Salmonella enteritidis* from One Day of Age Untill Maturity in Experimentally Infected Layer Chickens. *Poultry Sci* **77**:1759-1762.
66. Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM and Hooper DC. 2006. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis* **43**: 297-304.
67. Giraud E, Brisabois A, Martel JL and Chaslus-Dancla E. 1999. Comparative Studies of Mutations in Animal Isolates and Experimental In Vitro and In Vivo-Selected Mutants of *Salmonella* spp. Suggest a Counterselection of Highly Fluoroquinolone-Resistant Strains in the Field. *Antimicrob Agents Ch* **43**: 2131-2137.
68. Giraud E, Cloeckaert A, Baucheron S, Mouline C and Chaslus-Dancla E. Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Med Microbiol* **52**: 697-703.
69. Giraud E, Baucheron S and Cloeckaert A. 2006. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect* **8**: 1937-1944.
70. Gobin M, Launders N, Lane C, Kafatos G, Adak B. 2011. National outbreak of *Salmonella* Java phage type 3b variant 9 infection using parallel case-control and case-case study designs, United Kingdom, July to October 2010. *Euro Surveill* **16**(47):pii=20023. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20023>
71. Greig JD and Ravel A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *Int J Food Microbiol* **130**: 77-87.
72. Griggs DJ, Gensberg K and Piddock LJV. 1996. Mutations in *gyrA* Gene of Quinolone-Resistant *Salmonella* Serotypes Isolated from Humans and Animals. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1009-1013.
73. Guardabassi L, Schwarz S and Lloyd DH. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother* **54**: 321-332.

74. Guard-Bouldin J, Morales CA, Frye JG, Gast RK and Musgrove M. 2007. Detection of *Salmonella enterica* Subpopulations by Phenotype Microarray Antibiotic Resistance Patterns. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7753-7756.
75. Gunell M, Webber MA, Kotilainen P, Lilly AJ, Caddick JM, Jalava J, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen A and Piddock LJV. 2009. Mechanisms of Resistance in Nontyphoidal *Salmonella enterica* Strains Exhibiting a Nonclassical Quinolone Resistance Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3832-3836.
76. Gunell M. 2010. *Salmonella enterica*: Mechanisms of Fluoroquinolone and Macrolide Resistance. Thesis PhD. University of Turku, Finland
77. Gupte AR, de Rezende CLE and Joseph SW. 2003. Induction and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6669–6675.
78. Hakanen AJ, Lindgren M, Huovinen P, Jalava J, Siitonen A and Kotilainen P. New Quinolone Resistance Phenomenon in *Salmonella enterica*: Nalidixic Acid-Susceptible Isolates with Reduced Fluoroquinolone Susceptibility. *J Clin Microbiol* **43**: 5775-5778.
79. Harris JR, Neil KP, Behravesh CB, Sotir MJ and Angulo FJ. 2010. Recent Multistate Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Acquired from Turtles: A Continuing Public Health Challenge. *Clin Infect Dis* **50**: 554-559.
80. Haugum K, Aas L and Lindstedt BA. 2007. Effect of quinolone antibiotics and chemicals on mutation types in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar and Virchow. *J Chin Clin Med* **2**: 241-251.
81. Heck M. 2009. Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) – a reliable tool for rapid investigation of *Salmonella* Typhimurium outbreaks. *Euro Surveill* **14**(15):pii=19177.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19177>
82. Heisig P. 1993. High-level fluoroquinolone resistance in a *Salmonella typhimurium* isolate due to alterations in both *gyrA* and *gyrB* genes. *J Antimicrob Chemother* **32**: 367-377.
83. Heisig P, Kratz B, Halle E, Gräser Y, Altwegg M, Rabsh W and Faber JP. 1995. Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. *Microb Drug Resist* **1**: 211-218.
84. Hernández A, Sánchez MB and Martínez JL. 2011. Quinolone resistance: much more than predicted. *Front Microbio* **2**:22. doi: 10.3389/fmicb.2011.00022
<http://www.frontiersin.org>
85. Hoelzer K, Switt AIM and Wiedmann M. 2011. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet Res* **42**:34
<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/34>
86. Hohmann EL. 2001. Nontyphoidal Salmonellosis. *Clin Infect Dis* **32**: 263-269.
87. Holt PS, Geden CJ, Moore RW and Gast RK. 2007. Isolation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis from Houseflies (*Musca domestica*) Found in Rooms

