



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Departman za veterinarsku medicinu**

Mr sc. vet. med. Mirčeta Jovan

**PRISUSTVO, KARAKTERIZACIJA I KONTROLNE
OPCIJE ZA *SALMONELLA ENTERICA* U LANCU
MESA DIVLJE SVINJE**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2017.

**KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU
DOKTORSKE DISERTACIJE**

Dr Bojan Blagojević, docent, mentor,
za užu naučnu oblast Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
Departman za veterinarsku medicinu

Dr Sava Bunčić, redovni profesor, predsednik,
za užu naučnu oblast Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
Departman za veterinarsku medicinu

Dr Jelena Petrović, viši naučni saradnik, član,
za užu naučnu oblast Higijena i tehnologija namirnica animalnog porekla
Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, Novi sad

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: Mr Mirčeta Jovan
AU

Mentor: Dr Bojan Blagojević, docent
MN

Naslov rada: Prisustvo, karakterizacija i kontrolne opcije za
NR *Salmonella enterica* u lancu mesa divlje svinje

Jezik publikacije: Srpski
JP

Jezik izvoda: Srpski / Engleski
JI

Zemlja publikovanja: R. Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2017.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8
MA

Fizički opis rada: 7 poglavlja / 118 strana / 157 reference / 19 tabela /
FO 4 grafikona / 3 slike

Naučna oblast: Veterinarska medicina
NO

Naučna disciplina: Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda
ND

Ključne reči: *Salmonella enterica*; meso trupova; koža; divlje svinje;
KR mikrobiološka kontaminacija; lovna praksa; bezbednost mesa

UDK: 636.085:579.62:641.12:599.73.1 (043.3)

Čuva se (ČU): Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad

Važna napomena (VN): Nema

Izvod (IZ):

Istraživanje je sprovedeno u cilju utvrđivanja prisustva i raširenosti infekcije sa *Salmonella enterica* u populaciji divljih svinja u lovnim gazdinstvima u Republici Srbiji, kao i uticaju procesa lova i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status.

U pogledu jednog od najznačajnijih alimentarnih patogena u divljih svinja, *Salmonella enterica*, ukupno je ispitano 425 jedinki, odstreljenih u 12 lovnih gazdinstava. Ukupna prevalencija *Salmonella* je iznosila 4,2%. Najviše izolata je dobijeno iz fecesa (13, odnosno 3,1%), dok je iz brisa kože i površine mesa trupova dobijeno 3 (0,7%) odnosno 4 izolata (0,9%) i samo 1 izolat iz mezenterijalnog limfnog čvora (0,2%). Serotipizacijom izolata *Salmonella enterica* potvrđeni su serotipovi *S. Enteritidis* (71,4% od ukupnog broja izolata), *S. Typhimurium* (23,8%) i *S. Infantis* (samo jedan izolat, 4,8%).

Salmonella enterica je statistički značajno češće utvrđena kod životinja iz otvorenog lovišta, kao i kod jedinki ženskog pola starijih od 36 meseci i težih od 75 kg. Molekularnom karakterizacijom izolata *Salmonella enterica* metodom elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE) utvrđeni su identični profil *S. Typhimurium* iz fecesa i na površini mesa trupa iste divlje svinje, što ukazuje na prenos ovog patogena sa fecesa na meso trupa tokom evisceracije. Takođe su metodom PFGE utvrđeni identični i/ili visoko srodni profili *Salmonella enterica* kod divljih svinja poreklom iz različitih lovišta i između divljih svinja, domaćih svinja i živine poreklom sa farmi u okolini lovišta. Ovo ukazuje na postojanje genetske veze, kao i mogućnost postojanja epidemiološke veze između divljih svinja i domaćih životinja u pogledu ovog patogena.

Utvrđena je visoka mikrobiološka kontaminacija kože i mesa trupova divljih svinja bakterijama indikatorima opšte i fekalne kontaminacije. Na osnovu uzorkovanih 210 divljih svinja, izlovljenih u 8 lovišta, prosečan ukupan broj bakterija (ACC) utvrđen na koži bio je je $5,2 \log_{10}$ cfu/cm², a broj *Enterobacteriaceae* (EBC) $3,6 \log_{10}$ cfu/cm². Prosečan ACC utvrđen na mesu trupova iznosio je $5,4 \log_{10}$ cfu/cm², a EBC $3,8 \log_{10}$ cfu/cm². Viši nivo mikrobiološke kontaminacije na mesu trupova divljih svinja u odnosu na kožu ukazuje da drugi izvori kontaminacije (prolivanje sadržaja creva kao posledice ustreljivanja u abdomen i druge nehigijenske procedure tokom obrade trupova) igraju važniju ulogu u kontaminaciji mesa trupova nego koža. Na mikrobiološki status trupova su najviše uticale procedure lova i obrade trupova, pa je na nivou pojedinih lovišta utvrđena statistički značajna razlika između trupova ispravno odstreljenih životinja i onih pogođenih u abdomen. Na viši nivo mikrobiološke kontaminacije sa ACC i EBC su takođe uticale procedura evisceracije na terenu na otvorenom u ležećem položaju na zemlji i bez dostupne čiste vode, kao i veoma nehigijenska praksa pranja kože i unutrašnjih površina trupova nakon obavljene evisceracije.

Rezultati ovog istraživanja značajno doprinose razumevanju epidemiologije *Salmonella enterica* u divljih svinja u Srbiji i rizičnih faktora koji utiču na njeno širenje i mogućnost prenosa na ljude alimentarnim putem, kao i uticaja procesa lova i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status. Oni takođe predstavljaju i naučnu osnovu za dalji razvoj strategija za kontrolu *S. enterica* u populaciji divljih svinja u Srbiji i sveukupne mikrobiološke kontaminacije mesa trupova.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

DP 30. 5. 2014. godine

Datum odbrane: _____

DO

Članovi komisije: dr Bojan Blagojević, docent, (mentor)

KO Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Naučna oblast: Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda

dr Sava Bunčić, redovni profesor, (predsednik)

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Naučna oblast: Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda

dr Jelena Petrović, viši naučni saradnik, (član)

Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, Novi sad

Naučna oblast: Higijena i tehnologija namirnica animalnog porekla

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monograph documentation
DT
Type of record: Textual printed material
TR
Contents code: Doctoral dissertation
CC
Author: Jovan Mirčeta, MSc
AU
Mentor: Bojan Blagojević, PhD, Asistant Professor
MN
Title: The presence, characterization and control options for
TI *Salmonella enterica* in the wild boar meat chain
Language of text: Serbian
LT
Language of abstract: Serbian / English
LA
Country of publication: Serbia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2017.
PY
Publisher: Author's reprint
PU
Publication place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8
PP
Physical description: 7 chapters / 118 pages / 157 references / 19 tables /
PD 4 graphs / 3 images
Scientific field: Veterinary medicine
SF
Scientific discipline: Animal diseases and hygiene of animal production
SD
Keywords: *Salmonella enterica*; carcass meat; skin; wild boars; microbial
KW contamination; hunting procedures; meat safety

UDC: 636.085:579.62:641.12:599.73.1 (043.3)

Holding data (HD): Library, Faculty of Agriculture, Novi Sad
Note (N): None

Abstract (AB):

The presence and distribution of *Salmonella enterica* infection in wild boar population in hunting estates in Serbia was studied, as well as the impact of hunting and carcass dressing procedures on their microbiological conditions.

With respect to the main foodborne pathogen from wild boars, *Salmonella enterica*, the total number of 425 wild boars, originating from 12 hunting estates, was examined. The overall *Salmonella* prevalence was 4.2%. Isolates were recovered from faeces (13, representing 3.1%), while fewer from skin and carcass meat swabs, i.e. 3 (0.7%) and 4 (0.9%) respectively and only one isolate from mesenteric lymph node (0.2%). Serotyping of *S. enterica* isolates confirmed serotypes *S. Enteritidis* (71.4% of total numbers of isolates), *S. Typhimurium* (23.8%) and *S. Infantis* (only one isolate, 4.8%).

Salmonella enterica was more often found in animals originating from open hunting estates, and from females older than 36 months weighing >75 kg. Molecular characterisation of *S. enterica* isolates using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) revealed identical profile of *S. Typhimurium* from the faeces and carcass meat surface of the same animal, indicating transmission of this pathogen from the faeces to carcass meat during evisceration. Also, identical and/or highly related profiles of *S. enterica* were determined from wild boars from different hunting estates and between wild boars and domestic pigs and poultry from nearby farms in close proximity to hunting estates. This indicates the existence of genetic link, and possibility of epidemiological link as well between wild boars and domestic animals in respect to this microbial pathogen.

High microbial contamination of wild boar skin and carcass meat with indicators of general and faecal contamination was found. Based on 210 sampled wild boars from eight hunting estates, the mean aerobic colony counts (ACC) on wild boar skin was $5,2 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ and *Enterobacteriaceae* counts (EBC) $3,6 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$. The mean ACC on carcass meat was $5,4 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$, and EBC $3,8 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$. Higher levels of microbial contamination on wild boar carcass meat comparing to the skin indicate that sources other than skin (such as gut content spillage due to abdominal shot, as well as other unhygienic carcass dressing procedures) play important role in carcass meat contamination. Hunting and dressing procedures mostly influenced carcass meat microbial conditions, hence statistically significant difference was observed between properly shot animals and animals shot in abdominal region, as shown on the individual hunting estate level. Other procedures also had an influence on the higher carcass meat microbial contamination with ACC and EBC, such as evisceration in the field in lying position on the ground and without access to a clean water, as well as very unhygienic practice of washing skin and interior carcass surfaces after completed evisceration.

The results from this study significantly contribute to the understanding of *Salmonella enterica* epidemiology in wild boars in Serbia and risk factors that contribute to its spread and transmission to humans, as well as to the impact of hunting and carcass dressing procedures on their microbial status. These results are also sound scientific basis for further development of control strategies for *S. enterica* in wild boar population in Serbia and control of overall microbial contamination on wild boar carcass meat.

Accepted by the Scientific Board on:

AS 30/5/2014

Defended: _____
(DE)

Thesis Defense Board: (DB) dr Bojan Blagojević, Assistant Professor, (Mentor)
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
Scientific discipline: Animal diseases and hygiene of animal production

dr Sava Bunčić, Full Professor, (President)
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
Scientific discipline: Animal diseases and hygiene of animal production

dr Jelena Petrović, Senior Research Fellow, (Member)
Scientific Veterinary Institute Novi Sad
Scientific discipline: Hygiene and technology of food of animal origin

PRISUSTVO, KARAKTERIZACIJA I KONTROLNE OPCIJE ZA *SALMONELLA ENTERICA* U LANCU MESA DIVLJE SVINJE

Kratak sadržaj

Istraživanje je sprovedeno u cilju utvrđivanja prisustva i raširenosti infekcije sa *Salmonella enterica* u populaciji divljih svinja u lovnim gazdinstvima u Republici Srbiji, kao i uticaju procesa lova i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status.

U pogledu jednog od najznačajnijih alimentarnih patogena u divljih svinja, *Salmonella enterica*, ukupno je ispitano 425 jedinki, odstreljenih u 12 lovnih gazdinstava. Ukupna prevalencija *Salmonella* je iznosila 4,2%. Najviše izolata je dobijeno iz fecesa (13, odnosno 3,1%), dok je iz brisa kože i površine mesa trupova dobijeno 3 (0,7%) odnosno 4 izolata (0,9%) i samo 1 izolat iz mezenterijalnog limfnog čvora (0,2%). Serotipizacijom izolata *Salmonella enterica* potvrđeni su serotipovi *S. Enteritidis* (71,4% od ukupnog broja izolata), *S. Typhimurium* (23,8%) i *S. Infantis* (samo jedan izolat, 4,8%).

Salmonella enterica je statistički značajno češće utvrđena kod životinja iz otvorenog lovišta, kao i kod jedinki ženskog pola starijih od 36 meseci i težih od 75 kg. Molekularnom karakterizacijom izolata *Salmonella enterica* metodom elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE) utvrđeni su identični profil *S. Typhimurium* iz fecesa i na površini mesa trupa iste divlje svinje, što ukazuje na prenos ovog patogena sa fecesa na meso trupa tokom evisceracije. Takođe su metodom PFGE utvrđeni identični i/ili visoko srodni profili *Salmonella enterica* kod divljih svinja poreklom iz različitih lovišta i između divljih svinja, domaćih svinja i živine poreklom sa farmi u okolini lovišta. Ovo ukazuje na postojanje genetske veze, kao i mogućnost postojanja epidemiološke veze između divljih svinja i domaćih životinja u pogledu ovog patogena.

Utvrđena je visoka mikrobiološka kontaminacija kože i mesa trupova divljih svinja bakterijama indikatorima opšte i fekalne kontaminacije. Na osnovu uzorkovanih 210 divljih svinja, izlovljenih u 8 lovišta, prosečan ukupan broj bakterija (ACC) utvrđen na koži bio je je 5,2 log₁₀ cfu/cm², a broj *Enterobacteriaceae* (EBC) 3,6 log₁₀ cfu/cm². Prosečan ACC utvrđen na mesu trupova iznosio je 5,4 log₁₀ cfu/cm², a EBC 3,8 log₁₀ cfu/cm². Viši nivo mikrobiološke kontaminacije na mesu trupova divljih svinja u odnosu na kožu ukazuje da drugi izvori kontaminacije (prolivanje sadržaja creva kao posledice ustreljivanja u abdomen i druge nehigijenske procedure tokom obrade trupova) igraju važniju ulogu u kontaminaciji mesa trupova nego koža. Na mikrobiološki status trupova su najviše uticale procedure lova i obrade trupova, pa je na nivou pojedinih lovišta utvrđena statistički značajna razlika između trupova ispravno odstreljenih životinja i onih pogodenih u abdomen. Na viši nivo mikrobiološke kontaminacije sa ACC i EBC su takođe uticale procedura evisceracije na terenu na otvorenom u ležećem položaju na zemlji i bez dostupne čiste vode, kao i veoma nehigijenska praksa pranja kože i unutrašnjih površina trupova nakon obavljene evisceracije.

Rezultati ovog istraživanja značajno doprinose razumevanju epidemiologije *Salmonella enterica* u divljih svinja u Srbiji i rizičnih faktora koji utiču na njeno širenje i mogućnost prenosa na ljude alimentarnim putem, kao i uticaja procesa lova i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status. Oni takođe predstavljaju i naučnu osnovu za dalji razvoj strategija za kontrolu *S. enterica* u populaciji divljih svinja u Srbiji i sveukupne mikrobiološke kontaminacije mesa trupova.

Ključne reči: *Salmonella enterica*; meso trupova; koža; divlje svinje; mikrobiološka kontaminacija; lovna praksa; bezbednost mesa.

Doktorska disertacija je odložena u biblioteci Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Disertacija sadrži: 118 strana, 19 tabela, 4 grafikona, 3 slike, original na srpskom jeziku i kratak sadržaj na engleskom jeziku.

THE PRESENCE, CHARACTERIZATION AND CONTROL OPTIONS FOR *SALMONELLA ENTERICA* IN THE WILD BOAR MEAT CHAIN

Abstract

The presence and distribution of *Salmonella enterica* infection in wild boar population in hunting estates in Serbia was studied, as well as the impact of hunting and carcass dressing procedures on their microbiological conditions.

With respect to the main foodborne pathogen from wild boars, *Salmonella enterica*, the total number of 425 wild boars, originating from 12 hunting estates, was examined. The overall *Salmonella* prevalence was 4.2%. Isolates were recovered from faeces (13, representing 3.1%), while fewer from skin and carcass meat swabs, i.e. 3 (0.7%) and 4 (0.9%) respectively and only one isolate from mesenteric lymph node (0.2%). Serotyping of *S. enterica* isolates confirmed serotypes *S. Enteritidis* (71.4% of total numbers of isolates), *S. Typhimurium* (23.8%) and *S. Infantis* (only one isolate, 4.8%).

Salmonella enterica was more often found in animals originating from open hunting estates, and from females older than 36 months weighing >75 kg. Molecular characterisation of *S. enterica* isolates using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) revealed identical profile of *S. Typhimurium* from the faeces and carcass meat surface of the same animal, indicating transmission of this pathogen from the faeces to carcass meat during evisceration. Also, identical and/or highly related profiles of *S. enterica* were determined from wild boars from different hunting estates and between wild boars and domestic pigs and poultry from nearby farms in close proximity to hunting estates. This indicates the existence of genetic link, and possibility of epidemiological link as well between wild boars and domestic animals in respect to this microbial pathogen.

High microbial contamination of wild boar skin and carcass meat with indicators of general and faecal contamination was found. Based on 210 sampled wild boars from eight hunting estates, the mean aerobic colony counts (ACC) on wild boar skin was $5,2 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ and *Enterobacteriaceae* counts (EBC) $3,6 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$. The mean ACC on carcass meat was $5,4 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$, and EBC $3,8 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$. Higher levels of microbial contamination on wild boar carcass meat comparing to the skin indicate that sources other than skin (such as gut content spillage due to abdominal shot, as well as other unhygienic carcass dressing procedures) play important role in carcass meat contamination. Hunting and dressing procedures mostly influenced carcass meat microbial conditions, hence statistically significant difference was observed between properly shot animals and animals shot in abdominal region, as shown on the individual hunting estate level. Other procedures also had an influence on the higher carcass meat microbial contamination with ACC and EBC, such as evisceration in the field in lying position on the ground and without access to a clean water, as well as very unhygienic practice of washing skin and interior carcass surfaces after completed evisceration.

The results from this study significantly contribute to the understanding of *Salmonella enterica* epidemiology in wild boars in Serbia and risk factors that contribute to its spread and transmission to humans, as well as to the impact of hunting and carcass dressing procedures on their microbial status. These results are also sound scientific basis for further development of control strategies for *S. enterica* in wild boar population in Serbia and control of overall microbial contamination on wild boar carcass meat.

Keywords: *Salmonella enterica*; carcass meat; skin; wild boars; microbial contamination; hunting procedures; meat safety.

Zahvalnost

Želeo bih na ovom mestu da se zahvalim svom mentoru docentu dr Bojanu Blagojeviću i članovima komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije prof. dr Savi Bunčiću i višem naučnom saradniku dr Jeleni Petrović.

Posebnu zahvalnost izražavam dr Draganu Antiću za svu istrajnost, pomoć i sugestije bez koga ne bi bilo ove teze.

Hvala zaposlenim na odeljenju za higijenu namirnica animalnog porekla NiV Novi Sad na čelu sa dr Jelenom Petrović na nesesebičnoj pomoći u eksperimentalnom delu istraživanja.

Također želim da izrazim zahvalnost zaposlenim u šumskim upravama JP „Vojvodinašume“ na pomoći pri terenskom radu.

Na razumevanju tokom izrade ove doktorske disertacije, veliku zahvalnost dugujem svojoj porodici.

Mojoj deci Ljubici i Neveni posvećujem ovu tezu.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Karakteristike lanca mesa lovne divljači i rizici za javno zdravlje	5
2.1.1. Potrošnja mesa divljači.....	6
2.1.2. Rizici za javno zdravlje iz mesa divljači.....	7
2.1.3. Mikrobiološka kontaminacija mesa divlje svinje.....	10
2.1.3.1. Mikrobiota trupova divljih svinja.....	10
2.1.3.2. Mikrobiota mesa divljih svinja u prometu	11
2.1.4. Odstrel i faze u obradi trupova divljači	12
2.1.4.1. Odstrel divljači	12
2.1.4.2. Evisceracija divljači	13
2.1.4.3. Skidanje kože divljači	14
2.1.4.4. Ostale faze obrade trupova divljači	15
2.2. <i>Salmonella enterica</i> kao alimentarni hazard.....	17
2.2.1. Karakteristike <i>Salmonella enterica</i>	17
2.2.2. Izolacija, identifikacija i karakterizacija <i>Salmonella enterica</i>	18
2.2.2.1. Uzorkovanje	18
2.2.2.2. Kultivisanje	19
2.2.2.2.1. Predobogaćenje	19
2.2.2.2.2. Obogaćenje.....	20
2.2.2.2.3. Izolacija i identifikacija.....	20
2.2.2.2.4. Potvrda identiteta	20
2.2.2.3. Metode identifikacije i karakterizacije bazirane na imunološkim reakcijama i nukleinskim kiselinama.....	21
2.2.2.4. Serološki testovi	22
2.2.3. Salmoneloza ljudi	23
2.2.3.1. Putevi prenosa <i>Salmonella</i> iz sredine ka ljudima.....	23
2.2.3.2. Klinička slika salmoneloze ljudi	23
2.2.3.3. Incidencija salmoneloze na teritoriji zemalja EU.....	24
2.2.3.4. Incidencija salmoneloze na teritoriji SAD	27
2.2.3.5. Incidencija salmoneloze na teritoriji Republike Srbije	28
2.2.4. <i>Salmonella enterica</i> u divljih svinja	28
2.2.4.1. Klinička slika salmoneloze divljih svinja.....	28
2.2.4.2. Prisustvo <i>Salmonella enterica</i> kod divljih svinja.....	29
2.2.4.3. Prisustvo <i>Salmonella enterica</i> na mesu trupova divljih svinja.....	33
2.2.4.4. Izvori i putevi mikrobiološke kontaminacije mesa divlje svinje sa <i>Salmonella</i>	34
2.3. Kontrolne mere za <i>Salmonella enterica</i> u lancu mesa lovne divljači.....	36
2.3.1 Postojeći kontrolni programi za <i>Salmonella</i> u lancu mesa.....	36
2.3.1.1. Svrha uspostavljanja programa kontrole	36
2.3.1.2. Rezultati monitoringa <i>Salmonella</i> spp. u svinja.....	38

2.3.1.3. Rezultati monitoringa <i>Salmonella</i> spp. u mesu i proizvodima od mesa svinja	38
2.3.1.4. Monitoring program <i>Salmonella</i> u Republici Srbiji	40
2.3.2 Kontrolne mere u lancu mesa lovne divljači	40
2.3.2.1. Kontrolne mere u živih divljih svinja	41
2.3.2.2. Kontrolne mere tokom lova i odstrela	42
2.3.2.3. Kontrolne mere tokom obrade trupova divljih svinja	43
2.3.2.4. Obeležavanje i stavljanje u promet mesa divljih svinja	44
2.3.3. Mikrobiološki kriterijumi za meso	45
2.3.3.1. Opšti principi i uspostavljanje mikrobioloških kriterijuma	45
2.3.3.1.1. Razlozi za uspostavljanje i svrha mikrobioloških kriterijuma	45
2.3.3.1.2. Opšti principi mikrobioloških kriterijuma	45
2.3.3.1.3. Uspostavljanje i uvođenje u legislativu mikrobioloških kriterijuma	46
2.3.3.2. Tipovi mikrobioloških kriterijuma koji se primenjuju u EU i Republici Srbiji	46
2.3.3.2.1. Kriterijum bezbednosti hrane	47
2.3.3.2.2. Kriterijum procesne higijene	48
2.3.3.3. Elementi mikrobioloških kriterijuma	50
2.3.3.3.1. Plan uzorkovanja	50
2.3.3.3.2. Tumačenje rezultata mikrobiološkog ispitivanja hrane	51
2.3.3.3.3. Tehnike uzorkovanja trupova na liniji klanja	52
2.3.3.4. Problemi sa trenutnim EU mikrobiološkim kriterijumima za hranu	54
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	55
3.1. Ocena sadašnjeg stanja nauke i prakse u oblasti epidemiologije i kontrole <i>Salmonella enterica</i> u lancu mesa divlje svinje	56
3.2. Radna hipoteza	57
3.3. Zadaci rada	57
4. NALAZI DISERTACIJE PO ZADACIMA	59
4.1. <i>Salmonella</i> u divljih svinja (<i>Sus scrofa</i>): karakterizacija i epidemiologija	60
4.1.1. Kratak sadržaj	60
4.1.2. Uvod	60
4.1.3. Materijal i metode	62
4.1.3.1. Ispitivana lovna gazdinstva i životinje	62
4.1.3.2. Lov i procedure uzorkovanja	63
4.1.3.3. Mikrobiološke procedure	63
4.1.3.4. Karakterizacija izolata <i>Salmonella</i> spp. sojeva	63
4.1.3.5. Analiza rezultata	64
4.1.4. Rezultati	64
4.1.4.1. Prevalencija <i>Salmonella</i> spp. kod divljih svinja	64
4.1.4.2. Uticaj različitih ispitivanih faktora na nalaz <i>Salmonella</i> spp.	66
4.1.4.3. Karakterizacija izolata <i>Salmonella</i> spp.	67
4.1.5. Diskusija	70
4.1.5.1. Prevalencija <i>Salmonella</i> spp. kod divljih svinja	70
4.1.5.2. Uticaj različitih ispitivanih faktora na nalaz <i>Salmonella</i> spp.	72
4.1.5.3. Epidemiologija <i>Salmonella</i> spp.	73
4.1.6. Zaključak	75

4.2. Ocena mikrobiološke kontaminacije mesa trupova divljih svinja.....	77
4.2.1. Kratak sadržaj.....	77
4.2.2. Uvod.....	77
4.2.3. Materijal i metode	79
4.2.3.1. Životinje, procedure lova i obrade trupova	79
4.2.3.2. Procedure uzorkovanja	80
4.2.3.3. Mikrobiološke analize	80
4.2.3.3.1. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija i broja Enterobacteriaceae	81
4.2.3.3.2. Utvrđivanje Salmonella spp.	81
4.2.3.4. Analiza rezultata.....	81
4.2.4. Rezultati i diskusija	81
4.2.4.1. Mikrobiološka kontaminacija kože i mesa trupova divlje svinje	81
4.2.4.2. Uticaj anatomske lokacije ustrelne rane na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupa.....	85
4.2.4.3. Uticaj prakse obrade na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupa	86
4.2.4.4. Usklađenost rezultata testiranja mesa trupova divljih svinja sa kriterijumima procesne higijene uspostavljenim za trupove domaćih svinja.....	90
4.2.5. Zaključak	91
5. UKUPNA DISKUSIJA	92
5.1. Prisustvo, karakterizacija i epidemiologija <i>Salmonella enterica</i> u divljih svinja..	94
5.2. Mikrobiološki status mesa trupova divljih svinja	97
5.3. Kontrolne mere za <i>Salmonella enterica</i> u lancu mesa divlje svinje	99
5.4. Značaj rezultata i potreba za daljim istraživanjima.....	100
6. UKUPAN ZAKLJUČAK.....	102
7. SPISAK LITERATURE	106

Lista tabela

Tabela 2.1.1. Stopa prijavljenih i potvrđenih slučajeva zoonoza ljudi u EU (2008-2014)	8
Tabela 2.1.2. Predloženi mikrobiološki limiti za trupove divljači (log cfu/g)	11
Tabela 2.1.3. Mikrobiološke vrednosti mesa divljači u prometu (Nemačka i Austrija)	12
Tabela 2.1.4. Vreme od ubijanja do evisceracije krupne divljači (% trupova)	14
Tabela 2.2.1. Distribucija prijavljenih i potvrđenih slučajeva salmoneloze ljudi (20 najčešćih serotipova) u EU / EEA, 2012-2014	25
Tabela 2.2.2. Broj hospitalizovanih lica i smrtnih slučajeva prouzrokovanih zoonozama u odnosu na broj potvrđenih slučajeva oboljenja ljudi u EU, u 2014. godini	26
Tabela 2.2.3. Broj potvrđenih epidemija alimentarnih oboljenja poreklom od hrane i broj slučajeva kod ljudi po uzročniku u toku 2014. godine, u EU	27
Tabela 2.2.4. <i>Salmonella</i> spp. serotipovi izolovani iz divljih svinja u evropskim zemljama, Australiji i Japanu, 2000–2012	30
Tabela 2.2.5. Prevalencija <i>Salmonella</i> spp. kod divljih životinja u različitim evropskim zemljama, Australiji i Japanu, 2000–2012	31
Tabela 2.2.6. Prevalencija <i>Salmonella</i> spp. na trupovima i mesu divljih svinja iz raznih evropskih zemalja	33
Tabela 2.3.1. Deset najučestalijih <i>Salmonella</i> spp. serotipova u životinjskim populacijama i hrani/stočnoj hrani	39
Tabela 2.3.2. Kriterijum bezbednosti hrane	48
Tabela 2.3.3. Kriterijum higijene u procesu proizvodnje za meso i proizvode od mesa	49
Tabela 4.1.1. Prevalencija <i>Salmonella</i> spp. po pojedinim lovnim gazdinstvima (LG) kod jedinki divljih svinja i raspodela pozitivnih uzoraka	65
Tabela 4.1.2. <i>Salmonella</i> spp. serotipovi poreklom iz uzoraka divljih svinja	66
Tabela 4.2.1. Mikrobiološki status kože i mesa trupova sveže odstreljenih divljih svinja, u osam različitih lovnih gazdinstava	84
Tabela 4.2.2. Uticaj mesta ustrela na mikrobiološki status mesa trupova odstreljenih divljih svinja uzorkovanih u lovištima gde je znatan broj jedinki odstreljen nestručno (pogođena regija abdomena)	85
Tabela 4.2.3. Uticaj različitih ispitivanih praksi obrade trupova na mikrobiološki status mesa trupova odstreljenih divljih svinja	89
Tabela 4.2.4. Usklađenost ukupnog broja bakterija i broja <i>Enterobacteriaceae</i> utvrđenih na mesu trupova divljih svinja (n=210) poređenjem sa kriterijumima procesne higijene za meso trupova domaćih svinja po Regulativi (EC) No. 1441/2007	91

Lista grafikona

Grafikon 1. Dijagram lanca mesa divljači od odstrela do tranžiranja mesa, austrijski model	16
Grafikon 2. Dijagram toka horizontalne metode za otkrivanje <i>Salmonella</i> spp.	19
Grafikon 3. Trend prijavljenih i potvrđenih slučajeva salmoneloze ljudi u EU, 2008-2014	26
Grafikon 4. Mogući putevi prenosa <i>Salmonella</i> spp. ka ljudima u kojim divljač može biti uključena	35

Lista slika

Slika 1. Moguća mesta za uzimanje uzoraka sa trupova svinja	53
Slika 2. PFGE makro-restrikcioni profil <i>Salmonella</i> spp. dobijen sa <i>SpeI</i> enzimom i Dendrogram dobijen Wardovom metodom povezivanja koeficijenata korelacije između različitih PFGE <i>SpeI</i> makrorestrikcionih profila	68
Slika 3. PFGE makro-restrikcioni profil <i>Salmonella</i> spp. dobijen sa <i>XbaI</i> enzimom i Dendrogram dobijen Wardovom metodom povezivanja koeficijenata korelacije između različitih PFGE <i>XbaI</i> makrorestrikcionih profila	69

Lista skracenica

ACC	Aerobic Colony Count
ALOP	Appropriate Level of Protection
API	Analytical Profile Index
ASAP	Aes Laboratoire Salmonella Agar Plate
BIOHAZ	Panel on Biological Hazards
CAC	Codex Alimentarius Commission
CCP	Critical Control Point
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Colony Forming Unit
DFD	Dark, Firm and Dry
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBC	<i>Enterobacteriaceae</i> Count
EC	European Commission
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EEC	European Economic Community
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EU	European Union
FSC	Food Safety Criterion
FSO	Food Safety Objective
FSP	Food Safety Policy
GHE	Game Handling Establishment
GHP	Good Hygienic Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
HEV	Hepatitis E Virus
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IMS	Immuno-Magnetic Separation
ISO	International Organization for Standardization
log	Logaritam
LPS	Lipopolysaccharide

MC	Microbiological Criterion
MDR	Multi Drug Rezistent
MH	Müeller Hinton
MKTT	Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis
MRD	Maximum Recovery Diluent
OBIS	Oxoid Biochemical Identification System
OIE	Office International Des Epizooties
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PHC	Process Hygiene Criterion
PO	Performance Objective
PP	Plasmid Profile
RTE	Ready To Eat
SCVPH	Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health
SLST	Single Locus Sequence Typing
SMID	Salmonella Detection and Identification agar
SS	Salmonella shigella agar
TSI	Triple Sugar Iron
UV	Ultraviolet
VIP	Visual Immunoprecipitate
VTEC	Verotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate

1. UVOD

Meso divljači je verovatno prvobitni izvor proteina životinjskog porekla u ishrani ljudi. Danas ono u maloj meri doprinosi ukupnom snabdevanju ljudi proteinima u većini regiona Evrope, u odnosu na meso ostalih vrsta životinja, ali takođe i sve više dobija na značaju poslednjih godina jer se smatra „zdravom hranom”. Sa aspekta bezbednosti za ljude, proizvodi od mesa divlje svinje u Srbiji se često ne podvrgavaju ikakvoj termičkoj obradi, već se samo hladno dime i suše (tradicionalni suvomesnati proizvodi i suve fermentisane kobasice). Stoga je neophodno korišćenje sirovog mesa dobrog mikrobiološkog kvaliteta u cilju zaštite javnog zdravlja. S obzirom na nizak udeo u potrošnji, sveukupni rizik od alimentarnih bolesti povezanim sa mesom divljači bi se mogao smatrati niskim u ukupnoj populaciji, ali može biti i veoma visok na nivou grupa potrošača koje ga češće konzumiraju (uglavnom porodice i prijatelji lovaca).

Divlje svinje se u Srbiji tradicionalno love u otvorenim ili u velikim ograđenim lovištima. Mikrobiološki kvalitet mesa divlje svinje može da zavisi od više faktora, naročito zbog specifične prirode lova i obrade divljači. Proizvodnja i prerada mesa divljači se značajno razlikuje od klasične proizvodnje mesa domaćih životinja i predstavlja izazov sam po sebi. U rukovanju i obradi trupova divljači nakon odstrela se uglavnom koriste tradicionalne metode koje često nisu na visokom higijenskom nivou. Neki od faktora koji mogu značajno da utiču na mikrobiološki kvalitet mesa divljači su i lokacija ustrelne rane i nivo primenjene higijenske prakse prilikom rukovanja trupovima (od momenta prikupljanja odstreljenih životinja do hlađenja). Međutim, istraživanja o uticaju različitih tehnika rukovanja i obrade divljači na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupova generalno nedostaju u literaturi. Takođe, podataka o mikrobiološkom statusu mesa trupova sveže odstreljenih divljih svinja u dostupnoj literaturi ima veoma malo, kako u pogledu indikatora opšte kontaminacije (ukupan broj bakterija) i fekalne kontaminacije (broj *Enterobacteriaceae*), tako i u pogledu prisustva patogenih bakterija. Ovo se takođe odnosi i na prisustvo *Salmonella* spp. u divljih svinja, koja se smatra relevantnim biološkim hazardom za meso lovne divljači i koja je ocenjena kao visoki prioritet u osiguranju bezbednosti mesa divlje svinje od strane Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA). *Salmonella* spp. je dobro prilagođena na razne domaćine u prirodi, a često se veći značaj daje divljim životinjama kao rezervoarima *Salmonella* za infekcije domaćih životinja, nego njenoj ulozi kao alimentarnog hazarda iz mesa divljači. Međutim, *Salmonella* spp. je prisutna u lancu mesa divlje svinje širom Evrope i to čak i do 22% (prisustvo u fecesu). Na njeno prisustvo u divljih svinja često utiče blizina naseljenih mesta i dostupnost otpadaka poreklom od domaćih životinja koji služe kao glavni izvor *Salmonella* za divlje svinje. U

dostupnoj literaturi ne postoje objavljene studije koje analiziraju puteve kretanja *Salmonella* u različitim tipovima lovišta (ograđena ili otvorena lovišta). Takođe nedostaju informacije o praćenju izvora i puteva infekcija sa *Salmonella* i uticaju procesa lova na prisustvo ovog patogena na mesu trupova divljih svinja.

Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi stepen prisustva i raširenosti *Salmonella enterica* u divljih svinja, u većem broju lovišta u Srbiji, sa ciljem ocene izloženosti potrošača ovom značajnom alimentarnom patogenu putem mesa divlje svinje, kao i uticaj procesa lova i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status. Dobijanje ovih podataka je potrebno da se obezbedi naučna osnova za dalja istraživanja i razvoj kontrolnih mera za smanjenje ili eliminisanje mikrobioloških patogena u lancu mesa divlje svinje, a sve u cilju unapređenja bezbednosti ove vrste mesa za potrošače.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Karakteristike lanca mesa lovne divljači i rizici za javno zdravlje

Postoje bitne razlike lanca mesa divljači u odnosu na lanac mesa farmskih životinja koje proističu iz osobnosti same „proizvodnje“ divljači i posledičnih načina rukovanja i obrade mesa. Najčešće razlike ogledaju se u načinu „gajenja divljači“, premortalnom pregledu, načinu odstrela, načinu evisceracije (uslovima i pregledu organa), transportu i skladištenju trupova, skidanju kože i postmortalnoj inspekciji. Meso divljači može da potiče od divljači koja je gajena u intenzivnim uslovima i divljači poreklom iz otvorenih lovišta (Paulsen, 2011). Intenzivno gajenje divljih svinja radi lova uključuje upravljanje staništem koje olakšava očuvanje prirodnog ekosistema, kao i dopunsko hranjenje i intenzivniju kontrolu predatora.

Putevi plasmana mesa divljači do potrošača su različiti i mogu da se podvedu pod tri glavna (Paulsen, 2011): (i) direktno od lovca do potrošača (porodica, prijatelji); (ii) distribucijom preko lokalnih trgovaca; i (iii) preko specijalizovanih prerađivača i prodajnih lanaca. Uobičajeno je da direktna distribucija od lovca do potrošača obuhvata mali broj ljudi, dok distribucija preko specijalizovanih prerađivača uključuje veliki broj potrošača mesa, slično kao i u slučaju dobijanja i distribucije mesa putem klanične industrije.

Različiti hazardi za bezbednost mesa divlje svinje mogu da uđu u lanac mesa u različitim fazama. Glavni faktori koji utiču na nivo mikrobioloških hazarda i odnosnih rizika u mesu divljači su povezani sa: (i) načinom i mestom „uzgoja“ lovne divljači (slobodna lovišta, ograđena lovišta, farmsko držanje, planinski ili ravničarski tereni); (ii) blizinom infrastrukture (put, prevozna sredstva, dostupnost sveže vode i električne energije) i objekata za primarni prihvata i obradu divljači uključujući hlađenje; (iii) pravilnim odabirom municije, kao i veštinom lovca da pravilno odstrelji životinju; i (iv) pravilnim i higijenskim tehnikama dalje obrade trupova, a naročito evisceracije i blagovremenim i adekvatnim hlađenjem trupova (Gill, 2007; Paulsen, 2011).

U lovstvu, tehnike i rukovanje sa divljači se u velikoj meri oslanjaju na tradicionalne navike, koje često nisu u saglasnosti sa novim naučnim saznanjima i shvatanjima u pogledu mikrobioloških rizika. Ukupna administrativna regulativa postupaka sa divljači je u razvoju, te je posledično i neusaglašena, kako u Republici Srbiji tako i u zemljama Evropske unije (EU), gde se svaka država oslanja na sopstvene tradicije lova (Paulsen, 2011; Paulsen *i sar.*,

2012). Evropska komisija je donošenjem regulativa (EC) 853/2004 i (EC) 854/2004 (EC, 2004a,b), dala okvire i smernice za razvoj odnosnih regulativa zemalja članica EU. Početak usaglašavanja procedura između zemalja EU došao je sa donošenjem direktiva o lovu (EEC) 92/45 (EEC, 1992a), u kojima se ističe neophodnost hlađenja mesa trupova i obaveza pregleda mesa divljih svinja na prisustvo larvi *Trichinella* spp.

Po regulativi Republike Srbije, divlja svinja spada u grupu divljači koja je zaštićena lovostajem. Lov na divlje svinje (*Sus scrofa*) je dozvoljen u periodima: za veprove 15.4.-28.2., krmače 1.7.-15.1., i nazimad (do 60kg) 15.4.-28.2. (RS, 9/12 i 75/16).

Na teritoriji R. Srbije postoji ukupno 6.844.000 hektara (ha) lovišta, od toga je pod šumom 1.759.000 ha, a na prostoru AP Vojvodine je 2.152.635 ha lovišta. Površina ograđenih/zatvorenih lovišta iznosi 82.612 ha. Populacija divljih svinja na teritoriji R. Srbije prema poslednjim dostupnim podacima broji oko 23.000 jedinki, a godišnje se odstrelji oko četvrtine od tog broja, odnosno 6.450 jedinki (Statistički godišnjak Republike Srbije, 2015). Registrovano je 82.000 lovaca koji su organizovani u 227 lovačkih udruženja (Lovački savez Srbije, 2015).

2.1.1. Potrošnja mesa divljači

Istorijski gledano, meso divljih životinja predstavlja verovatni prvobitni izvor animalnih proteina u ljudskoj ishrani (Ahl *i sar.*, 2002). Meso poreklom od divljih životinja je danas značajno manje zastupljeno u ishrani stanovništva u odnosu na meso poreklom od domaćih životinja. Opšte je poznato da lovci i njihove porodice konzumiraju u proseku više mesa divljači u odnosu na ostale potrošače, pa je tako u severnoj Italiji u porodicama lovaca potrošnja oko 4 kg po osobi godišnje (Ramanzin *i sar.*, 2009), dok je u Austriji, Francuskoj, Nemačkoj i Švajcarskoj 0,6–1 kg ukupno po glavi stanovnika (Atanassova *i sar.*, 2008; Membré *i sar.*, 2011). Ovaj nivo potrošnje je u visini oko 1% ukupne proizvodnje mesa; na primer, u Austriji se proizvede oko 8.900 tona mesa divljači (težina mesa trupova) (Winkelmayer i Paulsen, 2008) u odnosu na proizvodnju od 740.116 tona mesa domaćih goveda i svinja (Statistik Austria, 2010). Veća potrošnja mesa divljači je zabeležena u Norveškoj gde se konzumira oko 3,3 kg jelenskog mesa po glavi stanovnika (Lillehaug *i sar.*, 2005). Prvenstveno zbog malih proizvedenih količina, meso divljači je teško dostupno širokoj populaciji, pa se više smatra delikatesom nego osnovnom namirnicom. Od krupne lovne divljači, u Srbiji se najviše love, a samim tim i konzumiraju divlje svinje, a zatim srneća i jelenska divljač (Statistički godišnjak Republike Srbije, 2015).

2.1.2. Rizici za javno zdravlje iz mesa divljači

Alimentarna oboljenja ljudi se definišu kao „*bolesti, po prirodi infekcije ili intoksikacije, uzrokovane agensom unetim u organizam putem konzumiranja hrane*“ (WHO, 2015). Najčešći uzročnici alimentarnih bolesti koje nastaju posle konzumiranja mesa divljih svinja su patogene bakterije koje na meso mogu dospeti kontaminacijom tokom odstrela i evisceracije, u preradi, prometu ili tokom pripreme mesa.

Direktna isporuka mesa od lovca ka potrošaču je najčešći oblik distribucije mesa divljih svinja u Nemačkoj, a ukoliko se isporučuje direktno ili u krugu do 100 km posredstvom lokalnih trgovaca uglavnom ne podleže ni zvaničnoj veterinarskoj inspekciji. Najveći nivo odgovornosti leži na lovcu koji treba da primeni svoja znanja i prepozna zoonotska oboljenja i primeni sve mere dobre prakse tokom odstrela životinja i daljeg rukovanja sa trupom (Bandick i Hensel, 2011).

Saglasno sa odredbama Regulative EU No. 853/2004 (EC, 2004a), lica koja love divljač sa ciljem stavljanja u promet mesa za ljudsku ishranu, treba da poseduju potrebna znanja o patologiji divljih životinja, uzgoju i rukovanju sa divljim životinjama kao i postupanju posle odstrela ovih životinja. Naročito se ističe potreba o posedovanju znanja o anatomiji, fiziologiji, abnormalnom ponašanju, kao i patološkim promenama kod divljih životinja koje mogu da imaju posledice na ljudsko zdravlje posle konzumacije njihovog mesa. Pored toga neophodna su i osnovna znanja o higijenskim procedurama tokom rukovanja i obrade mesa trupova divljači, kao i higijenskim uslovima za stavljanje mesa i prerađevina od mesa divljači u promet. U tom smislu, lovna gazdinstva kao primarni proizvođači i registrovani objekti za obradu i rasecanje trupova divljači koji meso stavljaju u promet, imaju odnosne odgovornosti u osiguranju bezbednosti i u sistemu praćenja mesa divljači (EC, 2004a).

Meso može biti odlična sredina za razmnožavanje patogena, primarno bakterija, što povećava verovatnoću inficiranja ljudi i razvoja alimentarnih bolesti (CAC, 2005). Više zoonotskih agenasa poreklom od divljači mogu da dovedu do nastanka alimentarnih oboljenja ljudi. U slučaju divljih svinja, najvažniji mogu da se podele na tri grupe zoonotskih agenasa (Magnino *i sar.*, 2011; Bandick i Hensel, 2011):

1. *Salmonella* spp., termofilni *Campylobacter* spp., verocitotoksične *Escherichia coli* (VTEC), patogene *Yersinia enterocolitica* i Hepatitis E virus (zoonotski agensi poreklom

prevashodno iz digestivnog trakta koji kontaminiraju trupove tokom ustreljavanja životinje u abdomen i/ili tokom nepravilno izvedene evisceracije);

2. *Mycobacterium* spp., *Brucella* spp. i *Francisella tularensis* (bakterijski agensi koji se nalaze u živoj životinji, sa ili bez ispoljavanja kliničkih simptoma, a prenose se na ljude tokom rukovanja sa trupovima ili svežim mesom);
3. *Toxoplasma gondii* i *Trichinella* spp. (paraziti koji se prenose putem mesa divlje svinje, za vreme života su prisutni u mišićnom tkivu).

Klinički simptomi većine bakterijskih alimentarnih bolesti ljudi su obično vezani za gastrointestinalne poremećaje, ali nekad mogu biti povezani i sa oštećenjima drugih organa i komplikacijama. Posledice ovih oboljenja mogu biti različite: od blagih, preko ozbiljnih, pa sve do smrtnih ishoda. Slučajevi alimentarnih oboljenja mogu biti pojedinačni, kada oboli samo jedna osoba, a mogu da se jave i u vidu epidemija. Epidemija alimentarnog oboljenja je definisana Direktivom o zoonozama 2003/99 Evropske komisije, kao „*pojava dva ili više slučaja istog oboljenja/infekcije u ljudi, ili situacija kada broj utvrđenih slučajeva prevazilazi broj očekivanih, a slučajevi su međusobno povezani sa istom hranom koja je izvor infekcije*“ (EC, 1999). Ova definicija je primenljiva na sve epidemije alimentarnih bolesti izazvane bilo kojim biološkim agensima (bakterijama, virusima, prionima, parazitima, gljivicama) ili njihovim toksinima.

Među uzročnicima gastroenteritisa ljudi, kampilobakterioza je bila tokom 2014. godine prvo oboljenje po incidenciji u EU sa 71,0 potvrđenih slučajeva na 100.000 stanovnika. Salmoneloza je bila na drugom mestu sa incidencijom od 23,4 potvrđenih slučajeva na 100.000 stanovnika, a sledile su jersinioza sa incidencijom 1,92, oboljenja izazvana sa VTEC sa incidencijom 1,56 i listerioza sa incidencijom od 0,52 potvrđenih slučajeva na 100.000 stanovnika (Tabela 2.1.1) (EFSA/ECDC, 2016).

Tabela 2.1.1. Stopa prijavljenih i potvrđenih slučajeva zoonoza ljudi u EU, u periodu 2008-2014. Izvor: (EFSA/ECDC, 2015; 2014; 2013; 2012; 2011; 2010).

EU		2014		2013	2012	2011	2010	2009	2008
Uzročnik	Br. slučajeva	Potvrđeni slučajevi	Potvrđeni slučajevi / 100.000			Potvrđeni slučajevi			
<i>Campylobacter</i>	237.642	236.851	71,0	217.242	214.268	223.998	215.397	201.711	190.579
<i>Salmonella</i>	90.238	88.715	23,4	85.268	91.034	95.572	101.052	110.190	134.580
<i>Yersinia</i>	6.640	6.625	1,92	6.472	6.339	6.969	6.741	7.578	8.356
VTEC	6.013	5.955	1,56	6.112	5.671	9.487	3.656	3.583	3.162
<i>Listeria</i>	2.174	2.161	0,52	1.771	1.642	1.486	1.643	1.675	1.425
<i>Trichinella</i>	383	319	0,07	256	301	268	223	750	670
<i>Brucella</i>	365	347	0,08	390	328	336	356	404	735
<i>M. bovis</i>	145	145	0,03	134	125	148	168	133	123

Najčešći enteropatogeni uzročnici oboljenja ljudi poreklom od farmskih svinja su *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., enteropatogena *Yersinia* i VTEC (Milnes *i sar.*, 2008; Fosse *i sar.*, 2009). Faktori rizika za pojavljivanje zoonoza kod ljudi, poreklom od divljih životinja su većinom povezani sa: (1) kretanjem (sezonske migracije) ili transportom divljih ili domaćih životinja; (2) prenaseljenosti divljači; (3) ekspanzijom ili unosom vektora ili domaćina patogena; i (4) postojanjem ekstenzivnog načina držanja domaćih životinja (Gortazar *i sar.*, 2006; 2007; Deutz *i sar.*, 2011).

Evropska komisija je 2010. godine uputila zahtev Evropskoj agenciji za bezbednost hrane (EFSA) da putem Naučnog panela o biološkim hazardima (BIOHAZ) dostavi naučno mišljenje o biološkim hazardima za javno zdravlje koji će biti obuhvaćeni pregledom mesa nekoliko životinjskih vrsta, a između ostalog i mesa uzgojenih divljih svinja (EFSA, 2013a). Identifikacija svakog biološkog hazarda je vršena na osnovu dva kriterijuma: (1) postojanje dokaza da se biološki hazard prenosi na ljude putem rukovanja, pripreme i/ili potrošnje mesa uzgojene divljači; i (2) postojanje dokaza da je biološki hazard prisutan u populaciji uzgojene divljači u Evropskoj uniji (EU). Biološki hazardi koji zadovoljavaju ova dva kriterijuma su tada rangirani korišćenjem stabla odlučivanja koje razmatra četiri vrste podataka odnosno poznatih činjenica: (1) incidencije oboljevanja ljudi izazvanih identifikovanim biološkim hazardom; (2) ozbiljnosti bolesti ljudi; (3) dokaza da je meso divlje svinje važan rizični faktor za nastanak date bolesti ljudi; i (4) doprinosa aktuelnih kontrolnih mera (inspekcije mesa) u kontroli datog hazarda. Na osnovu kvalitativne ocene rizika, *Salmonella* spp. i *Toxoplasma gondii* kod uzgojene divlje svinje su među biološkim hazardima rangirani kao visoki prioritet za inspekciju mesa. *Yersinia enterocolitica*, patogena verocitotoksična *Escherichia coli* (VTEC) i *Trichinella* spp. su rangirane kao nizak prioritet kod uzgojenih i slobodnih divljih svinja (u slučaju *Trichinella* spp. jer se trenutno primenjuju mere kontrole za ovaj hazard koje su u vezi sa samom inspekcijom mesa). *Campylobacter* spp. i HEV kod uzgojenih divljih svinja su kategorisani kao „prioritet neutvrđen zbog nedostatka podataka“ (EFSA, 2013a). Međutim, mora se istaći da se ovo naučno mišljenje i kategorizacija odnosnih hazarda odnosi samo za gajene divlje svinje koje su predmet standardne *ante-mortem* inspekcije na farmama ili klanicama. U svakom slučaju, u dostupnoj naučnoj literaturi se *Salmonella* spp. svakako smatra relevantnim biološkim hazardom za meso lovne divljači (Gortazar *i sar.*, 2007).

2.1.3. Mikrobiološka kontaminacija mesa divlje svinje

Mikrobiološki status mesa divlje svinje je od značaja sa aspekta mogućnosti prisustva određenih patogenih bakterija na mesu, kao i njegovog kvara, odnosno održivosti mesa u prometu. U EU legislativi je prihvaćeno da se kao indikator opšte kontaminacije na trupovima životinja crvenog mesa ispituje ukupan broj aerobnih bakterija (ACC), a kao indikator fekalne kontaminacije broj enterobakterija (EBC). S druge strane, nivo generičke *E. coli* se koristi kao indikator fekalne kontaminacije u SAD. Određivanje mikrobiološkog statusa mesa trupova se koristi za verifikaciju higijene procesa proizvodnje mesa (odnosno klanja i obrade trupova) i za kategorizaciju proizvođača mesa na osnovu nivoa rizika koji oni predstavljaju po javno zdravlje. Još uvek ne postoji standardizovan metod uzorkovanja mesa divljači, kao što je to u slučaju domaćih životinja za klanje, u odnosu na tip uzorka, mesta uzorkovanja, faze u lancu proizvodnje gde se vrši uzorkovanje, analitičku metodologiju i interpretaciju rezultata.