- Containing *Salmonella* Serovar Enteritidis-Challenged Hens. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6030–6035
88. Hooper DC. 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Res Updates* **2**: 38-55.
 89. Hooper DC. 2000. Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* **31** (Suppl 2): S24-28
 90. Hopkins KL, Davies RH and Threlfall EJ. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents* **25**: 358-373.
 91. Hopkins KL, Day M and Threlfall EJ. 2008. Plasmid-mediated Quinolone Resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* **14**: 340-342.
 92. Hopkins KL, Peters TM, de Pinna E and Wain J. 2011. Standardisation of multilocus variable-number tandem *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Euro Surveill* **16**: pii=19942.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19942>
 93. Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, 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 DG and Malorny B. 2010. Virulotyping and Antimicrobial Resistance Typing of *Salmonella enterica* Serovars Relevant to Human Health in Europe. *Foodborne Pathog Dis* **7**: 523-535.
 94. Hunter PR and Gaston MA. 1988. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J Clin Microbiol* **26**: 2465-2466.
 95. İçgen B, Gürakan GC and Özcengiz G. 2002. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates of chicken, egg and human origin from Turkey. *Food Microbiol* **19**: 375-382.
 96. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. 2006. Zarazne bolesti u AP Vojvodini u 2005 godini. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine: 4, 24, 27-28.
 97. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. 2007. Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2006. godina. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine **1**: 6, 24, 27-28.
 98. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. 2008. Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2007. godina. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine **2**: 4, 27, 30-31.
 99. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. 2009. Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2008. godina. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine **3**: 9-10, 32-34.

100. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. 2010. Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2009. godina. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine **4**: 9, 32-34.
101. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. 2011. Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2010. godina. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine **5**: 6, 24, 27-28.
102. Ji J and Manak M. 2002. Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms for Epidemiological Studies: A Review of Current Methods. *J Clin Ligand Assay* **25**: 199-210.
103. Kabir SML. 2010. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. *Int J Environ Res Public Health* **7**: 89-114.
104. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, Rodloff A, Steinbakk M, Urbaskova P and Vatopoulos A. 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother* **52**: 145-148.
105. Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Brenner Michael G and Schwarz S. 2006. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother* **58**: 18-22.
106. Kehrenberg C, Jong A, Friederichs S, Cloeckart A and Schwartz S. 2007. Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *J Antimicrob Chemother* **59**: 886-892.
107. Kehrenberg C, Cloeckart A, Klein G and Schwarz S. 2009. Decreased fluoroquinolone susceptibility in mutants of *Salmonella* serovars other than Typhimurium: detection of novel mutations involved in modulated expression of *ramA* and *soxS*. *J Antimicrob Chemother* **64**: 1175-1180.
108. Kenney SJ, Anderson GL, Williams PL, Millner PD and Beuchat LR. 2004. Effectiveness of Cleaners and Sanitizers in Killing *Salmonella* Newport in the Gut of a Free-Living Nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J Food Protect* **67**: 2151–2157.
109. Khoodoo MHR, Issack MI and Jaufeerally-Fakim Y. 2002. Serotyping and RAPD profiles of *Salmonella enterica* isolates from Mauritius. *Lett Appl Microbiol* **35**: 146-152.
110. Kilmartin D, Morris D, O'Hare C, Corbett-Feeney G and Cormican M. 2005. Clonal Expansion May Account for High Levels of Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Appl Environ Microb* **71**: 2587-2591.
111. Kimura AC, Reddy V, Marcus R, Cieslak PR, Mohle-Boetani JC, Kassenborg HD, Segier SD, Hardnett FP, Barrett T, Swerdlow DL. 2004. Chicken Consumption Is a Newly Identified Risk Factor for Sporadic *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Infections in the United States: A Case-Control Study in FoodNet Sites. *Clin Infect Dis* **38** (suppl 3): 244-252.

112. Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris JG, and Sulakvelidze A. 2002. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical and Environmental *Salmonella* Strains. *J Clin Microbiol* **40**: 1626-1635.
113. Kotilainen P, Pitkänen S, Siitonen A, Huovinen P and Hakanen AJ. 2005. In vitro activities of 11 fluoroquinolones against 816 non-typhoidal strains of *Salmonella enterica* isolated from Finnish patients with special reference to reduced ciprofloxacin susceptibility. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **4**:12 <http://www.ann-clinmicrob.com/content/4/1/12>
114. Kownhar H, Shankar EM, Rajan R and Rao UA. 2007. Emergence of nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi resistant to ciprofloxacin in India. *J Med Microbiol* **56**: 136-137.
115. Laconcha I, López-Molina N, Rementeria A, Audicana A, Perales I and Garaizar J. 1998. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. *Int J Food Microbiol* **40**: 27-34.
116. Landeras E, González-Hevia A, Mendoza MC. 1998. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis Relationships between food, water and pathogenic strains. *Int J Food Microbiol* **43**: 81-90.
117. Larsson JT, Torpdahl M, Petersen RF, Sørensen G, Lindstedt BA and Nielsen EM. 2009. Development of a new nomenclature for Salmonella Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill* **14**:pii=19174. <http://www.eurosurveillance.org/viewarticle.aspx?articleid=19174>
118. Launay O, Van JCN, Buu-Hoï A and Acar JF. 1997. Typhoid fever due to a *Salmonella typhi* strain of reduced susceptibility to fluoroquinolones. *Clin Microbiol Infect* **3**: 541-544.
119. Le Hello S, Hendriksen RS, Doublet B, Fisher I, Møller Nielsen E, Whichard JM, Bouchrif B, Fashae K, Granier SA, Jourdan-Da Silva N, Cloeckert A, Threlfall JE, Angulo FJ, Aarestrup FM, Wain J and Weill FX. 2011. International Spread of an Epidemic Population of *Salmonella enterica* Serotype Kentucky ST198 Resistant to Ciprofloxacin. *J Infect Dis* **204**: 675-684.
120. Lemus JA, Blanco G, Grande J, Arroyo B, Garcia-Montijano M and Martinez F. 2008. Antibiotics Threaten Wildlife: Circulating Quinolone Residues and Disease in Avian Scavengers. *PLoS ONE* **3**(1): e1444.
121. Levy SB and Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine Suppl* **10**: S122-S129. <http://www.nature.com/naturemedicine>
122. Levy DD, Sharma B and Cebula TA. 2004. Single-Nucleotide Polymorphism Mutation Spectra and Resistance to Quinolones in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis with a Mutator Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2355-2363.
123. Liebana E. 2002. Molecular tools for epidemiological investigations of *S. enterica* subspecies *enterica* infections. *Res Vet Sci* **72**: 169-175