2.1.3.1. Mikrobiota trupova divljih svinja

Podaci o mikrobiološkom statusu mesa trupova nakon odstrela i evisceracije su veoma retki u dostupnoj literaturi. U periodu od 2008-2010. godine, Avagnina *i sar.* (2012) su na području severne Italije izvršili analize briseva trupova odstreljene krupne divljači i među njima i 65 divljih svinja i došli do podataka da je nivo ACC iznosio $4,6 \log_{10}$ cfu/cm², a EBC $3,0 \log_{10}$ cfu/cm². U tom istraživanju, sve životinje su bile eviscerirane na terenu, a većina (90,7%) u roku od 60 minuta posle odstrela. Ostatak od 9,3% je bio uzorkovan u periodu od 1-3 h posle odstrela. U drugom istraživanju, Atanassova *i sar.* (2008) su utvrđivali kontaminaciju mesa trupova 127 odstreljenih divljih svinja. Uzorkovanje je vršeno na površini trupa mimo ustrelne rane i utvrđen nivo ACC iznosio je $3,2 \log_{10}$ cfu/cm², a EBC od $2,1 \log_{10}$ cfu/cm², dok je prosečno vreme evisceracije bilo 42 minuta, odnosno ukupno do početka hlađenja 3,1 h.

Kada bi se ovi rezultati za ACC i EBC upoređivali u odnosu na postojeće mikrobiološke kriterijume procesne higijene za meso trupova domaćih svinja, na osnovu regulative (EC) No. 1441/2007 (EC, 2007), za 65 odstreljenih jedinki 32,3% pojedinačnih vrednosti ACC i 49,2% EBC bi spadalo u klasu nezadovoljavajućeg nivoa kontaminacije (Avagnina *i sar.*, 2012), a za 127 odstreljenih jedinki 2,4% za ACC bi spadalo u klasu nezadovoljavajućeg nivoa kontaminacije (Atanassova *i sar.*, 2008).

U tabeli 2.1.2 su prikazane preporuke za mikrobiološke limite za meso trupova divljih životinja, iz različitih literaturnih izvora. Značajno je da su predstavljene vrednosti više za oko maksimalno 1 logaritam preko dozvoljenih za trupove poreklom od domaćih životinja iz klanica (Paulsen, 2011).

Tabela 2.1.2. Predloženi mikrobiološki limiti za trupove divljači (log cfu/g) (Paulsen, 2011).

ACC (log cfu/g)	EBC (log cfu/g)	<i>E. coli</i> (log cfu/g)	Reference
6,0	-	2,0	<i>Deutz i sar., 2003</i> (nedestruktivno uzorkovanje)
6,0	-	-	<i>Paulsen i sar., 2003</i> (destruktivno uzorkovanje)
5,0	3,0	2,0	<i>Lagrange i Schmidt, 2005</i> (destruktivno uzorkovanje)

U radu Atanassova i sar. (2008) jedan od ispitivanih aspekata je bio i uticaj stručnosti lovca i ispravnog pogotka na nivo kontaminacije trupova, pa je kod 27 odstreljenih divljih svinja (21,3%) od 127 ustanovljeno da nije izvršen stručan pogodak (to jest, pogodak je bio u abdomen, uzrokujući smrt u agoniji). Kod ovih životinja ACC je bio viši od proseka i iznosio je 3,9 log₁₀ cfu/cm², a EBC 2,4 log₁₀ cfu/cm². Kod životinja gde je odstrel izvršen stručno (jedan pogodak u grudi ili glavu, trenutna smrt) vrednosti ACC su 3 log₁₀ cfu/cm², a EBC 1,8 log₁₀ cfu/cm².

U drugom istraživanju, nakon uzorkovanja brisa trupova divljači 12-24 h posle smrti, Deutz i saradnici (2006) su utvrdili srednji i maksimalni nivo ACC od 4,6 log₁₀ cfu/cm² i 5,6 log₁₀ cfu/cm² u slučaju grudne ustrelne rane, odnosno 5 log₁₀ cfu/cm² i 6,5 log₁₀ cfu/cm² u slučaju kada je ulazna rana bila u regiji abdomena. Takođe, Paulsen i Winkelmayr (2004) i Lagrange i Schmidt (2005) su utvrdili više vrednosti za ACC, EBC i *E. coli* kod odstreljenih jedinki sa abdominalnim ustrelnim ranama, u odnosu na ostale slučajeve.

2.1.3.2. Mikrobiota mesa divljih svinja u prometu

U pogledu mikrobiološkog statusa mesa divljih svinja u prometu postoji više dostupnih podataka. Veći broj istraživanja je pokazao da uzorci mesa u prometu poreklom od lovnih životinja imaju viši nivo mikroorganizama nego meso poreklom od farmskih životinja (Paulsen, 2011). Broj bakterija na površinama mesa u nivou od 7 log nije neuobičajen, ali i uzorci mesa od farmskih životinja mogu imati sličan broj bakterija (Paulsen, 2011). U dubini

mesa divljih životinja, ukupan broj aerobnih bakterija (ACC) je prijavljivan veoma različito, i to <2 do >5 log₁₀ cfu/g (Paulsen, 2011).

U zamrznutim uzorcima mesa različitih vrsta divljači poreklom iz nemačkih lovišta, srednja vrednost ACC se kretala u intervalu od 4,0-6,4 log₁₀ cfu/g, *Enterobacteriaceae* u intervalu od 2-6 log₁₀ cfu/g i *E. coli* u intervalu od 1,0-3,1 log₁₀ cfu/g. Kod 224 uzorka zamrznutog mesa poreklom od divljih svinja vrednost ACC bila je 6 (2,6-8,6) log₁₀ cfu/g, *Enterobacteriaceae* 3,5 (1,0-5,8) log₁₀ cfu/g i *E. coli* 1 (1,0-4,9) log₁₀ cfu/g (Türck, 2008; Wacheck, 2008) (Tabela 2.1.3).

Tabela 2.1.3. Mikrobiološke vrednosti mesa divljači u prometu (Nemačka i Austrija).

Uzorak	Stanje	N	Poreklo	ACC (log ₁₀ cfu/g)	EBC (log ₁₀ cfu/g)	<i>E. coli</i> (log ₁₀ cfu/g)	Reference
Zec	zamrznuto	79	GHE	4,0 (2,2-6,2)	2,0 (1,0-3,8)	-	Türck, 2008
Zec	zamrznuto	85	GHE	4,0 (3,4-8,3)	2,7 (1,0-6,0)	-	Türck, 2008
Jelen	zamrznuto	44	GHE	5,7 (3,5-7,3)	3,6 (1,0-6,3)	2,3 (1,0-3,8)	Türck, 2008
Jelen	zamrznuto	49	GHE	4,3 (1,1-6,6)	2,2 (1,0-4,2)	1,7 (1,0-3,7)	Türck, 2008
D. svinje	zamrznuto	224	GHE	6,0 (2,6-8,6)	3,5 (1,0-5,8)	1,0 (1,0-4,9)	Türck, 2008
Različito	zamrznuto	63	GHE	6,4 (4,3-7,3)	6,0 (4,3-7,0)	3,1 (2,0-4,4)	Wacheck, 2008
Različito	ohlađeno, vakum	30	LSH-sc	4,4 (2,0-7,7)	2,3 (1,0-5,7)	1,0 (1,0-3,5)	Fettinger, 2010
Različito	ohlađeno	43	LSH- training	5,1 (3,0-7,7)	2,7 (2,0-5,7)	1,0 (1,0-3,0)	Fettinger, 2010

GHE: poreklom od prerađivača/objekat za obradu mesa u lovištu lovište; LSH-sc: poreklom od lovaca, namenjeno direktno potrošaču; LSH-training: poreklom od lovaca koji su završili obuku, namenjeno direktno potrošaču.

2.1.4. Odstrel i faze u obradi trupova divljači

Faze u lancu mesa divljači od momenta odstrela životinja do finalnog ohlađenog trupa se razlikuju od procesa klanja i obrade domaćih životinja i prikazane su na grafikonu 1, zajedno sa odnosnim kontrolnim merama u svakoj fazi.

2.1.4.1. Odstrel divljači

Ispravan pogodak životinje i trenutna smrt je bitna za dobrobit životinje (Winkelmayer, 2009) ali i omogućava lakše sakupljanje odstreljenih životinja, te ubrzava i olakšava evisceraciju (Winkelmayer *i sar.*, 2005). Zbog vrednosti krupne divljači kao trofeja, ukoliko se isključe vrat i glava, preporučuje se gađanje u trougao koji čine: (1) kaudalna ivica ramena (2) humerus, i (3) linija od lakta do kaudoventralne ivice lopatice. Ova ciljana lokacija

je postavljena više kranijalno od tradicionalne lokacije, tako da ovakva ulazna rana izaziva razaranje kvalitetnog mišićnog tkiva, ali su rizik od abdominalnih lezija i posledična mikrobiološka kontaminacija minimizirani (Winkelmayer *i sar.*, 2005; Paulsen *i sar.*, 2003).

Divlje svinje se prvenstveno love lovačkim puškama sa olučenim cevima (kuglare). Najmanji propisani kalibar je 7x57 mm sa zrnom najmanje težine od 9 g. Pored oružja sa olučenim cevima, lov divljih svinja je dozvoljen i oružjem sa glatkim cevima, uz preporuku da se prevashodno iz bezbedonosnih razloga koriste pojedinačna zrna (brenek). Optimalni kalibri za lov divlje svinje sa karabinom su: 8x64S, 8x57IS, 30-06, 308Njin, 280Rem, sa kuglarom prelamačom: 8x65SR, 8x57IRS, 30R Blaster, 7x75RSE, a preporučena težina zrna je 11 g (Lovački savez Srbije, 2004).

Samo usmrćivanje farmskih životinja u industrijskim klanicama je regulisano zakonskim normama, sa ciljem osiguranja dobrobiti životinja za klanje i efikasnog prekidanja krvnih sudova da se omogući što brže iskrvarenje i spreči prodor bakterija u krvotok (Lawrie i Ledward, 2006). Međutim, u slučaju lova krupne divljači, ulazna rana u prednjem delu grudi izazvaće masivno prekidanje vitalnih krvnih sudova, ali i mogući unos bakterija u krvotok.

Način ubijanja krupne divljači i lokacija ulazne rane ima značajan uticaj na broj mikroorganizama u dubokom mišićnom tkivu (Paulsen, 2011; Deutz *i sar.*, 2000). Abdominalna ulazna rana je direktno povezana sa vidljivom i mikrobiološkom kontaminacijom trbušne duplje i izloženih mišića (Deutz *i sar.*, 2000; Paulsen *i sar.*, 2003). Način lova koji se zasniva na konstantnom kretanju lovca („pirš“) kroz lovište u odnosu na lovca koji je stacionaran (lov sa „čeke“) ima za posledicu veću frekvenciju abdominalnih rana i duži period do evisceracije (Deutz *i sar.*, 2006), što je povezano sa višim rizikom od mikrobiološke kontaminacije mesa trupova.

2.1.4.2. Evisceracija divljači

Kada su u pitanju odstreljena grla krupne divljači, preporuka je da se evisceracija izvrši bez nepotrebnog odlaganja; na primer, Winkelmayer i saradnici (2008) preporučuju maksimalan period od 3 h od momenta odstrela. Poboljšanjem uslova lova, poboljšanjem transportnih sredstava i obavezom postojanja prostorija za evisceraciju i rashladnih uređaja, realno vreme evisceracije se skratilo iz perioda 70-tih godina kada je iznosilo oko 3 h (Riemer i Reuter, 1979), na manje od 1 h u slučaju lova u pokretu (Deutz *i sar.*, 2006), pa čak i na 30 min. u slučaju lova sa čeke (Brodowski i Beutling, 1998; Deutz *i sar.*, 2000) (Tabela 2.1.4).

Tabela 2.1.4. Vreme od ubijanja do evisceracije krupne divljači (% trupova) (Paulsen, 2011).

<1 h	1-3 h	>3 h	n	Reference
17,5	75,7	5,8	103	Riemer i Reuter, 1979
82,9	15,8	1,3	234	Brodowski i Beutling, 1998
96,5	2,0	1,5	195	Deutz <i>i sar.</i> , 2000 (lov sa čeke)
0,0	72,9	27,1	37	Deutz <i>i sar.</i> , 2006 (lov u pokretu)

U praksi postoji nekoliko načina evisceracije krupne divljači, počev od toga da životinja bude u ležećem ili u visećem položaju, do toga da li se otvaraju i grudna i trbušna duplja zajedno ili posebno, ili samo trbušna duplja. Svaka od tehnika ima mana sa aspekta kontaminacije trupova, kako poreklom sa podloge (zemlja, beton...), tako i sa kože i iz digestivnog trakta, ali i prednosti manje upotrebe fizičke snage u slučaju visećeg položaja. Poseban momenat u odabiru tehnike je povezan sa tradicijom i podnebljem u kome se lov obavlja. Ustrelna rana u predelu abdomena nalaže različit pristup evisceraciji, pa su opisani i načini uklanjanja organa trbušne duplje i njenog pranja bez otvaranja grudne duplje i uklanjanja dijafragme i peritoneuma (Paulsen, 2011). Uopšteno, smatra se da evisceracija u visećem položaju ima prednosti u odnosu na ležeći položaj, jer se sprečava kontakt unutrašnjih površina trupa sa zemljom ili fecesom. Do danas, nije bilo sistematske studije koja bi sagledala i dala preporuku koja tehnika dovodi do minimalne kontaminacije mesa.

Shodno ovome, obimniji lovovi, kao na primer, revijalni lovovi, nose sa sobom i veći rizik od više mikrobiološke kontaminacije mesa trupova sa indikatorima opšte i fekalne kontaminacije ali i sa patogenim bakterijama. Veći broj odstreljene divljači, veliki broj neiskusnih lovaca u pokretu, pritisak na logistiku, kao i ograničeni kapaciteti mesta za dovoz divljači su otežavajući faktori u odnosu na situaciju u kojoj su 2-3 lovca sa manjim ulovom i gde je viša verovatnoća da će dobra higijenska praksa biti ispoštovana. Lovci u pokretu svakako su povezani sa većom učestalošću povreda abdomena lovne divljači i dužim vremenom evisceracije divljači u odnosu na lovce na čekama, jer je vreme sakupljanja i dovoženja divljači na zbirna mesta svakako produženo (Deutz *i sar.*, 2006).

2.1.4.3. Skidanje kože divljači

U literaturi postoji vrlo malo podataka o skidanju kože divljih svinja. Paulsen (2011) preporučuje da se skidanje kože vrši posle evisceracije i određenog perioda hlađenja trupova u

koži i njihovog transportovanja u pogon za dalju obradu i rasecanje. Sve procedure skidanja kože trebaju biti u skladu sa pravilima dobre higijenske prakse (GHP) i slične su kao i kod drugih životinja kojima se skida koža (goveda i ovce). Preporučuje se česta promena noža, pranje ruku i opreme i „sterilizacija“ u vrućoj vodi. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o uticaju skidanja kože divljih svinja na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupova.

2.1.4.4. Ostale faze obrade trupova divljači

Nakon skidanja kože, trupovi divljih svinja se dalje hlade i drže u „hladnom lancu“ tokom daljih faza u lancu mesa (rasecanja, dobijanja proizvoda od mesa, prodaje i pripreme u restoranima ili domaćinstvima). EU regulativa predviđa da u procesu hlađenja mesa krupne divljači mora da se postigne minimalna temperatura u dubini mesa od +7°C u periodu čuvanja u frižiderima ili rashladnim komorama (EC, 2004a). Da bi se broj mikroorganizama držao pod kontrolom, dobra praksa predviđa da se temperatura u komori za hlađenje održava na nivou od oko 0°C, što je i potvrđeno u istraživanjima na mesu trupova i vakuum pakovanom mesu u komadima (Paulsen *i sar.*, 2003; El-Ghareeb *i sar.*, 2009; Fettinger *i sar.*, 2010). Nije u potpunosti precizirano koji je neophodan interval od odstrela životinja do početka hlađenja trupova, ali preporuke skorijih studija su da je izvodljivo da se u roku od 12 h započne sa hlađenjem trupova (Winkelmayer *i sar.*, 2008; Brodowski i Beutling, 1998; Deutz *i sar.*, 2000). Faza predhlađenja i ceđenja, koja se ponekad primenjuje u nekim manjim klanicama, nije izvodljiva u procesu hlađenja trupova divljači. Glavni problem je nedostatak opreme, tj. snažnih ventilatora koji bi smanjili nivo vlage u prostoriji (Paulsen i Winkelmayer, 2004).

Grafikon 1. Dijagram lanca mesa divljači od odstrela do tranžiranja mesa, sa kontrolnim merama - austrijski model (Paulsen, 2011).

Lanac mesa	Kontrolne mere
<i>Pregled pre odstrela</i>	Trijaža bolesnih životinja (I);
↓	
<i>Odstrel</i>	Lokalizacija ustrelne rane, distanca odstrela (GHP);
↓	
<i>Evisceracija i inspekcija organa i trupa</i>	Evisceracija u roku 3 h <i>post-mortem</i> , minimizovanje fekalne kontaminacije tokom otvaranja trupa i evisceracije; Trimovanje ili pranje kontaminiranih mesta (GHP); uklanjanje velikih defekata sa trupa (I);
↓	
<i>Transport do hladnjače</i>	Profil vreme-temperatura, smanjenje kontaminacije i izloženosti površina mesa (GHP);
↓	
<i>Hladnjača</i>	Postizanje maks. +7°C u dubini buta u roku 12 -24 h (GHP);
↓	
<i>Transport do pogona za preradu</i>	Vreme-temperatura profil, smanjenje kontaminacije i izloženosti površina mesa; održavanje hladnog lanca (GHP);
↓	
<i>Veterinarski pregled</i>	Uklanjanje velikih defekata sa trupa (I);
↓	
<i>Dranje i dalja prerada</i>	Sprečavanje unakrsne kontaminacije, održavanje hladnog lanca (GHP).

I - inspekcija; GHP - Dobra higijenska praksa (Good Hygiene Practice)

2.2. *Salmonella enterica* kao alimentarni hazard

2.2.1. Karakteristike *Salmonella enterica*

Salmonele pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* i to su Gram-negativne bakterije veličine 2 do 4 µm x 0,5µm koje ne stvaraju spore i ne poseduju kapsulu. Sve su pokretne, sa izuzetkom *S. gallinarum* i *S. pullorum*, zahvaljujući peritrihnim flagelama. Salmonele su fakultativno anaerobni mikroorganizmi, rastu na uobičajenim hranljivim podlogama uz karakterističan rast u vidu velikih, gustih sivo-belih kolonija oblika pravilne sfere. Razlažu glukozu, ali ne i laktozu, a redukuju nitrate u nitrite. Uobičajne podloge za kultivisanje salmonela su MacConkey, XLD, Rambach i Brillijant-zeleni agar, a bujoni za umnožavanje Rappaport-Vassiliadis bujon (RV) ili tetracionitratni bujon. Prema fenotipskim osobinama, rod *Salmonella* je prema novijoj nomenklaturi (Grimont i Veill, 2007) podeljen na dve vrste: *S. enterica* i *S. bongori*. Dalje je vrsta *S. enterica* podeljena na 6 podvrsta koje su razlikuju po pojedinim biohemijskim karakteristikama i podložnosti lize sa bakteriofagom Felix O1 i to:

- podvrsta I = podvrste *enterica*
- podvrste II = podvrste *salamae*
- podvrsta IIIa = podvrste *arizonae*
- podvrste IIIb = podvrste *diarizonae*
- podvrste IV = podvrste *houtenae*
- podvrsta VI = podvrste *indica*

U okviru podvrste *S. enterica* subsp. *enterica* nalazi se 99% serotipova odgovornih za alimentarna oboljenja ljudi. Za vrstu *S. bongori*, simbol V je zadržan da se izbegne zabuna sa serotip imenima *S. enterica* subsp. *enterica*. Posledično promenama u taksonomiji, ime serotipa ostalo je glavno taksonomsko obeležje 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) (Kozoderović, 2012).

Sojevi salmonela se klasifikuju u serotipove na osnovu obimnih raznolikosti lipopolisaharida mebrane (LPS), antigen „O“ i flagelarnih proteina, antigen „H“ u skladu sa Kauffmann-White šemom (OIE, 2015). Osim ova dva antigena postoji i površinski

lipopolisaharidni, „Vi“ antigen. Među više od 2400 serotipova *Salmonella*, serotipovi *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* su najčešće izolovani kao uzročnici alimentarnih oboljenja ljudi (EC, 2003).

Salmonele mogu da izmene svoj antigeni sastav zahvaljujući prisustvu plazmida. Plazmidi mogu da variraju u svojoj veličini od 2 do preko 200 kb (kilobaza), mogu da nose faktore virulencije, sposobnost rezistencije na antibiotike i faktore odbrane mikroorganizama.

Od značaja za preživljavanje salmonela u spoljašnjoj sredini su temperatura, relativna vlažnost, kao i pH sredine. Veća koncentracija proteina u sredini gde se nalaze, uslovljava duže preživljavanje salmonela. U osušenom fecesu na niskim temperaturama mogu da prežive i do četiri godine, u tečnom đubretu i vlažnom zemljištu preživljavaju do godinu dana, a u suvom do 16 meseci. Kisela sredina (pH niži od 4,0) brzo inaktivise salmonele. Salmonele su otporne na slane rastvore, a smatra se da u salamuri (12 do 15% soli) mogu da opstanu oko 75 dana. Neotporne su na UV zračenje, a temperatura od 56°C inaktivise salmonele za 10 do 20 minuta. Za dezinfekciju se koriste 1 do 3% karbolna kiselina, 5% krečno mleko ili 1% sublimat (OIE, 2015).

2.2.2. Izolacija, identifikacija i karakterizacija *Salmonella enterica*

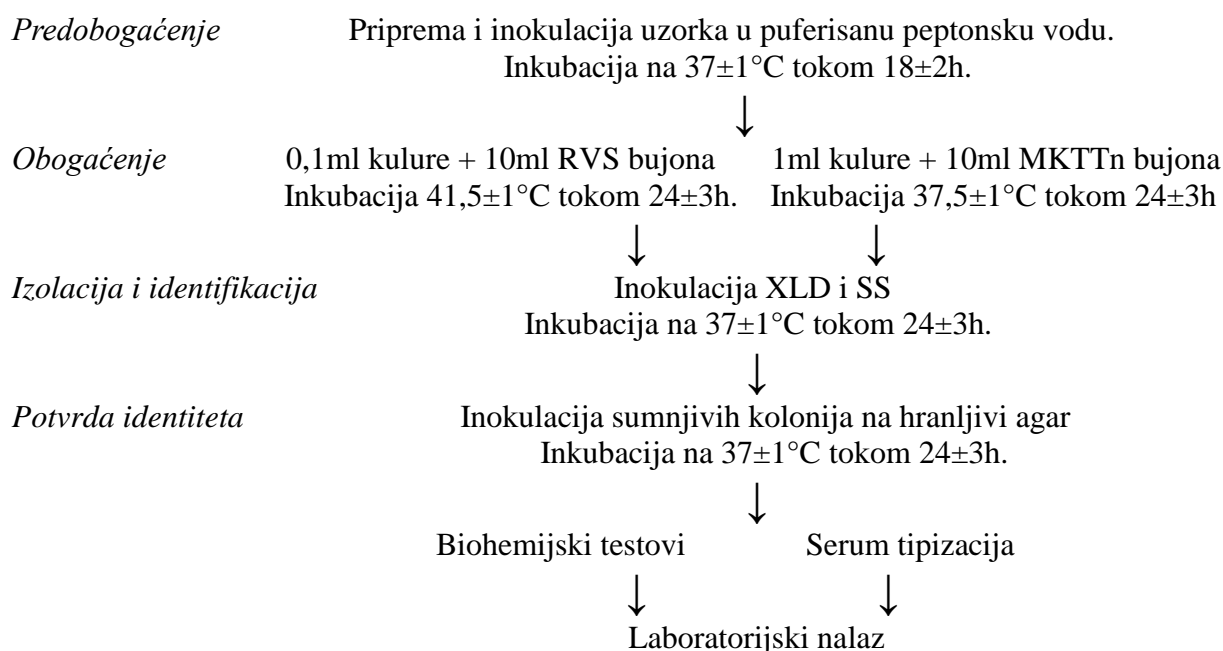
2.2.2.1. Uzorkovanje

Prateći protokol za uzorkovanje (OIE, 2015), uzorkovanje se može vršiti iz organizma, iz tkiva pri obdukciji, putem rektalnih briseva, fecesa, uzorcima iz životne sredine, hrane i opreme za ishranu. Takođe, infekcija životinja nekim sojevima može biti dijagnostikovana i serološki. Serotipovi adaptirani na domaćina obično se teže izoluju iz fecesa. Posebnu pažnju treba posvetiti izolaciji salmonela poreklom od životinja sa subkliničkom infekcijom, jer mogu da izlučuju bakterije samo povremeno i u malom broju. Transport materijala do laboratorije treba da se vrši u što kraćem vremenskom periodu, uz propratnu dokumentaciju (OIE, 2015).

2.2.2.2. Kultivisanje

Postoje brojne metode za izolaciju salmonela koje su u upotrebi širom sveta (Ellis *i sar.*, 1976; Fricker, 1987; Gerhardt, 1981; Reissbrodt, 1995). Danas se za izolaciju i identifikaciju *Salmonella* spp. uobičajeno koristi ISO metoda 6579:2002 (ISO, 2002a). Tokom upotrebe ISO metode 6579:2002 postoje faze i to: (1) predobogaćenje; (2) obogaćenje; (3) izolacija i identifikacija; i (4) potvrda identiteta (Grafikon 2).

Grafikon 2. Dijagram toka horizontalne metode za otkrivanje *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002).



2.2.2.2.1. Predobogaćenje

Broj salmonela u uzorku fecesa asimptomatskih životinja, uzorcima iz životne sredine i/ili hrani za životinje je obično nizak, pa je potrebno koristiti medije za preobogaćenje, kao što su puferezovana peptonska voda ili univerzalni bujon za predobogaćenje, da potpomogne izolaciju.

Puferisana peptonska voda u količini od 225 ml se inokuliše na temperaturi okoline sa 25 ml/g uzorka za ispitivanje, a onda se inkubira na 37±1°C tokom 18±2h.

2.2.2.2.2. Obogaćenje

Mediji za obogaćenje su tečni ili polu-čvrsti agar koji sadrže aditive koji selektivno dozvoljavaju rast salmonela, dok inhibišu rast drugih bakterija. Neki mediji su relativno toksični za određene serotipove salmonela, npr. selenit inhibira *S. Choleraesuis*, a brilijant zeleno je toksičan za mnoge sojeve *S. Dublin*. Povišena temperatura takođe se koristi za povećanje selektivnosti i obogaćivanje sredine. Primeri medija za obogaćenje su natrijum tetrathionat, Muller-Kaufman bujon, selenit F, selenit cistein, brilijant zeleni bujon i Rappaport-Vassiliadis bujon, ili polu-čvrsti Rappaport-Vassiliadis medijum.