124. Liljebjelke KA, Hofacre CL, Liu T, White DG, Ayers S, Young S, Maurer JJ. 2005. Vertical and horizontal transmission of *Salmonella* within integrated broiler production system. *Foodborne Pathog Dis* **2**: 90-102.
125. Lim H, Lee KH, Hong CH, Bahk GJ and Choi WS. 2005. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. *Int J Food Microbiol* **105**: 411-418.
126. Lima AA, Sidrim JJ, Lima NL, Titlow W, Evans ME, Greenberg RN. 1997. Molecular epidemiology of multiply antibiotic-Resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. *J Clin Microbiol* **35**: 1061-1065.
127. Lin AW, Usera MA, Barrett TJ and Goldsby RA. 1996. Application of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis To Differentiate Strains of *Salmonella enteritidis*. *J Clin Microbiol* **34**: 870-876.
128. Ling JM, Koo IC, Kam KM and Cheng AF. 1998. Antimicrobial Susceptibilities and Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Strains Isolated in Hong Kong from 1986 to 1996. *J Clin Microbiol* **36**: 1693-1699.
129. Ling ML and Wang GCY. 2001. Epidemiological Analysis of *Salmonella enteritidis* Isolates in Singapore. *J Infect* **43**: 169-172.
130. Ling JM, Chan EW, Lam AW and Cheng AF. 2003. Mutations in Topoisomerase Genes of Fluoroquinolone-Resistant *Salmonellae* in Hong Kong. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2977-2981.
131. Livermore DM. 2003. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology and Impact. *Clin Infect Dis* **36**(suppl1): S11-23.
132. López-Molina N, Laconcha I, Rementeria A, Audicana A, Perales I and Garaizar J. 1998. Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types of PCR fingerprinting. *J Appl Microbiol* **84**: 877-882.
133. Lu S, Killoran PB and Riley LW. 2003. Association of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis YafD with Resistance to Chicken Egg Albumen. *Infect Immun* **71**: 6734-6741.
134. Lynch MF, Tauxe RV and Hedberg CW. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol Infect* **137**: 307-315.
135. Mach PA and Grimes DJ. 1982. R-Plasmid Transfer in a Wastewater Treatment Plant. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1395-1403.
136. Majtan T, Majtanova L, Timko J and Majtan V. 2007. Oligonucleotide microarray for molecular characterization and genotyping of *Salmonella* spp. strains. *J Antimicrob Chemother* **60**: 937-946.
137. Maré L, Dicks LMT and van der Walt ML. 2001. Characterization of South African isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. *Int J Food Microbiol* **64**: 237-245.
138. Marimón JM, Gomáriz M, Zigorraga C, Cilla G and Pérez-Trallero E. 2004. Increasing Prevalence of Quinolone Resistance in Human Nontyphoid *Salmonella*

- enterica* Isolates Obtained in Spain from 1981 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3789-3893.
139. Martínez-Martínez L, Pascual A and Jacoby GA. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**: 797-799.
 140. Martínez JL, Alonso A, Gómez-Gómez JM and Baquero F. 1998. Quinolone resistance by mutations in chromosomal gyrase genes. Just the tip of the iceberg? *J Antimicrob Chemother* **42**: 683-688.
 141. Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders FJM and Hilbert F. 2004. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *Int J Food Microbiol* **97**:23-29.
 142. Millemann Y, Lesage-Descauses MC, Lafont JP and Chaslus-Dancla E. 1996. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. *FEMS Immunol Med Mic* **14**: 129-134.
 143. Mølbak K, Gerner-Schmidt P, Wegener HC. 2002. Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. *Emerg Infect Dis* **8**: 514-515.
 144. Morales CA, Porwollik S, Frye JG, Kinde H, McClelland M and Guard-Bouldin J. 2005. Correlation of Phenotype with the Genotype of Egg-Contaminating *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4388-4399.
 145. Morshed R and Peighambari SM. 2010. Drug resistance, plasmid profile and random amplified polymorphic DNA analysis of Iranian isolates of *Salmonella* Enteritidis. *New Microbiol* **33**: 47-56.
 146. Nelson JM, Chiller TM, Powers JH and Angulo FJ. 2007. Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Species and the Withdrawal of Fluoroquinolones from Use in Poultry: A Public Health Success Story. *Clin Infect Dis* **44**: 977-980.
 147. Noel JT, Arrach N, Alagely A, McClelland M and Teplitski M. 2010. Specific Responses of *Salmonella enterica* to Tomato Varieties and Fruit Ripeness Identified by *In Vivo* Expression Technology. *PLoS ONE* **5**(8):e12406 <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0012406>
 148. Okamoto AS, Andreatti Filho RL, Rocha TS, Menconi A, Marietto-Gonçalves GA. 2009. Detection and Transfer of Antimicrobial Resistance Gene Integron in *Salmonella* Enteritidis Derived from Avian Material. *Braz J Poult Sci* **11**: 195-201.
 149. Olive DM and Bean P. 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J Clin Microbiol* **37**: 1661-1669.
 150. O'Regan E, Quinn T, Pagès JM, McCusker M, Piddock L and Fanning S. 2009. Multiple Regulatory Pathways Associated with High-Level Ciprofloxacin and Multidrug Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis: Involvement of *ramA* and Other Global Regulators. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1080-1087.
 151. O'Regan E, Quinn T, Frye JG, Pagès JM, Porwollik S, Fedorka-Cray PJ, McClelland M and Fanning S. 2010. Fitness Costs and Stability of a High-Level

- Ciprofloxacin Resistance Phenotype in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis: Reduced Infectivity Associated with Decreased Expression of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Genes. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 367-374.
152. Pallo-Zimmerman LM, Byron JK and Graves TK. 2010. Fluoroquinolones: Then and Now. *Compend Contin Educ Vet* **32**: E1-9
 153. Parker CT, Huynh S, Quiñones B, Harris LJ and Mandrell RE. 2010. Comparison of Genotypes of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Phage Type 30 and 9c Strains Isolated during Three Outbreaks Associated with Raw Almonds. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3723-3731.
 154. Pereira F, Carneiro J and Amorim A. 2008. Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges. *Recent Pat DNA Gene Seq* **2**:187-200.
 155. Piddock LJV. 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev* **19**: 382-402.
 156. Piddock LJV, Griggs DJ, Hall MC and Jin YF. 1993. Ciprofloxacin Resistance in Clinical Isolates of *Salmonella typhimurium* Obtained from Two Patients. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 662-666.
 157. Piddock LJV, Ricci V, McLaren I and Griggs DJ. 1998. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* **41**: 635-641.
 158. Piddock LJV. 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 3-16.
 159. Plym Forshell L and Wierup M. 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev Sci Tech Off int Epiz* **25**: 541-554.
 160. Rabsch W, Tschäpe H and Bäumlér AJ. 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect* **3**: 237-247.
 161. Rao S, Maddox CW, Hoién-Dalen P, Lanka S and Weigel RM. 2008. Diagnostic Accuracy of Class 1 Integron PCR Method in Detection of Antibiotic Resistance in *Salmonella* Isolates from Swine Production Systems. *J Clin Microbiol* **46**: 916-920.
 162. Robichek A, Jacoby GA and Hooper DC. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet* **6**: 629-40.
 163. Rodríguez-Avial I, Rodríguez-Avial C, López O and Picazo JJ. 2005. Trends in nalidixic acid resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolated from 1999 to 2002: decreased susceptibility to 6 fluoroquinolones. *Diagn Microb Infect Dis* **52**: 261-264.
 164. Rychlik I, Svestkova A and Karpiskova R. 2000. Subdivision of *Salmonella enterica* serovar enteritidis phage types PT14b and PT21 by plasmid profiling. *Vet Microbiol* **74**: 217-225.
 165. Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixidó M, Torres C and Vila J. 2004. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide on the MIC values of the

- quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother* **53**: 544-545.
166. Sahm DF, Thornsberry C, Jones ME and Karlowsky JA. 2003. Factors Influencing Fluoroquinolone Resistance. *Emerg Infect Dis* **9**: 1651-1654.
 167. San Martín B, Lapierre L, Toro C, Bravo V, Cornejo J, Hormazabal JC and Borie C. 2005. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Vet Microbiol* **110**: 239-244.
 168. Schikora A, Carreri A, Charpentier E and Hirt H. 2008. The Dark Side of the Salad: *Salmonella* Typhimurium Overcomes the Innate Immune Response of *Arabidopsis thaliana* and Shows an Endopathogenic Lifestyle. *PLoS ONE* **3**(5):e2279.
<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0002279>
 169. Schmidt H and Hensel M. 2004. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14-56.
 170. Sjölund-Karlsson M, Folster JP, Pecic G, Joyce K, Medalla F, Rickert R and Whichard JM. 2009. Emergence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance among Non-Typhi *Salmonella enterica* Isolates from Humans in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2142-2144.
 171. Smith SI, Fowora MA, Goodluck HA, Nwaokorie FO, Aboaba OO and Opere B. 2011. Molecular typing of *Salmonella* spp isolated from food handlers and animals in Nigeria. *Int J Mol Epidemiol Genet* **2**: 73-77.
 172. Soler P, González-Sanz R, Bleda MJ, Hernández G, Echeíta A and Usera MA. 2006. Antimicrobial resistance in non-typhoidal *Salmonella* from human sources, Spain, 2001-2003. *J Antimicrob Chemother* **58**: 310-314.
 173. Stevenson JE, Gay K, Barrett TJ, Medall F, Chiller TM and Angulo FJ. 2007. Increase in Nalidixic Acid Resistance among Non-Typhi *Salmonella enterica* Isolates in the United States from 1996 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 195-197.
 174. Stojanov I, Orlić D, Kapetanov M, Plavša N, Maljković M. 2008. Prevalenca serotipova salmonela u živinskim materijalima - kontrola salmoneloze. Zbornik radova i kratkih sadržaja, 20. Savetovanje veterinarara Srbije, Zlatibor: 170-172 (srp).
 175. Stojanov I, Tambur Z, Ratajac R, Stojanović D, Prodanov-Radulović J, Pušić I, Kapetanov M. 2010. Razlika rezistencije *Salmonella* Enteridis i *Salmonella* Infantis prema nalidiksičnoj kiselini. Zbornik kratkih sadržaja, Simpozijum Stočarstvo, veterinarska medicina i ekonomika u ruralnom razvoju i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane sa međunarodnim učešćem, Divčibare: 39 (srp).
 176. Stojanov I, Potkonjak D, Kapetanov M, Ratajac R, Maljković M, Pušić I, Jovičin M. 2011. Promene prisustva pojedinih serotipova salmonela u materijalima poreklom od živine. Zbornik radova i kratkih sadržaja, Prvi internacionalni epizootiološki dani, Sijarinska banja: 86-87 (srp).
 177. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC and Robicsek A. 2009. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol Rev* **22**: 664-689.