Rappaport-Vassiliadis bujon sa sojom (RVS) i Muller-Kaufman tetrathionat/novobiocin bujon (MKTTn) se inokulišu kulturom dobijenom u predobogaćenju. RVS bujon se inkubira na $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ tokom $24 \pm 3\text{h}$, a MKTTn bujon na $37 \pm 1^\circ\text{C}$ tokom $24 \pm 3\text{h}$.

2.2.2.2.3. Izolacija i identifikacija

Selektivne podloge su čvrsti agari koji omogućavaju diferencijalni rast u različitom stepenu. Oni inhibišu rast bakterija, ali osim salmonela u ovom slučaju, i daju informacije o nekim glavnim biohemijskim diferencijalnim karakteristikama, kao što su fermentacija laktoze i produkcija vodonik sulfida (H_2S). Primeri selektivnih medija/agara su: brilijant zeleni agar, ksiloza lizin desoxicholate agar (XLD), deoksikolat citrat agar, bizmut sulfid agar, Rambach agar, SS, SMID, ASAP (OIE, 2015).

Iz kultura dobijenih obogaćenjem se inokulišu selektivne podloge XLD i SS. Podloge se inkubiraju na $37 \pm 1^\circ\text{C}$ tokom $24 \pm 3\text{h}$.

2.2.2.2.4. Potvrda identiteta

2.2.2.2.4.1. Identifikacija sumnjivih kolonija

Sumnjive kolonije se subkultivišu na selektivnim i neselektivnim medijima/agarima kako bi se osiguralo odsustvo mogućih zagađivača, kao što je *Proteus* spp. Posebno je važno da se osigura da se kulture salmonela koje se koriste za određivanje antimikrobne rezistencije ne pomešaju sa drugim organizmima.

2.2.2.2.4.2. Testiranje metodom aglutinacije sa polivalentnim *Salmonella*-tipiziranim serumima

Ako postoji bogat i čist rast, sumnjive kolonije mogu biti testirane metodom aglutinacije sa polivalentnim *Salmonella*-tipiziranim serumima (Ellis *i sar.*, 1976). Određivanje O antigena i H antigena, i u posebnim okolnostima Vi antigena (prisutan kod *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* i *S. Dublin*), vrši se direktnom aglutinacijom na ploči ili cevčicama pomoću specifičnih antiseruma. U slučaju bifaznih organizama, neophodno je odrediti obe

faze; ovo uključuje pasiranje kroz polučvrsti agar, koji sadrži antiserum za poznatu fazu (*OIE*, 2015).

2.2.2.2.4.3. Biohemijski testovi

Sumnjive kolonije mogu da ne daju reakciju aglutinacije ili da spontano aglutiniraju i tada je neophodno da se koriste biohemijski testovi za potvrdu identiteta. Ovi testovi mogu da se izvode sa laboratorijski pripremljenim medijima ili komercijalnim sistemima kao što je analitički profil indeksa (*API*), *OBIS* test, ili kompozitni materijal (kao što je trostruki šećer gvožđe agar (*TSI*)). Ovi testovi se mogu koristiti za skrining organizama (Ewing, 1986) .

2.2.2.3. Metode identifikacije i karakterizacije bazirane na imunološkim reakcijama i nukleinskim kiselinama

Danas su dostupne razne komercijalne metode bazirane na imunološkim reakcijama kao što su imunoadsorpcioni enzimski test (*ELISA*), imunomagnetna separacija (*IMS*), vizuelna imunoprecipitacija (*VIP*) ili metode bazirane na detekciji nukleinskih kiselina kao što su analiza plazmidskog profila (*PP*), restrikciona analiza virulencije plazmida, ribotipizacija, elektroforeza u pulsirajućem polju jednosmerne struje (Pulsed Field Gel Electrophoresis-*PFGE*), lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction-*PCR*), tehnike bazirane na ispitivanju dela genoma (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis - *MLVA*), tehnike bazirane na sekvencioniranju jednog gena odnosno genetskog lokusa (Single Locus Sequence Typing - *SLST*) i sekvencioniranju simultano više gena odnosno genetskih lokusa (Multilocus sequence typing - *MLST*).

Različite molekularne tehnike bazirane na detekciji nukleinskih kiselina imaju za cilj da utvrde prisustvo traženog genetskog materijala u ispitivanom uzorku kao i da omoguće poređenje datih materijala sa ciljem utvrđivanja srodnosti, odnosno praćenja izvora infekcije i puteva širenja datog patogena.

Elektroforeza u pulsirajućem polju jednosmerne struje, odnosno *PFGE*, je metoda bazirana na razdvajanju nukleinskih fragmenata, velikih molekulskih težina dobijenih nakon sečenja celokupne DNK bakterije. *PFGE* je standardna metoda za tipiziranje izolata kod epidemija salmoneloze i epidemioloških istraživanja. Razdvajanje fragmenata se vrši uz pomoć restrikcionih enzima, koji imaju malo restrikcionih mesta u hromozomu. Tokom *PFGE* smer električnog polja kroz gel se periodično menja (pulsira) omogućavajući velikim

fragmentima efikasnije razdvajanje, odnosno prolazak kroz pore gela. Dobijeni profili (odnosno fragmenti) su stabilni i reproducibilni. Filogenetska podudarnost je najznačajnija u slučaju enzima *XbaI*, *BlnI*, *SfiI*, i *PacI* kod sojeva *S. Enteritidis*, dok je *XbaI*, *BlnI*, i *SpeI* u slučaju sojeva *S. Typhimurium*. Enzimi koji su takođe davali dobre rezultate pri tipizaciji *S. Infantis*, *S. Virchow* i *S. Hadar* su *XbaI* i *BlnI* (Zou i sar., 2010; Zheng i sar., 2011).

Procena upotrebljivosti različitih molekularnih metoda treba da se zasniva na tri glavna kriterijuma i to na: (1) verovatnoći diskriminacije (specifičnost); (2) sposobnosti ponavljanja same metode u različitim laboratorijama; i (3) sposobnosti za međunarodnu harmonizaciju. Potencijal primene molekularnih tehnika kao alata u različitim aspektima vezanim za bezbednosti hrane ogleda se na sledeći način: (1) primenjivost pri utvrđivanju i istraživanju epidemije; (2) utvrđivanju izvora epidemije i povezanosti određene vrste hrane i hazarda („source attribution“); i (3) za ranu identifikaciju mikroorganizama sa epidemijskim potencijalom i u oceni rizika (EFSA, 2013a).

2.2.2.4. Serološki testovi

Brojni serološki testovi su razvijeni za detektovanje *Salmonella* spp. infekcija životinja. U analizama se mogu koristiti za različite testove puna krv, serum, mleko ili mesni sok poreklom od zaklanih životinja. Testovi u upotrebi su: terenski test pune krvi živine, brza aglutinacije na ploči, serum aglutinacija, imunoadsorpcioni enzimski test (ELISA).

Serološke metode treba da se koriste za detekciju zaraženih jata ili stada, a ne za identifikaciju pojedinačnih životinja. Poznato je da pojedine životinje koje više nisu zaražene mogu da imaju pozitivni serološki odgovor i tokom dužeg vremena, dok životinje koje aktivno luče salmonele mogu biti serološki negativane u ranim fazama bolesti pa pojedine zaražene životinje nikad ne budu serološki pozitivne. Novorođene životinje su imunološki nezrele i ne reaguju serološki na somatske LPS antigene do 2-3 nedelje starosti, međutim, proizvode serološki odgovor na flagelarni proteinski antigen. Pilići mogu takođe steći anti-salmonela antitela pasivno od roditelja preko žumancetne kese. Mladunci mogu da imaju antitela koji odražava majčin imunološki status. Veštačka imunizacija stvara imune odgovore različitog kvaliteta i neophodno je da se diferencira odgovor vakcine od stvarne infekcije. Većina testova je zasnovana na utvrđivanju IgG, te se povišen nivo antitela obično pojavljuje u periodu 1-3 nedelje sve do 2-3 meseca nakon infekcije. Kod živine, žumance može biti testirano na prisustvo imunoglobulina (anti-salmonela antitela), i može da obezbedi metod za

skrining stada. Ovaj pristup se koristi za praćenje komercijalnih jata nosilja u Danskoj. Kod goveda, mleko može biti testirano na anti-salmonela antitela za skrining mlečnih stada (OIE, 2015).

2.2.3. Salmoneloza ljudi

2.2.3.1. Putevi prenosa *Salmonella* iz sredine ka ljudima

Salmonele se nalaze u crevima i ljudi i životinja, a u životnu sredinu dospevaju preko fecesa. Životinje kliconoše mogu imati salmonele (posebno serotipove *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*) u crevima i bez ispoljavanja kliničkih simptoma, tako da je verovatnoća kontaminacije mesa salmonelama veoma visoka (posebno tokom operacija odstrela, skidanja kože i evisceracije, rukovanja sa sirovim mesom). Na taj način, sirovo meso postaje izvor infekcija ljudi. Salmonele mogu ući u lanac hrane na bilo kojoj tački, od hrane za životinje, životne sredine, na klanici ili preradi mesa, do prodaje, restorana i pripremanja hrane u kućnim uslovima (EC, 2000). Infekcija ljudi salmonelama najčešće nastaje zbog neadekvatnih uslova skladištenja hrane (kada inicijalno prisutne salmonele imaju uslove za ubrzano umnožavanje u hrani), neadekvatnog termičkog tretmana hrane ili naknadne kontaminacije od osoba-kliconoša koje rukuju hranom, a takođe i sa radnih površina i pribora. Infekcija najčešće nastaje u letnjim mesecima, a najugroženija populacija su osobe mlađe od 14 godina (EFSA, 2010).

Ljudi mogu da se inficiraju salmonelama iz različitih vrsta hrane. U epidemijama salmoneloze u 2014. godini u EU, najveći broj ljudi se inficirao preko jaja i proizvoda od jaja (44,0%), zatim putem pekarskih proizvoda (12,9%) i svinjskog mesa (9,3%) (EFSA/ECDC, 2016). U slučaju mesa brojlera procenat je iznosio 3,2% u 2011. godini, 3,7% u 2012. godini, 5,1% u 2013. godini i 3,6% u 2014. godini. Kod svinjskog mesa procenat u 2011. godini je bio 4,6 % u poređenju sa 5,8 % u 2012. godini.

2.2.3.2. Klinička slika salmoneloze ljudi

Bolesti izazvane netifusnim salmonelama u ljudi se mogu manifestovati u više kliničkih oblika: (1) akutni gastroenterokolitis, (2) enteralna groznica, (3) bakterijemija (septični oblik), (4) lokalizovana infekcija i (5) hronično kliconoštvo (EC, 2000). U

razvijenim zemljama najčešći oblik je akutni gastroenterokolitis, dok je u nerazvijenim to enteralna groznica. Akutni gastroenterokolitis je najčešći oblik i javlja se u 70-80% slučajeva. Inkubacija traje 6-72 sata, a najčešći simptomi su: visoka temperatura (38-40°C), mučnina, povraćanje, malaksalost, glavobolja, bolovi u abdomenu i dijareja. Bolest obično prolazi za 2-5 dana. Enteralna groznica se javlja kada salmonela preko sluznice creva prodru u limfnu i krvnu cirkulaciju. Ovaj teški oblik salmoneloze je praćen bakterijemijom, povišenom temperaturom, drhtavicom, hepatosplenomegalijom i drugim simptomima koji podsećaju na trbušni tifus. Najčešći izazivači bolesti su: *S. Enteritidis* i *S. Choleraesuis*. Bakteriemijska se sreće najčešće kod dece i starijih osoba, a prvenstveno kod novorođenčadi i javlja se u 8-15% slučajeva. Obično se nastavlja na kliničke oblike salmonelozne groznice pri čemu se kod bolesnika javlja visoka temperatura sa teškim opštim stanjem. Komplikacije koje se mogu javiti su salmonelozni meningitis, apsces mozga, subduralni empijem, artritis, osteomijelitis, apsces miokarda, septički tromboflebitis, abdominalni apsces, holecistitis, pleuralni empijem, apendicitis, nekrotizirajući enterokolitis i Reiterov sindrom. Uzročnik je najčešće *S. Choleraesuis*, *S. Virchow* i *S. Typhimurium*. Hronično kliconoštvo se pojavljuje obično posle enteralne groznice i javlja se u 1% svih slučajeva; salmonela se zadržavaju u već ranije oboleloj žučnoj kesi (holelitijaza) i povremeno izlučuju stolicom duže od 6 meseci, retko i više godina.

Infektivna doza salmonelama varira i može biti čak do 10^6 bakterija, mada je u nekim epidemijama procenjeno da ona može biti i veoma niska, od 1-100 bakterija po gramu hrane (Vought i Tatini, 1998). Infektivna doza najčešće zavisi od virulencije serotipa, od imunog statusa osobe i hrane kao izvora infekcije (Kothary i Babu, 2001).

2.2.3.3. Incidencija salmoneloze na teritoriji zemalja EU

Prema izveštaju EFSA/ECDC o zoonozama u EU (EFSA/ECDC, 2016; 2015; 2014; 2013; 2012; 2011; 2010), od ukupnog broja prijavljenih slučajeva salmoneloze u ljudi u periodu od 2008. do 2014. godine, serotip *S. Enteritidis* je bio uzrok najvećeg broja slučajeva oboljenja (64,5-39,5%). Na drugom mestu je serotip *S. Typhimurium* (23,8-16,5%) (Tabela 2.2.1). Ova dva serotipa nisu specifična za određenog domaćina i nalaze se kod skoro svih životinjskih vrsta čije se meso koristi za ishranu ljudi.

Tabela 2.2.1. Distribucija prijavljenih i potvrđenih slučajeva salmoneloze ljudi (20 najčešćih serotipova) u EU/EEA, 2012-2014. Izvor: (EFSA/ECDC, 2016; 2015; 2014).

Serotipovi	2014.		2013.		2012.	
	Broj slučajeva	%	Broj slučajeva	%	Broj slučajeva	%
Enteritidis	32.878	44,4	29.090	39,5	32.917	41,0
Typhimurium	12.867	17,4	14.852	20,2	17.975	22,4
Monophasic Typhimurium 1,4,[5],12:i:-	5.770	7,8	6.313	8,6	5.836	7,3
Infantis	1.841	2,5	2.226	3,0	1.929	2,4
Stanley	757	1,0	714	1,0	969	1,2
Derby	753	1,0	813	1,1	730	0,9
Newport	752	1,0	818	1,1	754	0,9
Kentucky	605	0,8	651	0,9	626	0,8
Virchow	509	0,7	571	0,8	532	0,7
Bovismorbificans	441	0,6	412	0,6	410	0,5
Java	388	0,5	581	0,8	445	0,6
Agona	378	0,5	401	0,5	452	0,6
Saintpaul	374	0,5	448	0,6	354	0,4
Muenchen	368	0,5	434	0,6	242	0,3
Napoli	333	0,4	290	0,4	365	0,5
Brandenburg	294	0,4	111	0,2	302	0,4
Chester	294	0,4	267	0,4	106	0,1
Hadar	286	0,4	238	0,3	300	0,4
Braenderup	276	0,4	245	0,3	454	0,6
Oranienburg	261	0,4	274	0,4	311	0,4
Ostale	13.599	18,4	13.883	18,9	14.286	17,8
Ukupno	74.024	100,0	73.632	100,0	80.295	100,0

Salmoneloza je u periodu 2005-2014. godine predstavljala drugo alimentarno oboljenje ljudi u EU po broju slučajeva (EFSA/ECDC, 2016; 2015; 2014; 2013; 2012; 2011; 2010). Ukupno je u toku 2014. godine kod 90.238 slučajeva postavljena sumnja na salmonelozu u 27 zemalja članica EU, a kod 88.715 slučajeva je i potvrđen uzročnik (incidencija je bila 23,4 slučaja na 100.000 stanovnika) (EFSA/ECDC, 2016) (Tabela 2.1.1). To predstavlja povećanje od 15,3% u poređenju sa brojem potvrđenih slučajeva u 2013. godini. Takođe, to je promena u značajnom opadajućem trendu u EU koji je postojao posmatrano u periodu 2009–2013. ($p < 0.001$ sa linearnom regresijom) (Grafikon 3, Tabela 2.1.1) (EFSA/ECDC, 2016; 2015; 2014; 2013; 2012; 2011; 2010). Broj potvrđenih smrtnih slučajeva na teritoriji EU tokom 2014. godine prouzrokovanih salmonelozom bio je 65 (Tabela 2.2.2), što je stopa od 0,15%, dok je broj potvrđenih smrtnih slučajeva u epidemijama salmoneloze bio 11 (Tabela 2.2.3) (EFSA/ECDC, 2016).

Za značajan pad broja slučajeva salmoneloze tokom više godina monitoringa zoonoza (od 2005-2014.) najviše su zaslužni kontrolni programi za *Salmonella* spp. koji su sprovedeni u EU na nivou farmi, pre svega kod nosilja konzumnih jaja (jaja i proizvoda od jaja su najčešći izvor ove bolesti u ljudi, 45,2% od ukupnog broja epidemija salmoneloze u 2012.

godini) (EFSA/ECDC, 2014). Postoji jasan sezonski trend u broju potvrđenih i prijavljenih slučajeva salmoneloze u EU u periodu 2008-2014, sa većinom slučajeva prijavljenih tokom letnjih meseci i rane jeseni (Grafikon 3) (EFSA/ECDC, 2016).

Tabela 2.2.2. Broj hospitalizovanih lica i smrtnih slučajeva prouzrokovanih zoonozama u odnosu na broj potvrđenih slučajeva oboljenja ljudi u EU, u 2014. godini; Izvor: (EFSA/ECDC, 2016).

Oboljenje	Broj potvrđenih slučajeva kod ljudi	Hospitalizovano			Smrtni slučajevi		
		Broj potvrđenih slučajeva (%)	Broj hospitalizovanih lica	Stopa hospitalizovanja (%)	Broj potvrđenih slučajeva (%)	Broj smrtnih slučajeva	Stopa smrtnosti (%)
Kampilobakterioza	236.851	25,4	18.303	30,4	73,6	25	0,01
Salmoneloza	88.715	32,2	9.830	34,4	49,6	65	0,15
Jersinioza	6.625	15,2	442	44,0	58,3	5	0,13
VTEC infekcija	5.955	39,9	930	39,2	58,6	7	0,20
Listerioza	2.161	38,0	812	98,9	64,8	210	15,0
Ehinokokoza	801	24,0	122	63,5	24,6	1	0,51
Q groznica	777	NA	NA	NA	51,2	1	0,26
Bruceloza	347	62,0	142	66,1	41,5	0	0,0
Tularaemija	480	47,1	92	40,7	49,0	0	0,0
Trichineloza	319	74,6	150	63,0	74,9	2	0,84
West Nile groznica	77	66,2	48	94,1	66,2	7	13,7
Besnilo	3	NA	NA	NA	66,6	2	100,0

Grafikon 3. Trend prijavljenih i potvrđenih slučajeva salmoneloze ljudi u EU, 2008-2014., Izvor: (EFSA/ECDC, 2016).

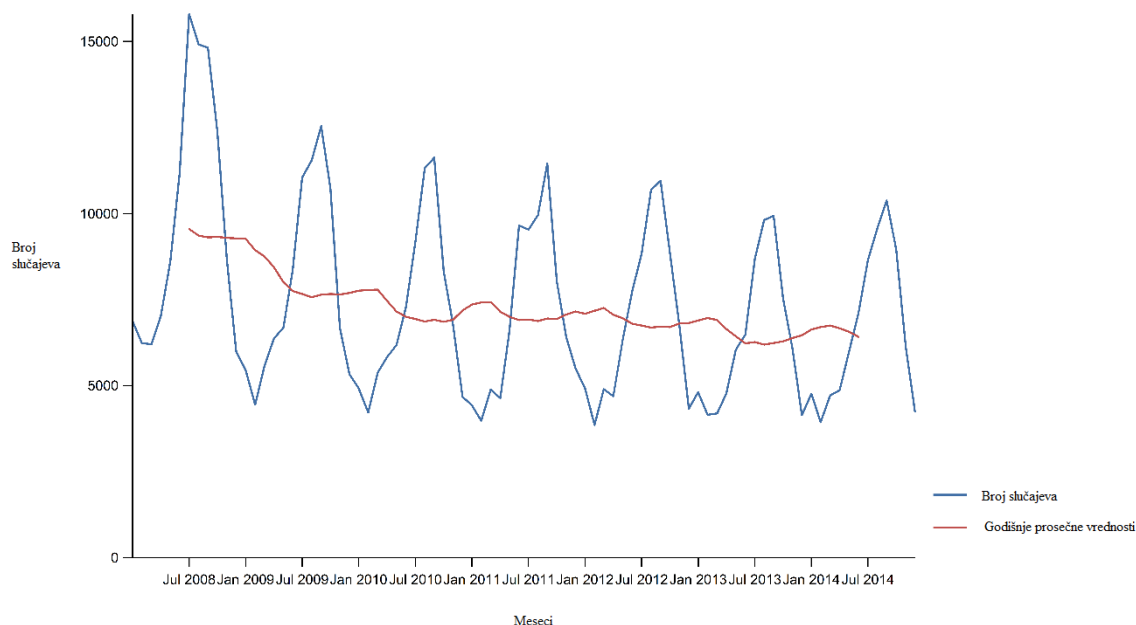


Tabela 2.2.3. Broj potvrđenih epidemija alimentarnih oboljenja poreklom od hrane i broj slučajeva kod ljudi po uzročniku u toku 2014. godini, u EU. Izvor: (EFSA/ECDC, 2016).

Uzročnik	Br. epidemija		Epidemije sa potvrđenim uzročnikom		Br. slučajeva kod ljudi		
	N	%	N	%	Oboleli	Hospitalizovano	Smrtni slučajevi
Virusi	1.072	20.41	84	14.19	3.654	112	0
<i>Salmonella</i>	1.049	19.98	226	38.18	3.677	890	11
Bakterijski toksini	843	16.05	109	18.41	3.026	187	3
<i>Campylobacter</i>	446	8.49	31	5.24	525	40	0
Ostali uzročnici	140	2.67	58	9.8	238	38	1
Ostali bakterijski agensi	55	1.05	8	1.35	101	12	0
<i>Escherichia coli</i> , patogena VTEC	41	0.78	7	1.18	138	8	0
Paraziti	33	0.63	17	2.87	287	82	0
<i>Escherichia coli</i> , patogena (osim VTEC)	30	0.57	7	1.18	448	90	0
<i>Yersinia</i>	11	0.21	1	0.17	55	4	0
Nepoznato	1,531	29.15	44	7.43	621	13	0
EU ukupno	5.251	100	592	100	12.770	1.476	15

U toku 2014. godine serotipovi *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* su bili zastupljeni sa 44,4% i 17,4%, u odnosu na ukupan broj od 74.024 prijavljenih i potvrđenih slučajeva salmoneloze, dok daleko manje u alimentarnim oboljenjima ljudi učestvuju ostali serotipovi (*S. Infantis*, *S. Stanley*, *S. Newport*, *S. Kentucky*, *S. Newport*, *S. Derby*) (Tabela 2.2.1). Slučajevi oboljenja ljudi sa *S. Enteritidis* su najčešće povezani sa konzumiranjem jaja i proizvoda od jaja, a *S. Typhimurium* sa konzumiranjem svinjskog mesa (EFSA/ECDC, 2016).

Stopa potvrđenih slučajeva u 2012. godini u EU bila je najveća kod male dece, posebno u grupi 0-4 godina starosti, incidencija je bila 98,15 na 100.000 ljudi. Stopa u male dece je skoro tri puta veća nego kod starije dece i više od pet puta veća nego u drugom dobu populacije. Nije bilo razlike u ukupnoj stopi između muškaraca i žena (EFSA/ECDC, 2013; 2014; ECDC, 2013; ECDC, 2014).

2.2.3.4. Incidencija salmoneloze na teritoriji SAD

Na teritoriji SAD stopa dijagnostikovanih infekcija salmonelom kod dece mlađe od pet godina bila je veća od stope u svim drugim uzrasnim kategorijama (CDC, 2011). Procenjuje se da se 1,2 miliona slučajeva salmoneloze ljudi godišnje javlja u Sjedinjenim Američkim Državama, a od tog broja oko 42.000 je laboratorijski potvrđenih slučajeva prijavljenih Centru za kontrolu i prevenciju oboljenja (CDC) SAD. Procenjeno je da se svake

godine desi 400 smrtnih slučajeva, te i nekoliko slučajeva komplikacija hroničnog artritisa. Serotipovi *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, i *S. Newport* iznose oko polovine potvrđenih izolata salmonela u laboratorijama i prijavljenih američkom nacionalnom sistemu nadzora salmonela (CDC, 2011).

2.2.3.5. Incidencija salmoneloze na teritoriji Republike Srbije

Incidencija humane salmoneloze u Srbiji prema zvaničnom statističkom godišnjaku u 2011. godini je iznosila 25,34 slučaja na 100.000 stanovnika, odnosno bilo je 73 epidemije sa 1.848 obolelih (Institut za javno zdravlje Srbije, 2012). Tokom 2014. godine u Srbiji najčešći uzročnik epidemija bila *S. Enteritidis* i potvrđena je u 67 epidemija alimentarnih oboljenja sa 1.512 prijavljenih slučajeva, sa incidencijom od 21,72 slučaja na 100.000 stanovnika, dok je smrtnost iznosila 0,03% od ukupnog broja slučajeva (Institut za javno zdravlje Srbije, 2014). Prema izveštajima za period 1999-2006., incidencija ove bolesti je varirala od 30,6-53,6/100.000 stanovnika godišnje, što je bilo generalno slično situaciji u EU.

2.2.4. *Salmonella enterica* u divljih svinja

2.2.4.1. Klinička slika salmoneloze divljih svinja

U najvećem broju slučajeva infekcija divljih svinja nastaje oralnim putem. Salmonele mogu da prođu želudačnu barijeru i neoštećene dospeju do creva. Patogeneza salmoneloznih infekcija se odigrava u tri faze: (1) kolonizacija distalnih partija tankih creva i kolona, (2) invazija intestinalnog epitela, i (3) stimulacija izlaska tečnosti (Radojičić, 2011).