178. Soto SM, González-Hevia MA and Mendoza MC. 2003. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1287-1291.
179. Šeputienė V, Povilonis J, Ružauskas M, Virgailis M, Žlabys P and Sužiedėlienė E. 2006. Quinolone resistance among *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in Lithuania. *Biologija* **3**: 74-78.
180. Tamang MD, Nam H, Kim A, Lee H, Kim T, Kim M, Jang G, Jung S and Lim S. 2011. Prevalence and Mechanisms of Quinolone Resistance Among Selected Nontyphoid *Salmonella* Isolated from Food Animals and Humans in Korea. *Foodborne Pathog Dis* **8**: 1199-1206.
181. Tassios PT, Markogiannakis A, Vatopoulos AC, Katsanikou E, Velonakis EN, Kourea-Kremastinou J and Legakis NJ. 1997. Molecular Epidemiology of Antibiotic Resistance of *Salmonella enteritidis* during a 7-year Period in Greece. *J Clin Microbiol* **35**: 1316-1321.
182. Tezcan-Merdol D, Ljungström M, Winiecka-Krusnell J, Linder E, Engstrand L and Rhen M. 2004. Uptake and Replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhysoides*. *Appl Environ Microb* **70**: 3706-3714.
183. Threlfall EJ, Ward LR, Frost JA and Willshaw GA. 2000. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int J Food Microbiol* **62**: 1-5.
184. Threlfall EJ, Skinner JA and Ward LR. 2001. Detection of decreased in vitro susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serotypes Typhi and Paratyphi A. *J Antimicrob Chemother* **48**: 740-741.
185. Tran JH and Jakoby GA. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 5638-5642.
186. Van TTH, Moutafis G, Istivan T, Tran LT and Coloe PJ. 2007. Detection of *Salmonella* spp in Retail Raw Food Samples from Vietnam and Characterization of Their Antibiotic Resistance. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6885-6890.
187. Van Bambeke F, Michot J-M, Van Eldere J and Tulkens PM. 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* **11**: 256-280.
188. Van Bambeke F, Pagès JM and Lee VJ. 2010. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibacterial Therapy and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. In: *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery* **1**: 138-175.
189. Van Duijkeren E, Wannet WJB, Houwers DJ and van Pelt W. 2003. Antimicrobial Susceptibilities of *Salmonella* Strains Isolated from Humans, Cattle, Pigs, and Chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J Clin Microbiol* **41**: 3574-3578.
190. Van Hoorebeke S, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R and Dewulf J. 2011. The Influence of the Housing System on *Salmonella* Infections in Laying Hens: A Review. *Zoonoses Public Hlth* **58**: 304-311.

191. Van Immerseel F. 2010. Stress-induced survival strategies enable *Salmonella* Enteritidis to persistently colonize the chicken oviduct tissue and cope with antimicrobial factors in egg white: A hypothesis to explain a pandemic. *Gut Pathog* **2**: 23 <http://www.gutpathogens.com/contents/2/1/23>
192. Vaz CSL, Streck AF, Michael GB, Marks FS, Rodrigues DP, dos Reis EMF, Cardoso MRI and Canal CW. 2010. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poult Sci* **89**:1530-1536.
193. Velge P, Cloeckaert A and Barrow P. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res* **36**: 267-288.
194. White PA, McIver CJ and Rawlinson WD. 2001. Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2658-2661.
195. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella: Grimont PAD and Weill FX. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th Edition
196. Weigel RM, Qiao B, Teferedegne B, Suh DK, Barber DA, Isaacson RE and White BA. 2004. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. *Vet Microbiol* **100**: 205-217.
197. Weill FX, Demartin M, Fabre L and Grimont PAD. 2004. Extended-Spectrum- β -Lactamase (TEM-52)-Producing Strains of *Salmonella enterica* of Various Serotypes Isolated in France. *J Clin Microbiol* **42**: 3359-3362.
198. Welsh J and McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**: 7213-7218.
199. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531-6535.
200. Wildschutte H and Lawrence JG. 2007. Differential *Salmonella* survival against communities of intestinal amoebae. *Microbiology+* **153**: 1781-1789.
201. Winfield MD and Groisman EA. 2003. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb* **69**: 3687-3694.
202. Wolfson JS and Hooper DC. 1985. The Fluoroquinolones: Structures, Mechanisms of Action and Resistance, and Spectra of Activity In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **28**: 581-586.
203. Wu JJ, Ko WC, Chiou CS, Chen HM, Wang LR and Yan JJ. 2008. Emergence of Qnr determinants in human *Salmonella* isolates in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* **62**: 1269-1272.
204. Wybo I, Wildemauwe C, Godard C, Bertrand S and Collard JM. 2004. Antimicrobial Drug Resistance in Nontyphoid Human *Salmonella* in Belgium: Trends for the Period 2000-2002. *Acta Clinica Belgica*: 59-63.