Sve starosne kategorije divljih svinja mogu da obole, ali su najprijemčivija prasad posle zalučenja. Stres, a naročito žeđ kod svinja predisponiraju nastanak oboljenja. U slučaju akutnog toka, prvo se jave crvene promene na koži ušiju, abdomena i zadnjeg dela buta, posle čega dolazi do povišene temperature, konjuktivitisa, anoreksije i uginuća u roku od jednog do tri dana. Subakutnu formu bolesti karakterišu profuzna dijareja, feces neprijatnog mirisa, gubitak kondicije i uginuće. U hroničnom toku, osim zaostajanja u prirastu, nema drugih simptoma (Radojičić, 2011).

Klasična klinička slika salmoneloze svinja se retko javlja; ipak, u literaturi su zabeleženi ovakvi slučajevi i kod divljih svinja. Perez i saradnici (1999) su objavili slučaj

salmoneloze divljih svinja, gajenih poluslobodno, prouzrokovane sa *S. Cholerasuis*, dok su Ecco i saradnici (2006) utvrdili *S. Saintpaul* kao uzročnika oboljenja i uginuća divljih svinja. Ovom prilikom klinički znaci oboljenja bili su ispoljeni samo kod mladih kategorija starosti od dva do pet meseci, kao što su gubitak telesne mase i letargija. Životinje su uginjavale posle tri do pet dana od početka kliničkih simptoma, a manji broj je uginuo iznenada. Patoanatomski su utvrđeni ulcerativno zapaljenje ileuma, slepog creva i debelog creva, sa prisutnim fibrinskim naslagama. Petehijalna krvarenja su bila prisutna na epikardijumu, endokardijumu, peritoneumu, bubrezima, plućima i jetri. Mezenterijalni limfni čvorovi su bili povećani sa medularnim i subkapsularnim krvarenjima.

2.2.4.2. Prisustvo *Salmonella enterica* kod divljih svinja

Salmonella kod divljih svinja je tradicionalno vezivana za *S. Typhimurium* (Weber, 1994), ali u proteklim decenijama spektar izolovanih serotipova sa trupova, tonzila, fecesa, limfnih čvorova je daleko širi (Tabela 2.2.4).

Tokom 2005. i 2006. godine na severu Portugala je bilo uzorkovano 77 uzoraka fecesa divljih svinja i utvrđeno je prisustvo *Salmonella* spp. u fecesu 22,1% uzoraka i identifikovana dva serotipa, *S. Typhimurium* (65%) i *S. Rissen* (35%) (Vieira-Pinto *i sar.* 2011). Ovakav nalaz je u korelaciji sa nalazom *Salmonella* spp. na liniji klanja kod 101 domaće svinje i to poreklom sa istog regiona severnog Portugala (Vieira-Pinto *i sar.*, 2005). U toj prethodnoj studiji, *Salmonella* spp. je identifikovana u 26,7% svinja i to u 13,9% uzoraka sadržaja ileuma, 18,8% uzoraka ileokoličnog limfnog čvora, 9,9% uzoraka tonzila, 12,9% uzoraka mandibularnog limfnog čvora i 12,9% uzoraka brisa trupa. Serotipovi izolovani kod ovih svinja bili su *S. Typhimurium* (47,8%), *S. Rissen* (27,5%), *S. Tennessee* (7,2%), *S. Enteritidis* (5,8%), 4,[5],12:i:-(4,4%), *S. Anatum* (2,9%), *S. Give* (2,9%) i *S. Derby* (1,5%) (Vieira-Pinto *i sar.*, 2005). Ovakav nalaz može ukazivati na mogućnost prenosa patogena između domaćih i divljih životinja.

Tabela 2.2.4. *Salmonella* spp. serotipovi izolovani iz divljih svinja u evropskim zemljama, Australiji i Japanu, 2000–2012.

Država	Uzorak	<i>S. enterica</i> serovari	Reference
Švajcarska	tonzile	Enteritidis, Veneziana, Stourbridge	Wacheck <i>i sar.</i> , (2010)
Portugal	feces	Typhimurium, Rissen	Vieira-Pinto <i>i sar.</i> , (2011)
Italija	feces	Coeln, Typhimurium, Ball, Thompson, Veneziana, Enteritidis, Infantis, Diarizonae	Magnino <i>i sar.</i> , (2011)
		Salamae, Diarizonae, Houtenae, Fischerhuetten, Veneziana, Napoli, Kottbus, Thompson	Zottola <i>i sar.</i> , (2012)
		<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , <i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> i <i>S. Typhimurium</i>	Chiari <i>i sar.</i> , (2013)
Australija	feces/tonzile	Anatum, Saintpaul, Litchfield, i Montevideo	Ward <i>i sar.</i> , (2013)
Japan	feces	Agona, Narashino, Enteritidis, Havana, Infantis, Thompson	Sasaki Y. <i>i sar.</i> , (2013)
Švedska	tonzile	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> i <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i>	Sanno <i>i sar.</i> , (2014)
	ileocekalni ln.	Typhimurium	Sanno <i>i sar.</i> , (2014)
Nemačka	limfni čvor	Hadar	Ziegenfuss (2003)
Poljska	trup	Bardo	Wisniewski (2001)

U periodu 2007-2009., sprovedeno je istraživanje na prisustvo *Salmonella* spp. kod 156 ulovljenih divljih svinja u Poljskoj (Wisniewski, 2011). Uzorkovani su mišićno tkivo, limfni čvorovi, deo jetre, bubreg i deo slezine. Utvrđeno je prisustvo *Salmonella* spp. kod 11 životinja (7%). Utvrđeno je prisustvo samo jednog soja i to *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Bardo.

Velike razlike u prevalenciji *Salmonella* spp. nisu samo prijavljene između pojedinih životinjskih vrsta (na primer, viša je kod divljih svinja nego kod divljih preživara), već i između pojedinih regiona (na primer, viša prevalencija je utvrđena u južnim državama EU) (Tabela 2.2.5).

Tabela 2.2.5. Prevalencija *Salmonella* spp. kod divljih životinja u različitim evropskim zemljama, Australiji i Japanu, 2000–2012.

Vrsta životinje i uzorak	Država	Broj uzoraka	Broj pozitivnih	Reference
Divlje svinje, feces	Italija ^a	2.365	441 (18,7%)	Magnino <i>i sar.</i> (2011)
	Portugal	77	17 (22,1%)	Vieira-Pinto <i>i sar.</i> (2011)
	Švajcarska	73	4 (5,5%)	Wacheck <i>i sar.</i> (2010)
	Italija	499	54 (10,8%)	Zottola <i>i sar.</i> (2012)
	Italija	1.313	326 (24,82%)	Chiari <i>i sar.</i> (2013)
	Australija	651	36,3%	Ward <i>i sar.</i> (2013)
	Japan		7,4%	Sasaki <i>i sar.</i> (2013)
	Švedska	88	1,1%	Sanno <i>i sar.</i> (2014)
Divlje svinje, tonzile	Švajcarska	153	19 (12%)	Wacheck <i>i sar.</i> (2010)
	Australija	651	11,9%	Ward <i>i sar.</i> (2013)
Divlje svinje, ileocekalni ln.	Švedska	88	10,2%	Sanno <i>i sar.</i> (2014)
	Švedska	88	1,8%	Sanno <i>i sar.</i> (2014)
Preživari, feces	Italija ^a	445	8 (1,8%)	Magnino <i>i sar.</i> (2011)
	Norveška	72	0	Kemper <i>i sar.</i> (2004)
Ptice plovuše kloakalni bris	Austrija	142	0	Deutz <i>i sar.</i> (1999)
	Nemačka	96	1	Backhus (2000)
Ptice plovuše, feces	Austrija	210	0	Spallinger <i>i sar.</i> (2005)
	Austrija	74	0	El-Ghareeb <i>i sar.</i> (2009)

^a Zbirno 5 godina

Tokom perioda između oktobra 2007. i marta 2008., u kantonu Ženeva su odstreljene 153 divlje svinje i od njih su uzorkovane tonzile i feces. U tonzilama je utvrđeno prisustvo *Salmonella* spp. (12%), dok u fecesu prisustvo *Salmonella* spp. nije utvrđeno. Većina izolovanih *Salmonella* spp. bile su *S. Enteritidis* (75%), *S. Stourbridge* (13%) i *S. Veneziana* (13%) (Wacheck *i sar.*, 2010).

U drugoj studiji, ispitivana je prevalencija *Salmonella* spp. na uzorku od 499 divljih svinja u periodu dve lovne sezone na području regije Lacio u Italiji (Zottola *i sar.*, 2012). Uzorkovan je feces sa ciljem mikrobiološkog ispitivanja prisustva *Salmonella* spp. i krv odstreljenih svinja u cilju potvrđivanja prisustva antitela na *Salmonella* spp. ELISA tehnikom. Od ukupno ispitana 383 uzorka seruma, 255 (66,5%) je bilo pozitivno na prisustvo *Salmonella* spp. antitela. Od 499 uzoraka fecesa, 54 (10,8%) je bilo pozitivno na *Salmonella* spp. Najčešći izolati *Salmonella* bili su: *S. enterica* subsp. *salamae* II (24%), *S. enterica* subsp. *diarizonae* III b (12,9%), *S. enterica* subsp. *houtenae* IV (11,1%) i *S. Fischerhuetten* (7,4%); dok su u manjem procentu izolovani *S. Veneziana* (5,5%), *S. Napoli* (5,5%), *S. Kottbus* (5,5%), *S. Thompson* (5,5%), *S. enterica* subsp. *arizonae* III a (3,7%), *S. Toulon* (3,7%), *S. Burgas* (1,8%), *S. Tennenhone* (1,8%), *S. Ferruch* (1,8%), *S. Choleraesuis* (1,8%),

S. Paratyphi (1,8%), *S. Stanleyville* (1,8%), *S. Typhimurium* (1,8%) i *S. enterica* subsp. *enterica* 4,5,12:1:- (1,8%) (Zottola *i sar.*, 2012).

U toku istraživanja u regijama Lombardija (2007/08) i Emilia-Romanja (2008/09) uzorkovan je sadržaj cekuma i rektuma divljih svinja tokom evisceracije i ispitivan na prisustvo *Salmonella* spp. Ukupno je uzorkovano 2.365 jedinki i utvrđeno je prisustvo *Salmonella* spp. u 441 uzorku (18,7%) (Magnino *i sar.* 2011). Najčešći utvrđeni serotipovi bili su *S. Coeln* (81 izolat), *S. Typhimurium* (74), *S. Ball* (43), *S. diarizonae* (40), *S. Thompson* (37), *S. Venezia* (37), *S. Enteritidis* (18), *S. Infantis* (5). Takođe, tokom sezona 2007/08, 2008/09 i 2009/10 na severu Italije uzorkovan je feces od 1.313 divljih svinja i *Salmonella* spp. je potvrđena kod 326 jedinki (24,82%). Najčešći izolati su bili *S. enterica* subsp. *enterica* (79,45%), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (11,66%) i *Salmonella* Typhimurium (9,82%) (Chiari *i sar.*, 2013).

Na prostoru severoistočne Australije tokom 2010. godine uzeti su uzorci fecesa i mezenterijalnog limfnog čvora od 651 divlje svinje, i u fecesu je potvrđeno prisustvo kod 36,3%, a u mezenterijalnom limfnom čvoru kod 11,9%. Najčešći izolovani sojevi su bili *S. Anatum* (20,9%), *S. Saintpaul* (9,4%), *S. Litchfield* (8,6%), i *S. Montevideo* (4,3%) (Ward *i sar.*, 2013). Tokom 2010. godine na području Japana *Salmonella* spp. je potvrđena iz 7,4% uzoraka fecesa divljih svinja, a najčešći izolati su bili *S. Agona*, *S. Narashino*, *S. Enteritidis*, *S. Havana*, *S. Infantis*, i *S. Thompson* (Sasaki *i sar.*, 2013).

Tokom lovne sezone 2010/11 na području Švedske uzorkovano je 88 divljih svinja i PCR tehnikom je utvrđeno prisustvo *Salmonella* spp. u tonzilama kod 10,2%, ileocekalnom limfnom čvoru 1,8% i fecesu 1,1%. Iz tonzila su izolovani *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (I) (4,5:-:1,5) i *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* (IIIb) (O42:r:-), dok je iz limfnog čvora izolovana *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (I) (Typhimurium) (Sanno *i sar.*, 2014).

Prisustvo *S. enterica* subsp. *diarizonae* je karakteristično za reptile i hladnokrvne životinje. *Salmonella* spp. u fecesu je potvrđena i kod 22,1% uzoraka poreklom iz Portugala i tada su identifikovana dva serotipa *S. Typhimurium* (65%) i *S. Rissen* (35%) (Vieira-Pinto *i sar.*, 2011).

2.2.4.3. Prisustvo *Salmonella enterica* na mesu trupova divljih svinja

U literaturi postoji malo radova gde je utvrđivano prisustvo, odnosno učestalost *Salmonella* spp. na mesu trupova divljih svinja. Wisniewski i sar. (2001) su na uzorku 156 ulovljenih divljih svinja ispitanih u periodu od novembra 1997. godine do februara 1999. godine na području severnoistočne Poljske, utvrdili prisustvo *Salmonella* spp. na površini mesa trupova 11 životinja (7%), uključujući i soj izolovan po prvi put u Poljskoj (*S. enterica* spp. *enterica* serovar Bardo). U drugoj studiji u Australiji, 154 trupa divljih svinja ispitana su na prisustvo *Salmonella* spp., a 34% trupova imalo je jedan ili više serotipova salmonela (Bensink i sar. 1991). Ukupno 13 serotipova bilo je izolovano od divljih svinja, a *S. Anatum* (31 izolat) i *S. Typhimurium* (9 izolata) bili su dominantni serotipovi (Bensink i sar. 1991). U Španiji je na uzorku od 333 divlje svinje utvrđen nalaz *Salmonella* u 1,2%, a potvrđeni su serotipovi Bardo, Montevideo, Arizonae III (16:i,v:1,5,7) i Typhimurium (Díaz-Sánchez i sar., 2013) (Tabela 2.2.6).

Tabela 2.2.6. Prevalencija *Salmonella* spp. na trupovima i mesu divljih svinja iz raznih evropskih zemalja.

Uzorak	Faza procesa	Region / Država	Ukupan broj	Pozitivno	Reference
Limfni čvor	Evisceracija	Nemačka	70	1 (1,4%)	Ziegenfuss (2003)
Tonzile	Evisceracija	Švajcarska	153	19 (12,4%)	Wacheck i sar. (2010)
Trup	Evisceracija	Nemačka	127	0	Atanassova i sar. (2008)
Trup	Hlađenje	Italija	23	0	Avagnina i sar. (2009)
Trup	Hlađenje	Austrija	3	0	Paulsen i Wink. (2004)
Trup	GHE	Poljska	156	11 (7%)	Wisniewski (2001)
Meso-sečeno	GHE	Nemačka (uvoz)	224	1 (0,4%)	Türk (2008)
Meso-sečeno	GHE	Nemačka	14	2 (14,3%)	Wacheck (2008)

GHE - objekat za obradu mesa

Prevalencija *Salmonella* spp. u mesu divljih svinja u prometu u studiji Wacheck i sar. (2008) je bila 14,3%, dok su slične rezultate prijavili Jakšić i saradnici (2003). Razni autori su objavili i različite prevalencije *Salmonella* spp. kako na trupovima tako i na mesu verovatno iz razloga širokog spektra različitih primenjenih higijenskih normi u procesu obrade i rasecanja trupova, što se može i videti iz tabele 2.2.6.

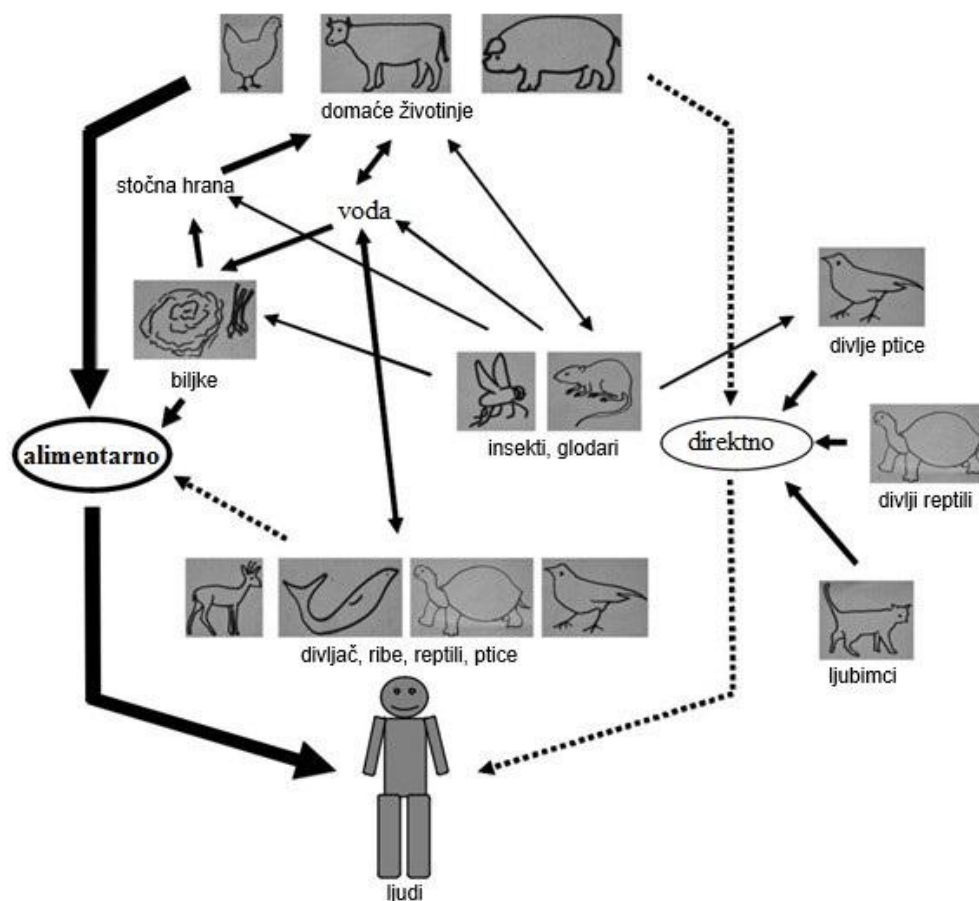
2.2.4.4. Izvori i putevi mikrobiološke kontaminacije mesa divlje svinje sa *Salmonella*

Opšte je poznato da se *Salmonella* spp. nalazi u digestivnom traktu velikog broja domaćina, uključujući i divlje životinje a pogotovo divlje svinje. Stoga, u slučaju neadekvatnog odstrela (u abdomen) kao i neadekvatne evisceracije, povećava se mogućnost da *Salmonella* spp. kontaminira meso trupova divljih svinja (Türck, 2008; Wisniewski, 2001).

Opisani su razni mogući putevi prenosa *Salmonella* spp. u populaciji divljih životinja: (i) putem kontakta divljih životinja sa domaćim životinjama, direktno ili preko vektora; (ii) direktnim kontaktom sa ljudima; (iii) putem mesa divljih životinja; i (iv) putem kontaminacije hrane/vode (Hilbert *i sar.* 2012) (Grafikon 4).

Divlje životinje mogu putem direktnog kontakta preneti patogene na domaće životinje, te su u literaturi opisani razni slučajevi prenosa *Salmonella* spp. sa divljih životinja na domaće životinje (Hughes *i sar.*, 2008; Skov *i sar.*, 2008; Vieira-Pinto *i sar.*, 2011; Wales *i sar.*, 2010). Opisan je jednosmerni, kao i dvosmerni prenos patogena između divljači i domaćih životinja (Skov *i sar.*, 2008; Arvanitidou *i sar.*, 2005; Kaboré *i sar.*, 2010). Spona u prenosu *Salmonella* spp. između divljih i domaćih životinja, kao i u kontaminaciji hrane za ljude mogu biti različiti vektori: glodari, muve, tvrdokrilci i drugi (Liebana *i sar.*, 2003; Skov *i sar.*, 2008; Wales *i sar.*, 2010). Takođe, miševi i pacovi osim mehaničkih vektora mogu biti i rezervoar patogena (Liebana *i sar.*, 2003; Skov *i sar.*, 2008). Kritične grupe životinja su grla na ispaši na slobodnom prostoru, kao i organske farme sa slobodnim načinom držanja domaćih životinja koje lako dolaze u kontakt sa divljim životinjama.

Kontaminacija hrane i vode sa *Salmonella* spp. je obično posledica fekalne kontaminacije, a važno je ukazati na značaj kontaminacije vode za navodnjavanje voća i povrća s obzirom da se ono često ne obrađuje termički pre upotrebe (Hanning *i sar.*, 2009; Berger *i sar.*, 2010). Kao što je navedeno, moguće je da dođe do kontaminacije sirove hrane ali postoji i mogućnost kontaminacije gotovog proizvoda ili proizvoda u toku prerade iz razloga nepoštovanja dobre proizvođačke/higijenske prakse. Pojedini sojevi salmonela mogu se pričvrstiti na površinu voća i povrća, kao na primer, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Senftenberg* ili *S. Newport* (Berger *i sar.*, 2010).



Grafikon 4. Mogući putevi prenosa *Salmonella* spp. ka ljudima u kojima divljač može biti uključena (Hilbert *i sar.* 2012).

Prisustvo salmonela je dokazano kod gotovo svih životinjskih vrsta (sisara, prica reptila, insekata). Različiti sojevi salmonela uglavnom su vezani za specifične domaćine, kod kojih ispoljavaju patološki efekat, dok ostale biološke vrste služe uglavnom kao vektori za prenos datog soja. Iz ovog proizilazi zabrinutost da bi putem horizontalne razmene genetskog materijala moglo doći do menjanja virulencije kod pojedinih sojeva salmonela, što bi za posledicu imalo povećan broj epidemija sa dosad nezabeleženim sojevima (Bäumler *i sar.*, 1998). Danas kada se sagledaju putevi potencijalnog prenosa salmonele dolazi se do zaključka da su svi teoretski putevi mogući u praksi, što izaziva dodatnu zabrinutost (Hilbert *i sar.* 2012).

2.3. Kontrolne mere za *Salmonella enterica* u lancu mesa lovne divljači

2.3.1 Postojeći kontrolni programi za *Salmonella* u lancu mesa

Direktivom (EEC) 92/117 od 17. decembra 1992. o merama zaštite protiv određenih zoonoza odnosno njihovih uzročnika kod životinja i proizvoda životinjskog porekla radi sprečavanja izbijanja zaraza i infekcija i trovanja hranom, predviđeno je uvođenje sistema praćenja određenih zoonoza i kontrole salmonele, prvenstveno *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium, u jatima živine (*Gallus gallus*) (EEC, 1992b). To je bio prvi korak koji je pravno obavezao članice tadašnje Evropske ekonomske zajednice da moraju da uvedu nacionalne programe kontrole i nadzora za *Salmonella* sojeve. Tom se uredbom od država članica zahteva da Evropskoj komisiji dostave nacionalne mere koje su preduzele radi postizanja ciljeva ove regulative, te da izrade nacionalne programe praćenja salmonele kod živine. Posledično, početkom nadzora nad *Salmonella* sojevima kod živine u pojedinim zemljama EU (prvenstveno Danskoj), javila se potreba za preciznim regulisanjem obaveza i doneta je nova Regulativa EU 2160/2003 od 17. novembra 2003. o kontroli salmonele i drugih određenih uzročnika zoonoza koji se prenose hranom (EC, 2003). Ta regulativa ima za svrhu da osigura sprovođenje primerenih i efikasnih mera za otkrivanje i kontrolu salmonele i drugih uzročnika zoonoza u svim relevantnim fazama proizvodnje, prerade i distribucije, a posebno na nivou primarne proizvodnje, uključujući hranu za životinje, kako bi se smanjila njihova prevalencija pa shodno tome i rizik koji predstavljaju za javno zdravlje.

2.3.1.1. Svrha uspostavljanja programa kontrole

Nacionalnim programima kontrole se: (1) utvrđuje otkrivanje zoonoza i uzročnika zoonoza u skladu sa zahtevima i minimalnim pravilima uzorkovanja propisanih u regulativi EU 2160/2003; (2) definišu odgovornosti nadležnih tela i subjekata u poslovanju sa hranom i hranom za životinje; (3) utvrđuju mere kontrole koje je potrebno preduzeti posle otkrivanja zoonoza i posledica zoonoza, posebno radi zaštite javnog zdravlja, uključujući sprovođenje posebnih mera propisanih u regulativi EU 2160/2003; (4) omogućava procena napretka u skladu sa odredbama programa i utvrđuje kontrola samih programa, posebno na osnovu

rezultata dobijenih otkrivanjem zoonoza i posledica zoonoza; (5) propisuju odredbe o metodama testiranja životinja i jaja za valjanje koji se transportuju unutar područja države, kriterijumima za procenjivanje rezultata tih testiranja i način vršenja službenih kontrola.

Nacionalni programi kontrole obuhvataju minimalno sledeće faze lanca hrane: (1) proizvodnju hrane za životinje; (2) primarnu proizvodnju (uzgoj životinja); (3) klanje, preradu i pripremanje hrane životinjskog porekla.

Trenutno obavezni kontrolni program za *Salmonella* obuhvata sojeve *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* i *S. Hadar*. U tabeli 2.3.1. je prikazano deset najučestalijih *Salmonella* spp. serotipova u životinjskim populacijama, hrani za ljude i stočnoj hrani. Prilikom određivanja serotipova salmonele od značaja za javno zdravlje na koje se primenjuju ciljevi EU, uzimaju se u obzir sledeći kriterijumi: (1) najčešći serotipovi koji su uzročnici salmoneloze ljudi na osnovu podataka prikupljenih putem sistema praćenja (monitoringa) u EU; (2) izvor zaraze (odnosno prisustvo serotipa u određenim populacijama životinja i hrani za životinje); (3) da li neki serotip pokazuje brzu i novu sposobnost širenja i izazivanja bolesti ljudi i životinja; (4) da li neki serotipovi pokazuju povećanu virulenciju, na primer, u pogledu invazivnosti, ili otpornost na odgovarajuće terapije salmoneloze ljudi.

Regulativa EC 2160/2003 nalaže monitoring svih priplodnih (dedovskih i roditeljskih) jata vrste *Gallus gallus*, nosilja, jaja za konzum, brojlera i ćuraka, mesa živine, te shodno sprovođenju kompatibilnih nacionalnih programa uzorkovanja, obezbeđuje relativno uporedive podatke u okviru cele EU. Ova regulativa predviđa i uzorkovanje svinja, tj. priplodnih i tovnih životinja koje se upućuju na liniju klanja ili trupova na liniji klanja.

Sve zemlje članice EU, kao i zemlje kandidati, primenjuju programe kontrole ili nadzora za *Salmonella* sojeve kod različitih vrsta farmskih životinja. Posebno u sprovođenju nacionalnog programa prednjači Danska koja je uspela da joj u 2009. godini prevalencija kod priplodnih jata živine bude 0,82%, u 2010. godini 0,87%, a u 2011. godini 0% (EFSA/ECDC, 2011; 2012; 2013). Danska je prvi program kontrole ili nadzora za *Salmonella* sojeve usvojila 1996. godine, i snažno ga podržala merama potpune nadoknade troškova eliminacije zaraženih jata. Trogodišnji trošak tokom početka programa je bio 188 miliona danskih kruna, i snosio je uništavanje pozitivnih jata, te testiranja stelje, mesa brojlera na liniji klanja i konzumnih jaja. Od početka 2003. godine, troškove monitoringa snosi proizvođač. Danska Uprava za veterinu je zadržala obavezu zadavanja ciljeva i kontrole, dok su regionalne veterinarske institucije i inspekcija dobile pravo uzorkovanja sumnjivih uzoraka i korigovanje odstupanja od smernica programa. Program obuhvata i obavezno testiranje stočne hrane.

Vakcinacija živine nije sprovedena iz razloga potencijalno težeg otkrivanja zaraženih jata, a i cilj je bio eliminacija salmonela pozitivnih zapata, a ne kontrola zaraženog zapata.

2.3.1.2. Rezultati monitoringa *Salmonella* spp. u svinja

Nekoliko članica EU, uglavnom zemlje koje imaju generalno veći problem sa ovim patogenom (na primer, Italija, Španija, Nemačka, Finska, Bugarska, Portugal), vrši aktivan monitoring *Salmonella* u svinja na nivou farme (testiranjem fecesa) i klanice (testiranjem limfnih čvorova) (EFSA/ECDC, 2014).

U slučaju uzorkovanja svinja u periodu 2011-2014. godine, postojale su velike varijacije u pozitivnim nalazima *Salmonella* spp., ne samo među državama (7 država je prijavilo podatke za 2012. godinu, 12 za 2013. godinu i 8 za 2014. godinu), već i prema broju uzorkovanih životinja i vrsti uzorka (feces, brisevi, limfni čvorovi; Nemačka je prijavila tokom 2012. godine 50% od ukupno ispitanih životinja) i mestima uzorkovanja (klanice, farme). Prevalencija *Salmonella* spp. na nivou pojedinačnih životinja bila je 1,2% (0,1% - 25,0%) u 2011. godini, 5,5% (0,1% - 9,7%) u 2012. godini i 8,1% (0% - 100%) u 2013. godini a 7,7% (0% - 34,4%) u 2014. godini. Prevalencija zapata bila je 15,2% (0,2% - 28,8%) u 2011. godni, 17,5% (0% - 33,1%) u 2012. godini, i 14,9% (0% - 52%) u 2013. godini a 10,13% (0% - 27,3%) u 2014. godini, dok je prevalencija po grupama zaklanih životinja u slučaju klanica bila 35,5% u 2011. godini, 29,4% u 2012. godini i 30% u 2013. godini (EFSA/ECDC, 2016; 2015; 2014).

2.3.1.3. Rezultati monitoringa *Salmonella* spp. u mesu i proizvodima od mesa svinja

Kada je reč o mesu svinja i proizvodima od njega, mnogi od nacionalnih monitoring programa za *Salmonella* spp. u svinjskom mesu su bazirani na testiranju mesa iz klanica (obrađeni trupovi) i objekata za rasecanje mesa. Sveukupno, u EU je u 2014. godini 0,75% testiranih uzoraka svinjskog mesa bilo pozitivno na ovaj patogen, dok je 0,7% prerađevina od mesa bilo pozitivno (EFSA/ECDC, 2016). Ipak, važno je napomenuti da se situacija bitno razlikuje među državama članicama, te da ih je samo pet prijavilo podatke. Prisustvo u/na svinjskom mesu u prodaji takođe varira među članicama, ali je uglavnom povezano sa prisustvom na klanici. *S. Typhimurium* (27.8%) i *S. Derby* (24.4%) su najčešće izolovani serovari u svinjskom mesu poslednjih godina u EU (EFSA/ECDC, 2016; 2015) (Tabela 2.3.1).

Tabela 2.3.1. Deset najučestalijih *Salmonella* spp. serotipova u životinjskim populacijama i hrani/stočnoj hrani (EFSA/ECDC, 2015).

Vrsta životinje, kategorija hrane/ stočne hrane	Broj izolata	Broj izolovanih serotipova	Deset najučestalijih <i>Salmonella</i> spp. serotipova ^{(a)(b)}									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Gallus gallus</i> ^(c)	9971	5660	Infantis 22,7%	Mbandaka 14,8%	Enteritidis 11,1%	Thompson 10,6%	Livingstone 4,0%	Typhimurium 3,9%	Kentucky 2,8%	Agona 2,7%	Kedougou 2,7%	Montevideo 2,7%
Brojlari	8622	4613	Infantis 26,0%	Mbandaka 17,3%	Thompson 12,6%	Enteritidis 5,9%	Livingstone 4,4%	Montevideo 3,2%	Kedougou 3,2%	Typhimurium 2,8%	Agona 2,8%	1,3,23:i 2,6%
Meso brojlera	3436	1329	Enteritidis 37,6%	Infantis 37,4%	Kentucky 4,1%	1,4,5,12:i:- 3,5%	Typhimurium 2,6%	Paratyphi B 2,6%	Indiana 1,5%	Virchow 1,3%	Ohio 1,3%	Heidelberg 1,1%
Hrana za <i>Gallus gallus</i>	47	41	Senftenberg 19,5%	Typhimurium 17,1%	Djugu 12,2%	Oranienburg 9,8%	Nyborg 9,8%	1,4,5,12:i:- 7,3%	Montevideo 7,3%	Anatum 4,9%	Hadar 4,9%	Lille 2,4%
Ćurke	2852	1195	Saintpaul 30,9%	Newport 16,2%	Blockley 16,1%	Derby 13,6%	Hadar 3,7%	Infantis 2,3%	Kottbus 2,3%	Kedougou 2,3%	Typhimurium 2,1%	Kentucky 1,7%
Meso ćuraka	495	206	Derby 18,5%	Typhimurium 16,5%	Stanley 13,6%	Kentucky 12,1%	Infantis 9,7%	Newport 6,3%	Saintpaul 6,3%	Bredeney 3,4%	Enteritidis 3,4%	Grampian 2,4%
Svinje	35850	2145	Typhimurium 47,8%	Derby 14,8%	1,4,5,12:i:- 9,8%	Group B 3,7%	4,5,12:i:- 2,5%	Choleraesuis ^(d) 2,5%	4,12:i:- 2,0%	Infantis 1,9%	Group C 1,9%	Enteritidis 1,6%
Meso svinja	1397	706	Typhimurium 30,7%	Derby 27,1%	4,5,12:i:- 6,1%	1,4,5,12:i:- 5,5%	Infantis 3,5%	4,12:i:- 3,5%	Rissen 3,4%	Enteritidis 2,4%	Brandenburg 2,1%	Mono. Typ. 1,1%
Hrana za svinje	32	18	Senftenberg 22,2%	Typhimurium 16,7%	Hadar 11,1%	Enteritidis 11,1%	Enterica 5,6%	Havana 5,6%	Tennessee 5,6%	Montevideo 5,6%	Derby 5,6%	Cerro 5,6%
Goveda	5931	4859	Typhimurium 38,6%	Dublin 29,4%	Group B 8,2%	Agona 5,6%	Give 3,3%	Goldcoast 3,0%	Infantis 2,3%	Group D 1,5%	Group C 1,3%	Enteritidis 1,2%
Meso goveda	181	87	Typhimurium 20,7%	Enteritidis 20,7%	Derby 19,5%	Dublin 9,2%	Altona 4,6%	4,5,12:i:- 4,6%	Newport 4,6%	Infantis 2,3%	Montevideo 2,3%	1,4,5,12:i:- 2,3%
Hrana za goveda	21	11	Infantis 54,6%	Livingstone 9,1%	Typhimurium 9,1%	Loenga 9,1%	Anatum 9,1%	Mbandaka 9,1%				

(a): Procenti su izračunavani u odnosu na ukupan broj izolovanih serotipova za svaku pojedinačnu životinjsku vrstu, hrani/hranivima.

(b): Monofazna varijanta *S. Typhimurium* nije uključena u ukupan broj *S. Typhimurium*, i prikazana je posebno.

(c): Životinjska kategorija *Gallus gallus* uključuje: matična jata, brojlere, koke nosilje.

(d): Variant Kunzendorf

2.3.1.4. Monitoring program *Salmonella* u Republici Srbiji

Republika Srbija je u svoju legislativu uvrstila smernice evropske legislative za stvaranje nacionalnog programa monitoringa *Salmonella* spp., i sprovodi ih kroz „Zakon o veterinarstvu“ (RS, 91/05 i 30/10) i „Pravilnik o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje infekcija živine određenim serotipovima *Salmonella* spp.“ (RS, 7/10 i 76/10), te i pojedinačnim planom aktivnosti za svaku kalendarsku godinu u vidu, na primer, „Pravilnika o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2016. godinu“ (RS, 61/16).

2.3.2 Kontrolne mere u lancu mesa lovne divljači

U EU legislativi, divljač uzgajana u kontrolisanim uslovima (ograda lovišta ili farmski držane divlje životinje) se tretira i podleže kontroli kao i farmske životinje, sa pretpostavkom da će biti transportovane u klanicu i usmrćene u kontrolisanim uslovima. Drugačija situacija je kod klasične lovne divljači, gde je za inspekciju žive životinje zadužen lovac, a trup i iznutrice pregleda kompetentno (obučeno) lice tokom i nakon evisceracije, što je u saglasnosti sa odredbama Komisije *Codex Alimentarius*-a (CAC) (CAC, 2005) i Regulative EC 853/2004 i 854/2004 (EC, 2004a,b). U slučaju trupova sa velikim defektima i trupova koji su došli u objekat za prihvatanje odstreljene od lovaca, odgovorni veterinar je dužan da sprovede pregled baziran na informacijama dobijenim od lovca ili obučenog lica.

Komisija *Codex Alimentarius* (CAC, 2005) u svojim preporukama stavlja težište na higijenu i inspekcijски nadzor odstreljene divljači u harvest fazi lanca mesa (uključujući i transport) kao značajnoj fazi za kontrolu bezbednosti mesa odstreljene divljači. Te preporuke su implementirane i u nacionalne legislative zemalja centralne Evrope, kao na primer u Austriji (Paulsen, 2011).

Mere su u osnovi podeljene u dve grupe: (1) prepoznavanje bolesti i svih velikih promena vizuelnom inspekcijom (u slučajevima jasnih patoloških promena, jake kontaminacije iz sredine ili kada se postavlja sumnja na specifičan biološki hazard, preporučuje se dodatno laboratorijsko testiranje) i (2) primena praktičnih veština i znanja u cilju sprečavanja širenja ili umnožavanja bioloških hazarda (kao *Salmonella* spp.) na/u jestivim tkivima.

Inspekcija mesa koje se danas koristi u osnovi se bazira na procedurama propisanim u regulativi 854/2004 (EC, 2004b). Ove procedure se smatraju za „tradicionalnu“ inspekciju mesa divljači (Paulsen i Smulders, 2004), koja, iako je efikasna za eliminaciju bolesnih životinja i vizuelno kontaminiranih trupova iz lanca mesa divljači, nije u mogućnosti da prepozna asimptomatske životinje nosioce prvenstveno enteričnih patogena, kao što je *Salmonella* spp. (Coburn i sar., 2005). Jedna od mogućih mera koja je predložena za uključanje u inspekciju (osiguranje bezbednosti) mesa divljači uzgajane u kontrolisanim uslovima je razvoj i „harmonizovanih epidemioloških indikatora“ (EFSA, 2013b). Ovi indikatori predstavljaju prevalenciju ili koncentraciju hazarda u određenoj fazi lanca hrane ili indirektno indikatore hazarda (kao što su audit farmi ili ocena higijene procesa proizvodnje) koji su povezani sa rizikom za zdravlje ljudi od tog hazarda (EFSA, 2013b). U slučaju divljih svinja, predloženo je da se razviju indikatori za *Salmonella*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella* i *Mycobacterium*. U pogledu *Salmonella*, predložena su dva indikatora: (i) uzorkovanje fecesa divljih svinja na farmi pre klanja radi ocene statusa farmi i grupa divljih svinja koje idu na klanicu u pogledu infekcije sa *Salmonella*; i (ii) uzorkovanje površine mesa trupova pre hlađenja radi ocene procesne higijene na klanicama i potencijalne izloženosti potrošača kada meso divlje svinje stigne na tržište. Ovi indikatori mogu biti korisni radi kategorizacije farmi i klanica na osnovu prisustva *Salmonella*, odnosno nivoa rizika koji predstavljaju za javno zdravlje, kao i primene odgovarajućih kontrolnih mera da se ti rizici smanje ili eliminišu (EFSA, 2013b).

2.3.2.1. Kontrolne mere u živih divljih svinja

U dostupnoj literaturi u pogledu kontrolnih mera za *Salmonella* spp., ne postoje zvanični programi kontrole ovog patogena u živih divljih svinja, već samo određene preporuke. U praksi moguća je primena nekoliko mera u kontroli zoonotskih agenasa kod divljih životinja, na primer, vakcinacija ili držanje životinja u izolovanim geografskim područjima i izbegavanjem kontakta sa domaćim životinjama (Gortazar i sar., 2007). Regulacija populacije divljih životinja (izbegavanje prenaseljenosti) može doprineti kontroli zaraznih bolesti. Važno je napomenuti da, kada se evisceracija životinja vrši u lovištima na zemlji, iznutrice treba obavezno ukloniti iz lovišta sa ciljem prekidanja lanca prenosa patogena (Gortazar i sar., 2006). Međutim, tradicionalno još uvek postoji praksa ostavljanja iznutrica u lovištu, sa opravdanjem ishrane strvinara (ptica i sisara) i očuvanja njihovih

nagona. Ta praksa se javlja u manjem broju slučajeva i to pretežno u lovištima bez adekvatnog nadzora stručnog lica bez obzira na njegovu veličinu.

Korisniku lovišta je omogućeno kroz zakonske norme da ukoliko se u lovištu poveća brojnost neke lovostajem zaštićene vrste divljači iznad optimalne brojnosti utvrđene planskim dokumentom, da preduzme mere radi uspostavljanja optimalne brojnosti te vrste divljači utvrđene u lovnoj osnovi (RS, 18/10). Sanitarni odstrel lovostajem zaštićene divljači dozvoljen je u vreme kad je lov zabranjen (RS, 18/10), u cilju sprečavanja pojave, širenja i suzbijanja zaraznih bolesti životinja, u skladu sa propisima kojima se uređuje veterinarstvo. Povređenu i bolesnu lovostajem zaštićenu divljač dozvoljeno je odstreliti bez posebnog odobrenja, i u vreme kad je lov zabranjen, u slučajevima kada nije moguće hvatanje radi lečenja i zbrinjavanja divljači. Sanitarni odstrel lovostajem zaštićene divljači vrše isključivo lica koja obavljaju stručne i lovočuvarske poslove u lovištu. Korisnik lovišta, dužan je da odmah po izvršenom sanitarnom odstrelu obavesti nadležnu veterinarsku službu radi veterinarsko-sanitarnog pregleda odstreljene divljači.

Prilikom rukovanja sa divljači, prema pravnoj regulativi Srbije, nalaže se da pre unošenja divljači u lovište mora biti izvršena njena zdravstvena kontrola i obezbeđena odgovarajuća dokumentacija (zdravstveno uverenje i transportna potvrda). Uverenje o zdravstvenom stanju životinje se izdaje od strane nadležne veterinarske stanice, ako je utvrđeno da u mestu porekla životinje ne postoji zarazna bolest koja se može preneti datom vrstom životinje, a transportna potvrda se izdaje za životinje koje napuštaju epizootiološku jedinicu jedino ako je izvršen veterinarsko-sanitarni pregled na mestu utovara (RS, 91/05 i 30/10). Korisnik lovišta dužan je da preduzima mere zaštite zdravlja divljači, kao i druge mere radi sprečavanja pojave i širenja zaraznih bolesti divljači i zoonoza (RS, 18/10).

2.3.2.2. Kontrolne mere tokom lova i odstrela

Ukoliko u lovištu postoje podaci o monitoringu patogena u živih životinja, posebno o prevalenciji *Salmonella* u klinički zdravih divljih svinja, oni bi trebalo da budu osnova razvoja odnosnih programa kontrole sa ciljem smanjenja kontaminacije mesa enteričnim patogenima. Dobra lovna praksa treba da se implementira od premortalne faze, primarno se oslanjajući na postojeća znanja sa aspekta klanja farmskih životinja. Stres životinja pre klanja/odstrela može biti akutan ili prolongiran (hroničan) i može izazvati prelazak mikroorganizama iz digestivnog trakta u jestiva tkiva ili njihovo otpuštanje iz limfnih čvorova

u cirkulatorni sistem. Neophodno je podizanje svesti samih lovaca o neophodnosti smanjenja stresa divljači pre odstrela na najmanju moguću meru (Van Schalkwyk, 2011; Winkelmayr, 2009). Poznato je da je kod veoma uznemirene divljači povećana mogućnost za loš odstrel, iz nemogućnosti adekvatnog pogotka. Takođe, lov životinja sa sobom nosi veliku mogućnost da se još za života rezerve glikogena u mišićima potroše, što rezultira povećanjem pH nivoa u mesu, što kasnije negativno utiče na kvalitet samog mesa (Hofbauer i Smulders, 2011) ali i na mikrobiološki status mesa (Wiklund i Smulders, 2011). Iskustvo i obučenosť lovca su bitan faktor za kvalitetan odstrel (Atanassova *i sar.*, 2008), kao i pravilan odabir tipa puške i vrste municije. Ovo dobija na važnosti posebno u uslovima kada se zna da u lovištu postoje životinje pozitivne na *Salmonella*. U uslovima evropskih lovišta, lovci koji love u pokretu, a pogotovo sa psima, nose povećan rizik od ustreljivanja životinja u regiju abdomena, mada povećanje post-mortalnog pH mesa ne mora uvek da bude povezano sa pojavom DFD mesa (Avagnina *i sar.*, 2009; Deutz *i sar.*, 2006).

2.3.2.3. Kontrolne mere tokom obrade trupova divljih svinja

Poznato je da prelazak digestivnog sadržaja i fecesa u telesne šupljine dovodi do ozbiljne kontaminacije trupova, kako površinske tako i u dubini tkiva (Deutz *i sar.*, 2006; Paulsen *i sar.*, 2003). Praksa je, na primer, u Južnoafričkoj Republici da se trupovi koji imaju ustrelnu ranu na abdomenu ne koriste u izvozu mesa. Evisceracija treba da se uradi tako da sadržaj creva ne dođe u kontakt sa trupom i kontaminira ga, što je nemoguće kod ustrelnih rana u predelu abdomena. U tom slučaju, pristupa se merama za osposobljavanje trupova kao što su uklanjanje dijafragme, pleure i peritoneuma, ispiranje svežom vodom ili čak i uklanjanje subperitonealnog masnog tkiva, što može u određenoj meri da smanji broj mikroorganizama na površini trupa. Evisceracija treba da se izvrši bez odlaganja i to u periodu 30 min do 1 h, a izuzetno do 3 h posle odstrela (Deutz *i sar.*, 2006).

Veoma bitan aspekt kontrole mikrobiološke kontaminacije tokom obrade trupova divljači je i nivo obučenosti radnika iz dobre higijenske prakse. Često se u rukovanju trupovima koriste prevaziđene tradicionalne prakse koje ponekad zanemaruju osnovne higijenske principe, i nisu u skladu ni sa propisima o bezbednosti hrane (Paulsen, 2011).

Takođe, odnos vreme/temperatura od ubijanja do hlađenja ima značajan uticaj na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupova. Paulsen i Winkelmayr (2004) su u istraživanju na divljim papkarima, uključujući i divlje svinje, utvrdili da faza predhlađenja (od oko 12 h)

na ambijentalnoj temperaturi od oko 10°C u odnosu na držanje trupova na 18°C ima bitan uticaj da se prosečni nivo ACC smanji sa 5,7 log₁₀ na prihvatljivih 4,1 log₁₀. U slučaju EBC, ove vrednosti su bile 2,5 log₁₀ i 3,5 log₁₀ za temperature skladištenja trupova na 10°C, odnosno 18°C. Posledično hlađenje u komori na 4°C ima za posledicu zaustavljanje rasta bakterija u toku 96 h. Poznato je da *Salmonella* ne može da raste na mesu na temperaturama nižim od 7°C, pa je to jedna od vrednosti propisanih regulativom za trupove krupne divljači, odnosno do 3°C za iznutrice (EC, 2004b). Međutim, preporučuje se da vreme od odstrela do početka hlađenja bude što kraće i u stvarnosti je prihvatljivo da prođe najviše 12 h (Maahs, 2010; Paulsen i Winkelmayr, 2004).

2.3.2.4. Obeležavanje i stavljanje u promet mesa divljih svinja

Pravna regulativa Republike Srbije (RS, 16/12 i 31/12) uređuje stavljanje u promet ulovljene divljači. Ulovljena divljač i trofeji divljači stavljaju se u promet pod određenim uslovima, prvenstveno uzimajući u obzir mogućnost identifikacije i sledljivosti trupova, kao i njihove bezbednosti za ishranu ljudi što je obaveza veterinarske službe i registrovanih lovnih gazdinstava i objekata za obradu i rasecanje divljači. Način vršenja službene veterinarske kontrole odstreljene divljači i uslovi koji su potrebni da ispune objekti za promet odstreljene divljači precizirani su pravilnikom RS 68/10. Ovim propisom se zahteva da se službena kontrola divljači neposredno posle odstrela vrši u objektima za privremeno skladištenje odstreljene divljači, a u istom objektu može da se vrši i službena kontrola odstreljene divljači poreklom iz susednih lovišta. Službena kontrola može da se vrši i u objektima za obradu i rasecanje mesa divljači ako se oni nalaze u lovištu u kome je divljač odstreljena ili u njegovoj blizini.

Ukoliko se na osnovu izvršene službene kontrole i izjave utvrdi da su meso i organi divljači posle odstrela bezbedni za ishranu ljudi izdaje se „Potvrda o bezbednosti mesa i organa divljači za ishranu ljudi“. Skidanje kože i rasecanje divljači nije dozvoljeno na mestu odstrela. Prilikom prevoza do objekta u kome se vrši službena kontrola mora se izbegavati nagomilavanje odstreljene divljači u prevoznom sredstvu. Takođe, meso divljih svinja mora da se pregleda na larve *Trihinela* spp., isključivo metodom veštačke digestije (RS, 61/16).

2.3.3. Mikrobiološki kriterijumi za meso

2.3.3.1. Opšti principi i uspostavljanje mikrobioloških kriterijuma

Komisija *Codex Alimentarius*-a, mikrobiološki kriterijum za hranu definiše kao *prihvatljivost proizvoda ili serije proizvoda na osnovu odsustva, prisustva ili broja mikroorganizama uključujući parazite i/ili količinu njihovih toksina/metabolita u jedinici mase, zapremine, površine ili serije* (CAC, 1997).

2.3.3.1.1. Razlozi za uspostavljanje i svrha mikrobioloških kriterijuma

Savremeni mikrobiološki kriterijumi za hranu određeni su na osnovu opštih načela međunarodnih standarda i smernica o bezbednosti hrane (npr. Komisije *Codex Alimentarius*), zaključaka koje je sastavio Naučni odbor za veterinarske mere u javnom zdravstvu (Scientific Committee on Veterinary measures relating to Public Health - *SCVPH*, 1997), kao i na osnovu analize rezultata primene prethodnih propisa o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu. Glavni razlozi za uspostavljanje trenutno važećih mikrobioloških kriterijuma za hranu su uglavnom bili zasnovani na činjenici da prethodni kriterijumi i testiranja hrane nisu doprinosili zaštiti zdravlja potrošača niti su bili zasnovani na naučnim principima ocene mikrobioloških rizika (CAC, 1997).

S obzirom da se moderni pristup bezbednosti hrane zasniva na preventivnom pristupu u oceni rizika i njihovoj kontroli kao i odgovornosti proizvođača za bezbednost hrane koju proizvodi, mikrobiološki kriterijumi služe i kao objektivna ocena procesa proizvodnje hrane kao i finalnog proizvoda u prometu. Svrha mikrobioloških kriterijuma uključuje nekoliko aspekata (CAC, 1997): (1) procenu specifične šarže hrane kako bi se utvrdila njena prihvatljivost; (2) verifikaciju sistema bezbednosti hrane (npr. HACCP sistema); (3) proveru mikrobiološkog statusa hrane u odnosu na zadate kriterijume performanse industrije hrane; (4) proveru da li izabrane kontrolne mere ispunjavaju zadatke performanse (*POs*) i/ili zadatke bezbednosti hrane (*FSOs*); i (5) pružanje informacija proizvođaču o mikrobiološkim nivoima, koji bi trebalo da budu postignuti prilikom primene najbolje prakse.

2.3.3.1.2. Opšti principi mikrobioloških kriterijuma

Mikrobiološki kriterijumi su zasnovani na nekoliko principa (CAC, 1997): (1) treba da adekvatno zaštite zdravlje potrošača i po potrebi, takođe obezbede fer praksu u trgovini hranom; (2) treba da budu praktični, primenjivi i uspostavljeni samo kada je to neophodno;

(3) njihovo uspostavljanje treba da se zasniva na naučnim podacima i na osnovu poznavanja mikroorganizama i njihovog ponašanja duž lanca ishrane; (4) način upotrebe finalnog proizvoda od strane potrošača mora se uzeti u obzir pri njihovom uspostavljanju; i (5) mikrobiološke kriterijume povremeno treba proveravati kako bi se osiguralo da i dalje budu relevantni za navedenu svrhu u trenutnim uslovima.

2.3.3.1.3. Uspostavljanje i uvođenje u legislativu mikrobioloških kriterijuma

Mikrobiološki kriterijumi mogu široko da se razlikuju po prirodi ili podudarnosti, u zavisnosti od namene i tačke primene u lancu ishrane, međutim, gde god i u koju god svrhu su predviđeni, oni treba da budu uspostavljeni sa određenom logikom i doslednosti u pristupu. Danas se mikrobiološki kriterijumi uspostavljaju na osnovu politike bezbednosti hrane koji neka država (ili zajednica država) sprovodi. Uspostavljanje svakog kriterijuma se sagledava kroz naučne činjenice, ali samu primenu i uvođenje diktira i spremnost industrije da ga prihvati, uključujući tu i praktičnost primene.