205. Xia S, Hendriksen RS, Xie Z, Huang L, Zhang J, Guo W, Xu B, Ran L and Aarestrup FM. 2009. Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* Isolates from Infections in Humans in Henan Province, China. *J Clin Microbiol* **47**: 401-409.
206. Yim L, Betancor L, Martinez A, Giossa G, Bryant C, Maskell D and Chabalgoity JA. 2010. Differential Phenotypic Diversity among Epidemic-Spanning *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates from Humans or Animals. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6812-6820.
207. Zhang Q, Sahin O, McDermott PF and Payot S. 2006. Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. *Microbes Infect* **8**: 1972-1978.
208. Zheng J, Keys CE, Zhao S, Ahmed R, Meng J and Brown EW. 2011. Simultaneous Analysis of Multiple Enzymes Increases Accuracy of Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Assigning Genetic Relationships among Homogeneous *Salmonella* Strains. *J Clin Microbiol* **49**: 85-94.
209. Zou W, Lin WJ, Foley SL, Chen CH, Nayak R and Chen JJ. 2010. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles for Identification of *Salmonella* Serotypes. *J Clin Microbiol* **48**: 3122-3126.

BIOGRAFIJA

Gordana (Vladimir) Kozoderović rođena je 7. maja 1969. godine u Somboru, Srbija. Osnovnu i srednju školu završila je u Somboru. Diplomirala je na odseku Opšta Biologija Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Diplomski rad pod nazivom „Efekti grešaka u mismatch reparaciji na nivo spontane mutageneze kod *Escherichia coli*“ odbranila je 1994. godine na smeru Mikrobiologija. Akademsko zvanje magistra bioloških nauka stekla je 2001. godine nakon završenih postdiplomskih studija na smeru Biologija mikroorganizama na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i odbrane magistarske teze pod nazivom “Primena metoda molekulske genetike u ispitivanju epidemioloških markera izolata *Shigella flexneri 2a*”. U zvanje Istraživač saradnik za naučnu oblast Mikrobiologija i zarazne bolesti izabrana je 2006. godine u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“. Od 1994. godine zaposlena je u Institutu za javno zdravlje Vojvodine u Novom Sadu, gde je trenutno na mestu šefa odseka za molekularnu biologiju u okviru Referentne laboratorije za registrovanje i praćenje rezistencije bakterijskih sojeva na antimikrobna sredstva. Usavršavala se iz oblasti primene molekularnih metoda u mikrobiologiji u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, na Vojnomedicinskoj akademiji i Infektivnoj klinici u Beogradu, Institutu za nuklearne nauke u Vinči, Pasterovom Institutu u Parizu i University Colledge u Londonu. Molekularnom tipizacijom i mehanizmima rezistencije bavi se od početka svog profesionalnog angažovanja, a rezultate svojih istraživanja objavila je u preko 50 naučnih radova.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Гордана Козодеровић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Анализа природе резистенције на хинолоне и молекуларна типизација одабраних серотипова *Salmonella enterica* subspecies *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 докторанта

У Београду, 23.03.2012.

Гордана Козодеровић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Гордана Козодеровић

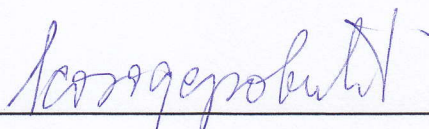
Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада: „Анализа природе резистенције на хинолоне и молекуларна типизација одабраних серотипова *Salmonella enterica* subspecies *enterica*“

Ментори: Доц. др Јелена Лозо, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду;
Проф. др Весна Милошевић, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду

Потписани _____



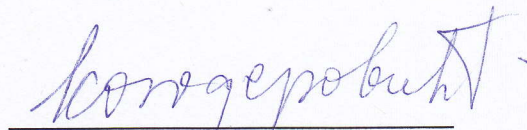
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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 докторанта

У Београду, 23.03.2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Анализа природе резистенције на хинолоне и молекуларна типизација одабраних серотипова *Salmonella enterica* subspecies *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).

У Београду, 23.03.2012.

Потпис докторанта

Коча Марковић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.