Poštovanje mikrobioloških kriterijuma za hranu je obavezno za sve subjekte koji se bave hranom prema Regulativi (EC) 854/2004 (EC, 2004b), a sami kriterijumi su bliže definisani dodatnim dokumentima Regulativom (EC) 2073/2005 (EC, 2005) i Regulativom (EC) 1441/2007 (EC, 2007), kao i sa nekoliko skorijih amandmana koji se specifično odnose na *Salmonella* spp., (EC) 1086/2011 (EC, 2011) i (EC) 217/2014 (EC, 2014). Ovi kriterijumi predstavljaju smernice za prihvatljivost hrane i procesa njene proizvodnje, rukovanja i distribucije, te treba da budu sastavni deo primene procedura zasnovanih na HACCP-u i drugim higijenskim kontrolnim merama, kao deo njihove verifikacije.

U Republici Srbiji, Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (RS, 72/10), je usklađen sa Regulativom (EC) 2073/2005 u kojoj su utvrđeni mikrobiološki kriterijumi zasnovani na oceni rizika bitnih za zaštitu potrošača.

2.3.3.2. Tipovi mikrobioloških kriterijuma koji se primenjuju u EU i Republici Srbiji

Prema Regulativi EU 2073/2005 (EC, 2005), odnosno i posledično usaglašenoj legislativi Srbije, uvedene su dve vrste mikrobioloških kriterijuma: kriterijum bezbednosti hrane (Food Safety Criteria, *FSC*) i kriterijum procesne higijene (Proces Hygiene Criteria, *PHC*).

Glavna svrha postavljanja ovih kriterijuma u navedenoj Regulativi EU je unapređenje bezbednosti potrošača i harmonizacija kriterijuma među članicama EU kako bi se olakšala međunarodna trgovina. Sa aspekta bezbednosti mesa, cilj uvođenja mikrobioloških kriterijuma je i smanjivanje broja slučajeva ljudi obolelih od salmoneloze poreklom od sirove hrane koja se termički obrađuje, a kada su u pitanju druge vrste hrane spremne za konzumiranje i smanjivanje oboljenja izazvanih sa *Listeria monocytogenes*, stafilokoknim enterotoksinima i drugim patogenima.

Mikrobiološki kriterijumi su korisni/neophodni za ispravnu verifikaciju procesa i procedura zasnovanih na HACCP-u, kao i drugih higijenskih kontrolnih mera. Između ostalog, mikrobiološki kriterijumi se i koriste za procenu prihvatljivosti proizvedene serije hrane. U EU legislativi navodi se da se koriste i kao način komunikacije o nivou kontrole hazarda koji treba da se postigne. Ispunjavanje mikrobioloških kriterijuma nudi neku vrstu garancije da patogeni nisu prisutni u neprihvatljivo visokim koncentracijama, ali svakako ne garantuje njihovo odsustvo (EFSA, 2007).

2.3.3.2.1. Kriterijum bezbednosti hrane

Kriterijum bezbednosti hrane jeste kriterijum koji se primenjuje da se oceni prihvatljivost/bezbednost proizvoda ili proizvodne partije stavljene u promet. Ovaj kriterijum (Tabela 2.3.2) se primenjuje na proizvode tokom roka upotrebe, a ukoliko je rezultat testiranja proizvoda nezadovoljavajući u odnosu na kriterijum, subjekt ne može da stavi takav proizvod na tržište ili, ako je proizvod već na tržištu, on mora da ga povuče ili opozove sa tržišta.

U takvim slučajevima treba da budu preispitani postupci za upravljanje bezbednošću hrane, kako bi se osiguralo da će proizvod ubuduće biti usaglašen sa mikrobiološkim kriterijumima. Kriterijumi bezbednosti hrane primenjuju se i na proizvode pri uvozu i izvozu hrane i pri sprovođenju nacionalnih programa monitoringa mikrobiološke ispravnosti hrane na tržištu.

Tabela 2.3.2. Kriterijumi bezbednosti hrane koji se odnose na *Salmonella* (EC 2073/2005; EC 1441/2007; Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (RS, 72/10)).

Kategorija hrane (meso)	Mikroorganizmi	Plan uzorkovanja		Granične vrednosti		Referentna metoda ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primenjuje
		n	c	m	M		
Mleveno meso i poluproizvodi od mesa, namenjeni da se jedu sirovi	<i>Salmonella</i>	5	0	odsustvo u 25 g		EN/ISO 6579	proizvod plasiran na tržište za vreme roka upotrebe
Mleveno meso i poluproizvodi od mesa napravljeni od živinskog mesa, namenjeni da se jedu posle kuvanja	<i>Salmonella</i>	5	0	odsustvo u 25 g		EN/ISO 6579	proizvod plasiran na tržište za vreme roka upotrebe
Mleveno meso i poluproizvodi od mesa napravljeni drugih vrsta mesa sem živinskog, namenjeni da se jedu posle kuvanja	<i>Salmonella</i>	5	0	odsustvo u 10 g		EN/ISO 6579	proizvod plasiran na tržište za vreme roka upotrebe
Mehanički separisano meso	<i>Salmonella</i>	5	0	odsustvo u 10 g		EN/ISO 6579	proizvod plasiran na tržište za vreme roka upotrebe
Proizvodi od mesa namenjeni da se jedu sirovi (isključujući proizvode kod koji proizvodni proces ili sastav proizvoda eliminišu rizik od <i>Salmonella</i>)	<i>Salmonella</i>	5	0	odsustvo u 25 g		EN/ISO 6579	proizvod plasiran na tržište za vreme roka upotrebe
Proizvodi od živinskog mesa namenjeni da se jedu posle kuvanja	<i>Salmonella</i>	5	0	odsustvo u 25 g		EN/ISO 6579	proizvod plasiran na tržište za vreme roka upotrebe

n=broj jedinica koje čine uzorak; c=dozvoljen broj jedinica uzorka koje ne ispunjavaju graničnu vrednost

2.3.3.2.2. Kriterijum procesne higijene

Kriterijum higijene u procesu proizvodnje jeste kriterijum koji treba da ukaže na prihvatljivost načina kojim se obavlja postupak proizvodnje odnosno pravilno funkcionisanje tog procesa. Ovaj kriterijum nije primenljiv za proizvode iznete na tržište, a određuje vrednosti kontaminacije iznad kojih je neophodno sprovesti korektivne mere radi očuvanja higijene procesa u skladu sa zakonom o hrani. Ako kriterijum procesne higijene (Tabela 2.3.3) nije zadovoljen, treba da se preispitaju procedure proizvodnje hrane koje se primenjuju, primene korektivne mere, a kao rezultat tih aktivnosti, poboljša higijena procesa proizvodnje.

Tabela 2.3.3. Kriterijum higijene u procesu proizvodnje za meso i proizvode od mesa (EC 2073/2005; EC 1441/2007; EC 1086/2011; EC 217/2014; Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (RS, 72/10)).

Kategorija hrane	Mikroorganizmi	Plan uzorkovanja		Granične vrednosti		Referentni metod ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primenjuje	Mera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
		n	c	m	M			
Trupovi goveda, ovaca, koza i konja	Broj aerobnih kolonija			3,5 log cfu/cm ² dlsv	5,0 log cfu/cm ² dlsv	EN ISO 4833	Trupovi posle obrade, ali pre hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrole procesa
	<i>Enterobacteriaceae</i>			1,5 log cfu/cm ² dlsv	2,5 log cfu/cm ² dlsv	EN ISO 21528-2		
Trupovi svinja	Broj aerobnih kolonija			4,0 log cfu/cm ² dlsv	5,0 log cfu/cm ² dlsv	EN ISO 4833	Trupovi posle obrade, ali pre hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrole procesa
	<i>Enterobacteriaceae</i>			2,0 log cfu/cm ² dlsv	3,0 log cfu/cm ² dlsv	EN ISO 21528-2		
Trupovi goveda, ovaca, koza i konja*	<i>Salmonella</i>	50**	2***	Ne sme biti na ispitivanom području trupa		EN/ISO 6579	Trupovi posle obrade, ali pre hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrole procesa i porekla životinja
Trupovi svinja*	<i>Salmonella</i>	50**	3***	Ne sme biti na ispitivanom području trupa		EN/ISO 6579	Trupovi posle obrade, ali pre hlađenja	Poboljšanje higijene klanja, preispitivanje kontrole procesa, porekla životinja i biosigurnosnih mera na farmama porekla
Trupovi živine-brojlera i ćuraka*	<i>Salmonella</i>	50**	5***	Ne sme biti na ispitivanom području trupa		EN/ISO 6579	Trupovi posle hlađenja	Poboljšanje higijene klanja, preispitivanje kontrole procesa, porekla životinja i biosigurnosnih mera na farmama porekla
Usitnjeno meso i mehanički separisno meso	Broj aerobnih kolonija #	5	2	5x10 ⁵ cfu/g	5x10 ⁶ cfu/g	EN ISO 4833	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje i poboljšanje izbora i/ili porekla sirovina
	<i>E. coli</i> ##	5	2	50 cfu/g	500 cfu/g	EN ISO 16649 -1 ili -2		
Poluproizvodi od mesa	<i>E. coli</i> ##	5	2	500 cfu/g	5000 cfu/g	EN ISO 16649 -1 ili -2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje i poboljšanje izbora i/ili porekla sirovina

dlsv = dnevne srednje log vrednosti

n=broj jedinica koji čini uzorak

c=broj jedinica uzorka čije su vrednosti između m i M

*= u ovom slučaju m=M

Limiti (m i M) se odnose na uzorke uzete destruktivnim metodom. Dnevna srednja logaritamska vrednost (dlsv) se racuna tako što se prvo rezultat svakog individualnog testa prevede u logaritamsku vrednost pa onda se izracuna sredina logaritamskih vrednosti.

**50 uzoraka se dobija od 10 uzastopnih sesija uzorkovanja u skladu sa pravilima u ucestalošću uzorkovana navedenih u Regulativi 2073/2005

***broj uzoraka gde je detektovana *Salmonella*. U Srbiji, limit za meso svinja je 5/50 trupova

#Ovaj kriterijum se ne odnosi na mleveno meso koje je napravljeno na nivou prodaje kada je rok upotrebe ovog proizvoda manji od 24h

##*E. coli* kao indikator fekalne kontaminacije

2.3.3.3. Elementi mikrobioloških kriterijuma

Mikrobiološki kriterijum se sastoji od specifičnijih elemenata kao što su: mikroorganizam(i) i razlog za njegov izbor, svrha mikrobiološkog kriterijuma, vrsta hrane, proces ili kontrolni sistem bezbednosti hrane na koji se mikrobiološki kriterijum primenjuje, analitički metod, plan uzorkovanja, mikrobiološki limit(i), specifična tačka u lancu hrane gde se limiti primenjuju, broj analitičkih jedinica koji bi trebalo da potvrdi limite i korektivne akcije koje treba preduzeti kada kriterijum nije zadovoljen.

2.3.3.3.1. Plan uzorkovanja

Planovi uzorkovanja su razvijeni od strane ICMSF (*ICMSF*, 1986). Plan uzorkovanja se bazira na konceptu verovatnoće i može definisati verovatnoću otkrivanja mikroorganizma (ili grupe mikroorganizama) u namirnici ili limit da se navedena koncentracija mikroorganizama ne prelazi. Glavna prednost korišćenja plana uzorkovanja je da je statistički zasnovan i pruža jedinstvenu osnovu za prihvatanje šarže hrane u odnosu na definisani kriterijum. Statistički zasnovan plan uzorkovanja je kombinacija izbora procedure uzorkovanja i kriterijuma za odlučivanje koji se primenjuju na proizvodnoj partiji (šarži), na osnovu ispitivanja propisanog broja uzoraka sa definisanim metodama.

Postoje dve vrste široko prihvaćenih planova uzorkovanja, *dvoklasni plan* (npr. $n=5$, 10, 15, 20 ili više, i c obično = 0) i *troklasni plan* (npr. $n=5$, $c=2$, $m=10^3$, $M=10^4$) kao što je definisano od strane ICMSF (1986) gde je: n =broj uzoraka pregledanih iz šarže; m =mikrobiološki limit u planu dve klase razdvaja zadovoljavajući kvalitet od neprihvatljivog kvaliteta i u planu tri klase odvaja zadovoljavajući kvalitet od marginalno prihvatljivog kvaliteta; M = mikrobiološki limit koji u planu tri klase razdvaja marginalno prihvatljiv kvalitet od nezadovoljavajućeg kvaliteta; c =maksimalno dozvoljen broj neispravnih uzoraka jedinica (dvoklasni plan) ili marginalno prihvatljivih uzorka jedinica (troklasni plan).

Dvoklasni plan se u suštini koristi za patogene i/ili gde treba izvesti test na prisustvo/odsustvo, dok se *troklasni plan* uobičajeno koristi za ispitivanje higijenskih indikatora gde je moguće brojanje mikroorganizama u jedinici zapremine ili mase.

Nijedan praktičan plan uzorkovanja ne može da osigura odsustvo ciljnih mikroorganizama i da koncentracija mikroorganizama ne bude prekoračena u proizvodnoj partiji (šarži) iz koje nije uzorkovana. Pored toga, verodostojnost rezultata ispitivanja će zavisiti od broja uzorka/jedinica testiranja, da li postoji homogena distribucija patogena u

šarži, da li se uzorkovanje vrši nasumično i da li je metod za testiranje osetljiv i specifičan. Na primer, testiranje pet slučajno uzetih uzoraka, sa potvrdom negativnog nalaza, daje 95% verovatnoće da je šarža hrane manje od 50% kontaminirana. Testiranje 30 slučajno uzetih uzoraka, sa potvrdom negativnog nalaza, pokazuje da je šarža hrane manje od 10% kontaminirana. Ispitivanje 300 nasumično uzetih uzoraka, sa potvrdom negativnog nalaza, znači da je šarža hrane <1% kontaminirana (na nivou poverenja od 95%) (ICMSF, 1986), pretpostavljajući 100% osetljivost i specifičnost.

Namirnice sa visokim stepenom kontaminacije mogu da se otkriju ovim pristupom, dok u slučaju kada je prevalencija mikroorganizma veoma niska (<5%) broj uzoraka potrebnih za otkrivanje kontaminirane serije je veoma visok i često nepraktičan za testiranje. Važno je da se naglasi da nijedan plan uzorkovanja ne može da osigura odsustvo patogena iz namirnice, odnosno ne može da osigura sigurnu detekciju patogena ako su prisutni u hrani zbog veličine/broja uzorka, osetljivosti testa ili tehnike/uslova uzorkovanja.

2.3.3.3.2. Tumačenje rezultata mikrobiološkog ispitivanja hrane

U skladu sa propisanim mikrobiološkim kriterijumima, postoje dve mogućnosti tumačenja rezultata dobijenih mikrobiološkim ispitivanjem uzoraka hrane (EC 2073/2005; 1441/2007; RS, 72/10).

1. Kada je u mikrobiološkom kriterijumu (Tabela 2.3.2) data jedna granična vrednost, odnosno kada se primenjuje *dvoklasni plan* i kada je $m=M$, a rezultati ispitivanja mogu biti zadovoljavajući ili nezadovoljavajući. Ovakva granična vrednost i interpretacija rezultata uglavnom se primenjuje za *kriterijume bezbednosti hrane*. Na primer, ako su dokazane *Salmonella* vrste u 25g u jednoj odnosno više jedinica uzorka, onda se cela šarža smatra nezadovoljavajućom i mora se povući sa tržišta (Tabela 2.3.2).

2. Kada su u mikrobiološkom kriterijumu (Tabela 2.3.3) date dve granične vrednosti (m i M), odnosno kada se primenjuje *troklasni plan*, tada se dobijeni rezultati ispitivanja mogu interpretirati kao zadovoljavajući, marginalno prihvatljivi ili nezadovoljavajući. Dve granične vrednosti i tri moguće interpretacije rezultata uobičajene su za *kriterijume procesne higijene*. Na primer, (i) u slučaju ACC i broja *Enterobacteriaceae* na trupovima domaćih životinja za klanje: zadovoljavajuće ako je dnevna srednja log vrednost $\leq m$; marginalno prihvatljivo ako je dnevna srednja log vrednost između m i M ; nezadovoljavajuće ako je dnevna srednja log vrednost $> M$; (ii) u slučaju *Salmonella* na trupovima: zadovoljavajuće ako je prisustvo detektovano u maksimalno c od n uzoraka; nezadovoljavajuće ako je

prisustvo detektovano u više od c od n uzoraka (nakon svake sesije uzorkovanja, rezultat od poslednjih 10 sesija se uzima u cilju određivanja n broja uzoraka).

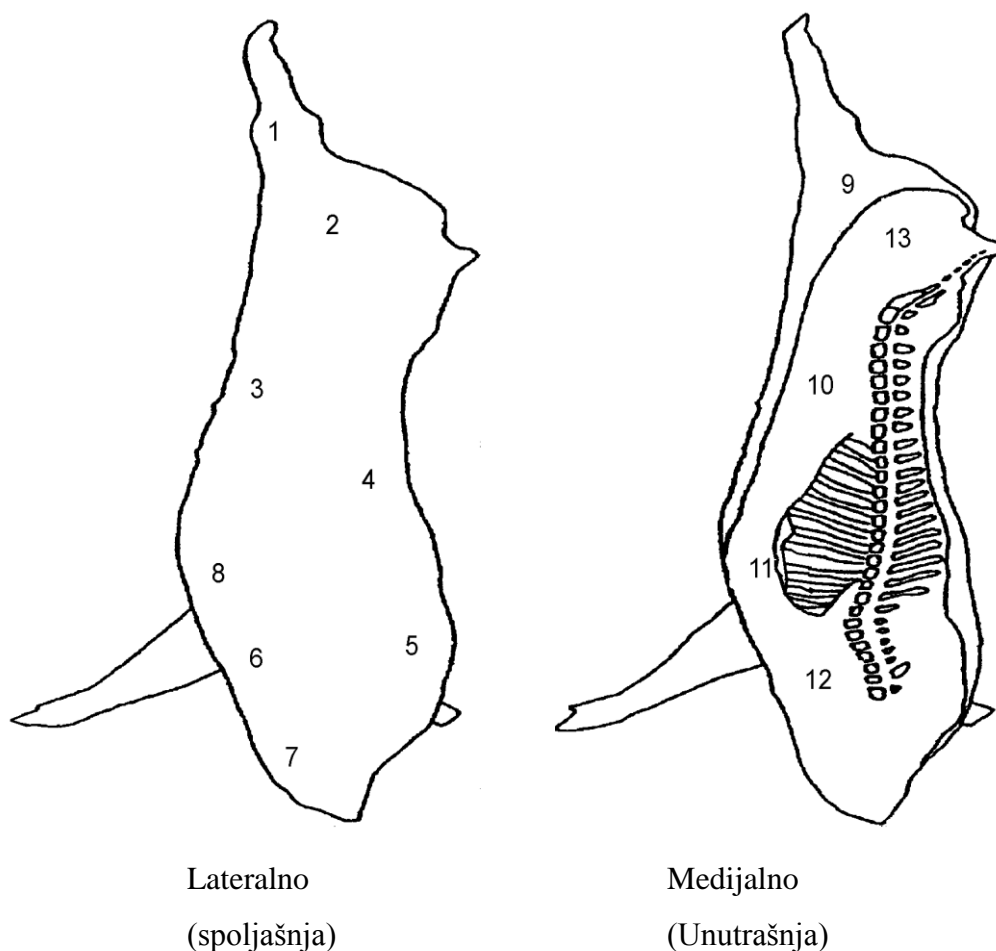
2.3.3.3.3. Tehnike uzorkovanja trupova na liniji klanja

Prilikom uzimanja uzoraka (EC 2073/2005; EC 1441/2007; RS, 72/10), izbora mesta za uzorkovanje i načina skladištenja i transporta uzoraka primenjuju se destruktivne i nedestruktivne metode uzimanja uzoraka iz standarda ISO 17604:2003 (ISO, 2003). Metoda uzorkovanja su propisane za domaće životinje za klanje, dok u slučaju divljih životinja ne postoje standardne procedure.

Tokom svakog uzorkovanja uzorci se uzimaju sa pet slučajno odabranih trupova. Mesta sa kojih se uzorci uzimaju određuju se prema tehnologiji klanja koja se koristi u objektu za klanje. Kada se uzorkovanje vrši u cilju ispitivanja prisustva *Salmonella* spp., koristi se metoda uzimanja uzorka sa abrazivnim sunderom. Površina uzimanja uzorka obuhvata najmanje 400 cm² po odabranom mestu uzimanja uzorka. Kada se uzorci uzimaju sa različitih mesta na trupu, potrebno je napraviti zbirni uzorak pre ispitivanja. Na slici 1 su prikazana moguća mesta uzorkovanja površine trupa svinje, a mesta koja su najčešće kontaminirana velikim brojem mikroorganizama su: donji deo buta, lateralno (oznaka 1 na slici), but, lateralno (oznaka 2), potrbušina (oznaka 3), sredina leđa (oznaka 4), potrbušina, medijalno (oznaka 10). U slučaju uzorkovanja mesa trupova divljih svinja nakon završene evisceracije dok su trupovi još uvek u koži, uzorkovanje površine mesa trupova je jedino moguće sa medijalne strane, odnosno odabirom mesta 10-13 na slici 1.

Kada se uzorkovanje vrši za ispitivanje prisustva *Enterobacteriaceae* i broja aerobnih bakterija, uzorci se uzimaju sa četiri mesta sa svakog trupa. Destruktivnom metodom uzimaju se sa svakog trupa četiri uzorka tkiva sa ukupno 20 cm². Kada se za uzorkovanje koristi nedestruktivna metoda, površina na kojoj se uzorkovanje vrši treba da obuhvati najmanje 100 cm² (50 cm² sa trupova malih preživara) po mestu uzimanja uzorka.

Prema Regulativi (EU) 2073/2005, rezultati ispitivanja prisustva *Salmonella* spp. na trupovima odnose se na 50 uzoraka prikupljenih u 10 serija uzastopnog uzorkovanja (5 uzoraka u svakoj seriji). Procena rezultata uzastopnog uzorkovanja radi se na principu pomičnog okvira (eng. "rolling window"), to znači da se od 5 uzetih uzoraka u svakoj nedelji, posle 10 uzastopnih nedelja i ispitivanja, procenjuje serija od 50 uzetih uzoraka/rezultata. Druga serija uzorkovanja obuhvata uzorke uzete u intervalu od 2. do 11. nedelje, (zanemaruje se 5 uzoraka iz prve nedelje, a priključuje se 5 uzoraka iz 11. nedelje), i tako redom (pomični okvir koji obuhvata 10 uzastopnih nedelja).



Slika 1. Moguća mesta za uzimanje uzoraka sa trupova svinja (prilagođeno od BS ISO 17604:2003).

Granične vrednosti za broj aerobnih kolonija i broj *Enterobacteriaceae* date su u regulativi za destruktivnu metodu uzorkovanja i to kao logaritam dnevnog proseka koji se izračunava iz logaritamskih vrednosti rezultata pojedinačnih ispitivanja. Za nedestruktivnu metodu uzorkovanja sa trupova, ne postoje regulativom definisani kriterijumi, pa se uglavnom koriste vrednosti niže i do 20%. Ovo smanjenje je rezultat različitih studija u kojim je utvrđeno da su rezultati dobijeni destruktivnom metodom veći i za ACC i broj *Enterobacteriaceae* u odnosu na nedestruktivnu metodu (Hutchison *i sar.*, 2005; Pepperell *i sar.*, 2005). Destruktivna metoda oštećuje trup ali obuhvata sve prisutne mikroorganizme, dok metoda brisevima zadovoljava estetske zahteve industrije mesa ali je podložna velikim varijacijama (usled sastava sušera, sposobnosti apsorbacije i veštini lica koje uzorkuje), što doprinosi nekonzistentnosti rezultata analiza.

2.3.3.4. Problemi sa trenutnim EU mikrobiološkim kriterijumima za hranu

U slučaju patogena koji imaju nisku učestalost u proizvodnim šaržama hrane postoji visok rizik od njihovog nedetektovanja u kontaminiranim šaržama (ICMSF, 2009) i u tim slučajevima je efikasnost FSC i PHC u verifikaciji proizvodnog procesa i zaštiti potrošača niska. Primarni razlog zbog kojeg je Naučni komitet za veterinarske mere koje se odnose na javno zdravlje (SCVPH, 2003) smatrao da nije podesno da se ustanove mikrobiološki kriterijumi za patogene *E. coli* (npr. *E. coli* O157:H7) jeste njihova niska prevalencija u hrani i složene metode izolacije. Usled statističkih ograničenja planova uzorkovanja, samo mikrobiološko testiranje može da pruži lažan osećaj sigurnosti, osim ako se dovoljan broj uzoraka testira u određenom vremenu (EFSA, 2007).

Većina FSC je bazirana na dvoklasnim planovima uzorkovanja sa 5 ili 10 testiranih jedinica po uzorku. Regulativa EC 2073/2005 ne propisuje frekvencije uzorkovanja/testiranja osim za mleveno meso, mehanički separisano meso i poluproizvode od mesa. Dok ovo pruža fleksibilnost u intenzitetu testiranja u skladu sa rizikom, takođe ostavlja mogućnost nekonzistentnosti u testiranju i kontroli. Nije moguće kvantitativno povezati FSC sa rizikom (EFSA, 2007). Da bi se ustanovila takva veza, neophodno je prvo odrediti frekvencije uzorkovanja i zadovoljenje mikrobioloških kriterijuma.

Kriterijumi procesne higijene ukazuju na prihvatljivo funkcionisanje proizvodnog procesa i postavljaju indikativni nivo kontaminacije iznad kog se zahtevaju korektivne mere u cilju održavanja higijene procesa, a sve u skladu sa zakonom o hrani. Međutim, glavni nedostatak je zbog činjenice da su vrednosti kontaminacije u većini slučajeva primenjive samo na proizvod na kraju proizvodnog procesa i da one nisu vezane za vrednosti inicijalne kontaminacije sirovina na nivou određenog proizvođača. Priroda PHC-a je slična takozvanom kriterijumu „finalnog proizvoda“, drugim rečima, većina zadatih PHC-a u stvari ne obezbeđuje informaciju o odnosu inicijalne naspram finalne kontaminacije u procesu, već samo o rezultatu procesa (Blagojevic *i sar.*, 2011). Ovo može biti i prednost i mana zavisno da li je svrha da se mikrobiološki karakteriše sam proces ili da se mikrobiološki karakteriše samo status finalnog proizvoda. Sami PHC nisu dovoljni da karakterišu prihvatljivost procesa, već je njihova uloga da budu integralni deo verifikacije procedura zasnovanih na HACCP-u. Iz razloga pomenutih ograničenja korišćenja mikrobioloških kriterijuma jasno je da primena mikrobiološkog, samog za sebe, testiranja nikada ne može da garantuje bezbednost hrane. Bezbednost hrane može da se principijelno osigura strukturiranim, preventivnim pristupom - primenom dobre higijenske prakse i HACCP principa (EC, 2005).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Ocena sadašnjeg stanja nauke i prakse u oblasti epidemiologije i kontrole *Salmonella enterica* u lancu mesa divlje svinje

Salmonella enterica je patogen od najvećeg značaja u bezbednosti mesa, kako domaće tako i divlje svinje. Mikrobiološki status mesa divljači, u odnosu na indikatore opšte i fekalne kontaminacije (ukupan broj bakterija i broj *Enterobacteriaceae*), i na prisustvo patogenih bakterija (*Salmonella* spp.), ispitivan je u malom broju studija. Utvrđena prevalencija salmonele u nekim istraživanjima je iznosila i do 23% u fecesu divljih svinja, odnosno 7% na mesu trupova i 12% u tonzilama. *Salmonella* je u divljih životinja, a posebno krupne divljači, tradicionalno predstavljena sa sojem Typhimurium, ali je tokom poslednje dve decenije iz divljih životinja izolovano dosta drugih sojeva, na primer *S. Enteritidis*, Typhimurium, Infantis, Hadar, Veneziana i Stourbridge. Međutim, postoje znatne razlike u prevalenciji i prisustvu određenih sojeva salmonele u različitim regionima ili zemljama. U cilju potvrđivanja prisustva antitela na *Salmonella* spp., odnosno seroprevalencije, u pojedinim istraživanjima je utvrđeno da čak i do 66,5% svinja može biti izloženo ovom patogenu u nekoj fazi svog života, što ukazuje na visoku učestalost kontakta divljih svinja sa ovim patogenom. Opisani su razni mogući putevi prenosa *Salmonella* spp. ka ljudima u kojim divljač može biti uključena: (1) putem kontakta divljih životinja sa domaćim životinjama, direktno ili preko vektora; (2) direktnim kontaktom sa ljudima; (3) putem mesa divljih životinja; i (4) putem kontaminacije ostale hrane i vode. Glavni izvor kontaminacije mesa je feces, a posledično i koža divljači. Takođe, veoma su značajni i prirodni izvori infekcije, kao što su druge divlje ili domaće životinje o čemu u Srbiji nema podataka.

U Srbiji je meso divlje svinje najčešće konzumirana vrsta mesa divljači; stoga je neophodno da se odredi koliko često je prisutna *Salmonella enterica* u ovoj vrsti mesa odnosno koliki je stepen izloženosti potrošača. Takođe, u Srbiji ne postoje vodiči za dobru praksu postupanja sa životinjama za odstrel kao i za rukovanje mesom nakon odstrela, sa aspekta higijenske prakse i bezbednosti tog mesa. Da bi se kontaminacija mesa salmonelom uspešno kontrolisala, dobra higijenska praksa mora da bude ispoštovana tokom celog procesa lova i obrade divljači. Uslov da se primene kontrolne mere u cilju redukcije prisustva patogena u mesu su postojanje podataka o prevalenciji, glavnim izvorima kontaminacije mesa i faktorima koji na to utiču. Prethodno pilot istraživanje je obezbedilo prve detaljnije naučne podatke o kvantitetu, prirodi i distribuciji mikrobiote na koži i mesu trupova divljih svinja u

Srbiji, ukazujući da koža i feces divljih svinja potencijalno predstavljaju izvor mikrobiološke kontaminacije mesa trupova (Mirčeta, 2013). Drugi faktori koji dodatno utiču na ovo, kao što su način odstrela i metode obrade trupova nisu detaljno ispitivani.

Jedan od dodatnih aspekata u osiguranju bezbednosti mesa divljači je objektivna ocena procesa proizvodnje ovog mesa u relevantnim fazama, definisanjem i uvođenjem jasnih mikrobioloških kriterijuma. Razumevanje stepena mikrobiološke kontaminacije mesa divlje svinje može doprineti definisanju mikrobioloških kriterijuma za meso divljači, koji trenutno ne postoje, a čije određivanje bi bilo korisno za unapređenje bezbednosti ove vrste mesa.

3.2. Radna hipoteza

Glavni cilj istraživanja je da se potvrdi ili odbaci sledeća radna hipoteza:

- Meso trupova divlje svinje je mikrobiološki visoko kontaminirano, uključujući i prisustvo vrste *Salmonella enterica* u lancu mesa divlje svinje u nivou preko 5%. Faktori koji utiču na pojavu ovog patogena u lancu mesa divlje svinje su najčešće povezani sa kontaktom sa domaćim životinjama rezervoarima infekcije.

3.3. Zadaci rada

Glavni cilj istraživanja je da se utvrdi i oceni prisustvo i raširenost *Salmonella enterica* u lancu mesa divlje svinje u lovištima u Srbiji i faktora koji utiču na njeno prisustvo kao i na opšti mikrobiološki status mesa trupova divlje svinje. Dobijeni podaci će biti korišćeni u svrhu definisanja efikasnih kontrolnih mera za ovaj patogen.

U cilju potvrđivanja ili odbacivanja radne hipoteze, bilo je potrebno da se obave istraživanja sa sledećim zadacima:

- utvrđivanje prisustva i karakterizacija *Salmonella enterica* serotipova u lovištima u Srbiji, kao i njene distribucije, na mesu trupova, koži, u fecesu i mezenterijalnim limfnim čvorovima;
- ocenjivanje individualnih faktora koji utiču na raširenost *Salmonella enterica* kod divljih svinja u lovištima u Srbiji;

- identifikacija izvora infekcije analiziranjem drugih životinjskih vrsta, potencijalnih rezervoara *Salmonella enterica* i karakterizacija izolata primenom elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE metoda);
- utvrđivanje mikrobiološkog statusa mesa trupova divljih svinja nakon evisceracije, kao i uticaja različitih faktora u procesu lova i obrade trupova na njihov finalni mikrobiološki status; i
- identifikacija potencijalnih kontrolnih mera za mikrobiološku kontaminaciju mesa trupova divlje svinje uključujući sa *Salmonella enterica*, kao i potencijalne primene mikrobioloških kriterijuma u procesu proizvodnje mesa trupova divljih svinja.

4. NALAZI DISERTACIJE PO ZADACIMA

4.1. *Salmonella* u divljih svinja (*Sus scrofa*): karakterizacija i epidemiologija¹

4.1.1. Kratak sadržaj

U ovom istraživanju ispitivano je prisustvo *Salmonella* spp. u populaciji divljih svinja poreklom iz dvanaest lovišta jugozapadne Vojvodine. Lovna gazdinstva ispitivana tokom ovog istraživanja su imala slične epidemiološke specifičnosti, odnosno u pitanju su bili ravničarski predeli sa intenzivnim sistemom gajenja divljih svinja. Takođe, ocenjen je i uticaj lova i procedura obrade trupova na širenje *Salmonella* na trupove divljih svinja, kao i molekularna poklapanja sojeva izolovanih u divljih svinja i domaćih životinja. Ukupno je uzorkovano 425 divljih svinja (25,3% populacije), odstreljenih tokom zvaničnih lovova (ukupno 1700 uzoraka) i ispitano standardnim ISO procedurama. Izvršena je subtipizacija izolata i oni su dalje profilisani primenom elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE metoda). Utvrđena prevalencija *Salmonella* spp. je bila 4,2%, dok je *Salmonella* Enteritidis bila dominantan serotip. Utvrđena je visoka molekularna sličnost između izolovanih *Salmonella* sojeva poreklom od divljih svinja i domaćih životinja. Blizina naseljenih mesta i domaćih životinja, kao i nepravilno uklanjanje životinjskog otpada su identifikovani kao važni faktori koji značajno utiču na epidemiologiju *Salmonella* spp. kod divljih svinja poreklom iz ravničarskog regiona. Iako utvrđena prevalencija nije bila visoka kod divljih svinja, moguće je da *Salmonella* spp. uđe u lanac hrane. Stoga, značaj dobre lovačke i higijenske prakse u rukovanju, odnosno obradi trupova divljih svinja, ne može da se zanemari.

4.1.2. Uvod

Evropska divlja svinja (*Sus scrofa*) je široko rasprostranjena u Evropi, a njihova populacija konstantno raste od druge polovine prošlog veka (Massei *i sar.*, 2015). Najveća količina mesa divljači se konzumira od strane lovaca i njihovih porodica, do 4 kg/godišnje po glavi stanovnika (Ramanzin *i sar.*, 2010), dok je potrošnja manja u opštoj populaciji, oko 0,6-

¹ Prikazani rezultati su deo studije: Petrović, J., Mirčeta, J., Babić, J., Malešević, M., Velhner, M., Blagojević, B. and Antić, D. (2017). *Salmonella* in wild boars (*Sus scrofa*): characterization and epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine* (submitted).

1,0 kg godišnje po glavi stanovnika u Austriji, Francuskoj, Nemačkoj i Švajcarskoj (Atanassova *i sar.*, 2008; Membré *i sar.*, 2011). U poređenju sa mesom domaćih svinja, meso divljih svinja je tamnije boje, manje nežno i suvo. Sa nutritivne strane, najvažnija karakteristika mesa divlje svinje je malo prisustvo intramuskularnih masti (Sales and Kotrba, 2013). Potrošači sve više prate trendove zdrave ishrane pa se meso divljači smatra za potpuno „prirodni“ proizvod.

Proizvodnja i prerada mesa divljači se značajno razlikuje od klasične proizvodnje mesa domaćih životinja i predstavlja izazov sam po sebi. Domaće životinje koje se gaje za proizvodnju mesa u farmskim uslovima podležu redovnoj veterinarskoj zdravstvenoj kontroli i zvaničnim *ante-* i *post-mortem* pregledima u klanicama, dok se kod lovne divljači obavlja samo *post-mortem* pregled od strane veterinara. Osiguranje bezbednosti mesa divljači i primena koncepta „od šume do trpeze“ obuhvata kontrolu uticaja životne sredine u lovištima, tehnike lova i obrade trupova (uključujući tehnike evisceracije), pregled mesa nakon odstrela, transport trupova do objekata za primarni prihvata i dalju obradu i drugo. Zbog epidemioloških razlika između divljih i domaćih životinja, ocena rizika od patogena poreklom od mesa divljih svinja je veoma važna.

Salmonella spp. je često prisutna u različitim vrstama mesa koji se koriste za ishranu ljudi i njeno prisustvo se smatra važnim pokazateljem mikrobiološke ispravnosti mesa. Postoji mnogo domaćina za *Salmonella* spp. kod divljih životinja (različite vrste lovne divljači, ptice, glodari, lisice, itd.), a i poznato je i da divlje svinje češće nose enterične patogene nego divlji preživari (Wisniewski, 2001). Takođe, veći značaj se daje divljim životinjama kao rezervoarima *Salmonella* spp. za infekcije domaćih životinja, nego značaju kontaminacije mesa divljači sa *Salmonella* spp. koja ulazi u lanac ishrane (EFSA, 2010). Prema dostupnoj literaturi, nijedna epidemija salmoneloze nije bila povezana sa konzumacijom mesa divlje svinje. Pored jasnih teškoća u istraživanjima/potvrđivanjima epidemija, ovo može biti posledica opšte niske potrošnje mesa divljači i/ili niske prevalencije *Salmonella* spp. na mesu divljih svinja (Hilbert *i sar.*, 2012). Međutim, *Salmonella* spp. je prisutna u lancu mesa divljači širom Evrope. Velika razlika u rasprostranjenosti različitih serotipova *Salmonella* spp. kod lovne divljači je prijavljena između pojedinih regiona Evrope, od 0-22,1% (Paulsen *i sar.*, 2012). Smatra se da je *Salmonella* relevantni biološki hazard iz lovne divljači (Gortazar *i sar.*, 2007). Međutim, većina objavljenih istraživanja je bila fokusirana na analizu prisustva *Salmonella* spp. u fecesu ili utvrđivanje njene seroprevalence. Osim nekih podataka iz Španije o rasprostranjenosti *Salmonella* spp. u pojedinim lovištima (Cano-Manuel *i sar.*, 2014; Díaz-Sánchez *i sar.*, 2013), ne postoje drugi detaljni podaci sa komparativnom analizom razlika u

učestalosti između ograđenih i otvorenih lovišta. Osim toga, nedostaju informacije o praćenju izvora *Salmonella* spp. infekcija/kontaminacija i uticaju procesa lova na prisustvo *Salmonella* spp. na mesu trupova divljih svinja.

Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi prevalencija i distribucija *Salmonella* spp. u populaciji divljih svinja u otvorenim i ograđenim, intenzivno gajenim lovištima putem: (1) ispitivanja raširenosti prisustva *Salmonella* spp. kod divlje svinje; (2) procene uticaja procesa lova na prisustvo *Salmonella* spp. kod divljih svinja; i (3) praćenja izvora *Salmonella* spp. utvrđivanjem molekularne sličnosti izolovanih sojeva poreklom iz divljih svinja i domaćih životinja. Ograničavajući istraživanje na određeno geografsko područje (jugozapadna Vojvodina), rezultati se mogu primeniti na druga, geografski slična lovišta (ravničarski region, intenzivno gajenje u otvorenom ili ograđenom terenu, blizina domaćih životinja).

4.1.3. Materijal i metode

4.1.3.1. Ispitivana lovna gazdinstva i životinje

Istraživanje je sprovedeno u periodu između oktobra i decembra meseca, tokom dve uzastopne lovne sezone (2013. i 2014. godine). Ispitivane životinje su bile poreklom iz dvanaest različitih lovišta u regionu jugozapadne Vojvodine. Deset lovnih gazdinstava u ovom istraživanju su bila velika ograđena lovišta, dok su dva bila otvorenog tipa. Intenzivno gajenje divljih svinja radi lova se primenjuje u svim lovištima, i to u uključujući upravljanje životnim staništem uz očuvanje prirodnog ekosistema, sa dopunskim dohranjivanjem i intenzivnom kontrolom predatora. Od deset ograđenih lovišta, tri su klasifikovana u kategoriju visoke gustine (>10 životinja/km²) i sedam srednje gustine (5-10 životinja/km²), prema kategorizaciji predloženoj od Vicente *i sar.* (2004). Sa druge strane, otvorena lovišta su klasifikovana u kategoriju niske gustine (<5 životinja/km²). Važna epidemiološka činjenica je da su sva lovišta u neposrednoj blizini naseljenih mesta i farmi (<5 km). Tačan broj životinja u lovištu je promenljiva kategorija, tako da su podaci prikupljeni od strane osoblja lovišta u vreme lova. Ukupan broj divljih svinja u svih dvanaest lovišta u toku istraživanja bio je 1.677, a ukupno je 425 uzorkovanih divljih svinja odstreljeno tokom lovova (25,3% ukupne populacije).

4.1.3.2. Lov i procedure uzorkovanja

Lov je izveden sa čeke (fiksna pozicija) i korišćeno je oružje sa olučenom cevi. Po završetku lova, odstreljene jedinke su prikupljane i eviscerirane su na terenu ili su prebacivane u objekat za primarni prihvata i obradu trupova gde je vršena evisceracija i dalja obrada trupova. Uzorci fecesa su uzimani direktno iz rektuma, a mesenterijalni limfni čvorovi su aseptično uzorkovani tokom evisceracije. Uzorci briseva su uzimani sa površine kože i mesa trupova odstreljenih jedinki koristeći prethodno natopljene sunđere sa 10 ml MRD (Maximum Recovery Diluent; Oxoid). Uzorci briseva kože su sakupljeni neposredno pre evisceracije sa oko 1000 cm² kože (zadnji skočni zglob - spoljna strana buta – perianalna regija – medijalna linija abdomena i grudi). Uzorci sa površine mesa trupova su uzeti ubrzo nakon evisceracije i drugih procedura obrade. Brisevi mesa trupa su uzeti sa četiri mesta koja odgovaraju korespondentno brisu kože (unutrašnje površine grudne duplje, trbušne duplje, buta i karlične regije), uz pomoć sterilnih kvadratnih šablona koji ocrtavaju 100 cm² (ukupno, 400 cm²). Svi uzorci su transportovani u ručnom frižideru na 4°C u laboratoriju u roku od 3 h.

4.1.3.3. Mikrobiološke procedure

U ovom istraživanju prikupljeni su uzorci od ukupno 425 sveže odstreljenih divljih svinja. Od svake životinje su testirana po četiri uzorka na prisustvo *Salmonella* spp.: bris kože, bris mesa trupa, mezenterijalni limfni čvor i feces (ukupno 1700 uzoraka). Izolacija *Salmonella* spp. je izvedena u skladu sa ISO 6579:2002, i procedurom za fekalne uzorke (Aneks D) (ISO, 2002a). Serotipizacija je izvršena u skladu sa CEN ISO/TR 6579-3:2014 (ISO, 2002b). Sumnjive kolonije *Salmonella* spp. su dodatno potvrđene pomoću API-20 *Enterobacteriaceae* biohemijskog kita.

4.1.3.4. Karakterizacija izolata *Salmonella* spp. sojeva

U cilju ispitivanja moguće povezanosti između *Salmonella* spp. izolata poreklom od divljih svinja (n=20) iz različitih lovišta i izolata iz domaćih životinja sa okolnih farmi, subtipizacija izolata je urađena i poređena PFGE tehnikom. *Salmonella* spp. izolati poreklom od domaćih svinja i živine (n=7) prikupljeni su sa farmi u blizini ispitivanih lovišta. Ukupno, 27 izolata je genotipizirano primenom standardizovanog laboratorijskog protokola za molekularno subtipiziranje *Salmonella* spp. PFGE metodom (CDC, 2013). Makrorestrikcija

DNA genetskog materijala je urađena sa *SpeI* i *XbaI* restrikcionim enzimima. Makrorestrikcija *Salmonella* Braenderup H9812 soja je korišćena kao standard molekularne veličine. Dobijeni profili su statistički analizirani pomoću Ward-ove povezanosti koeficijenata korelacije između PFGE obrazaca različitih genotipova pomoću SPSS softvera za analizu klastera (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

4.1.3.5. Analiza rezultata

Prevalencija *Salmonella* spp., Hi-kvadrat test (χ^2) i P vrednost su izračunati pomoću IBM SPSS Statistics 20 (IBM, Armonk, NY, USA). Rezultati statističkih testova se smatraju značajnim za $p < 0,05$. Hi-kvadrat test je korišćen za izračunavanje značajnosti uticaja sledećih parametara: (1) uticaj načina držanja životinja (otvoreno/ograđeno lovište); (2) uticaj vremenskih uslova (kiša tokom lova); (3) uticaj procedura lova (oštećenje trbušne duplje prilikom upucavanja i broj ulaznih rana); (4) uticaj načina obrade trupa nakon ulova (evisceracija u ležećem ili u visećem položaju i praksa uklanjanja dijafragme i peritoneuma); i (5) uticaj pola, starosti i težine životinje, kao i mesta gde je *Salmonella* spp. pronađena (koža, meso trupa, limfni čvor i/ili feces).

4.1.4. Rezultati

4.1.4.1. Prevalencija *Salmonella* spp. kod divljih svinja

Tokom ovog istraživanja ukupno je testirano 1.700 uzoraka, poreklom od 425 divljih svinja. Kao što je prikazano u Tabeli 4.1.1, prisustvo *Salmonella* spp. utvrđeno je kod 18 divljih svinja, sa ukupnom prevalencijom od 4,2%.

Salmonella spp. je detektovana u osam lovišta (66,7% od ukupnog broja jedinki), sa prevalencijom u rasponu od 1,7% do 33,3% (u lovištima D i K). U četiri lovišta *Salmonella* spp. nije detektovana (Tabela 4.1.1). *Salmonella* spp. je češće detektovana u fecesu (3,1%), nego na mesu trupa, koži ili u mezenterijalnom limfnom čvoru (0,9%, 0,7% i 0,2%). Kod dve životinje je detektovana *Salmonella* spp. sa više od jednog uzorkovanog mesta, odnosno, kod jedne životinje je detektovana *S. Typhimurium* u fecesu i na mesu trupa (u lovištu I), dok je kod druge *S. Enteritidis* detektovana na tri mesta, odnosno na koži, mesu trupa i u mezenterijalnom limfnom čvoru (lovište K). Kod svih ostalih životinja *Salmonella* spp. je

izolovana iz samo jednog od ispitivanih uzoraka (Tabele 4.1.1 i 4.1.2). Serotipizacijom ukupno 21 izolata *Salmonella* spp. potvrđeno je petnaest *Salmonella* Enteritidis izolata (71,4% od ukupnog broja izolata), pet izolata *Salmonella* Typhimurium (23,8%) i samo jedan *Salmonella* Infantis (4,8%) (Tabela 4.1.2).

Tabela 4.1.1. Prevalencija *Salmonella* spp. po pojedinim lovnim gazdinstvima (LG) kod jedinki divljih svinja i raspodela pozitivnih uzoraka.

Lovno gazdinstvo	Broj živ. u LG / godišnji prosek	Broj ispitanih životinja (% po LG)	<i>Salmonella</i> spp. pozitivne životinje / prevalencija (%)	<i>Salmonella</i> spp. izolati (% od ukupnog broja ispitanih životinja u lovištu)			
				koža	meso trupa	limfni čvor	feces
A	180	63 (35,0)	2 (3,2)	0	0	0	2 (3,2)
B	160	26 (16,3)	0	0	0	0	0
C	210	59 (28,1)	1 (1,7)	0	0	0	1 (1,7)
D	82	12 (14,6)	4 (33,3)	0	0	0	4 (33,3)
E	340	66 (19,4)	2 (3,0)	1 (1,5)	0	0	1 (1,5)
F	210	57 (27,1)	1 (1,8)	0	0	0	1 (1,8)
G	150	48 (32,0)	1 (2,1)	0	0	0	1 (2,1)
H	220	26 (11,8)	0	0	0	0	0
I	55	32 (58,2)	2 (6,3)	0	2 (6,3)	0	1 (3,1)
J	20	10 (50,0)	0	0	0	0	0
K*	35	15 (21,4)	5 (33,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	1 (6,7)	2 (13,3)
L*	15	11 (73,3)	0	0	0	0	0
Ukupno	1677	425 (25,3)	18 (4,2)	3 (0,7)	4 (0,9)	1 (0,2)	13 (3,1)

* „K“ i „L“ su otvorena lovišta, a sva ostala su ograđena lovišta

Tabela 4.1.2. *Salmonella* spp. serotipovi poreklom iz uzoraka divljih svinja.

Serotip	Broj pozitivnih živ. (% ukupnog broja životinja)				Broj (%)		Prevalencija
	Trup	Koža	Feces	Limfni čvor	Izolati	Životinje	
<i>S. Enteritidis</i>	3 (0,7)	2 (0,5)	9 (2,1)	1 (0,2)	15 (71,4)	13 (72,2)	3,1
<i>S. Typhimurium</i>	1 (0,2)	1 (0,2)	3 (0,7)	0	5 (23,8)	4 (22,2)	0,9
<i>S. Infantis</i>	0	0	1 (0,2)	0	1 (4,8)	1 (5,6)	0,2
Ukupno	4 (0,9)	3 (0,7)	13 (3,1)	1 (0,2)	21 (100,0)	18 (100,0)	4,2

4.1.4.2. Uticaj različitih ispitivanih faktora na nalaz *Salmonella* spp.

Salmonella spp. je statistički značajno češće utvrđena kod životinja iz otvorenog lovišta u odnosu na ograđena lovišta ($\chi^2 = 28,11$; $p < 0,05$). Test Hi-kvadrat pokazuje da oštećenje trbušne duplje izazvano nestručnim pogotkom, značajno povećava verovatnoću pronalazanja *Salmonella* spp. na koži ($\chi^2 = 7,03$; $p < 0,05$), ali to nije bilo u korelaciji sa nalazom na mesu trupova ($\chi^2 = 0,76$; $p > 0,05$). Takođe, mogućnost otkrivanja *Salmonella* spp. na koži znatno se povećava ukoliko svinje imaju dve ili više ustrelnih rana ($\chi^2 = 6,30$; $p < 0,05$).

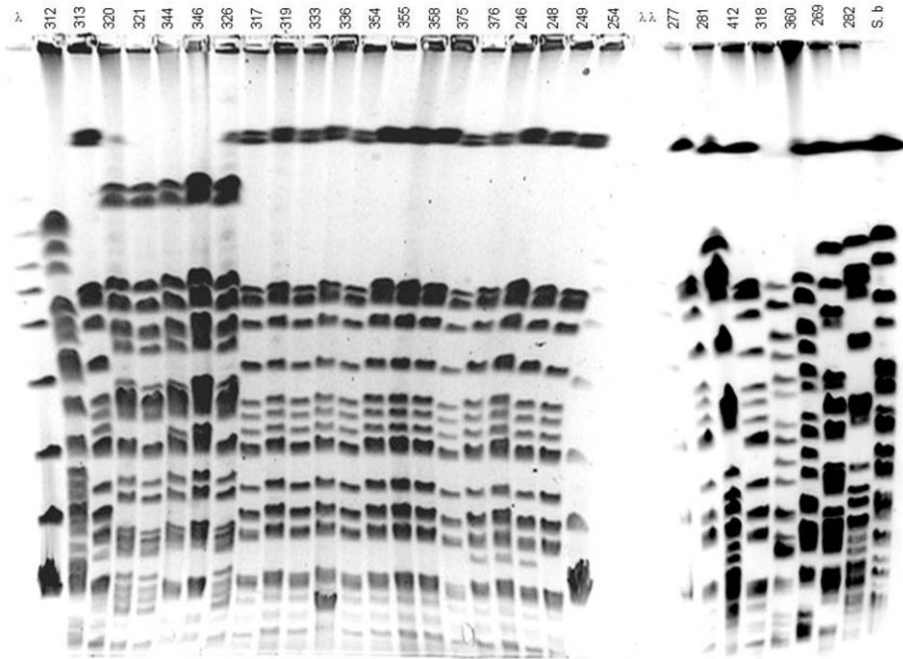
Vlažni vremenski uslovi i padavine tokom lova povećavaju verovatnoću nalaza *Salmonella* spp. na koži ($\chi^2 = 9,18$; $p < 0,05$), ali ne i na mesu trupa ($\chi^2 = 1,38$; $p > 0,05$). Praksa uklanjanja dijafragme i peritoneuma nije značajno uticala na nalaz *Salmonella* spp. i takođe nije bilo značajnih razlika između evisceracije sprovedene na zemlji/podu ili u visećem položaju ($\chi^2 < 3,84$; $p > 0,05$).

Pol jedinki utiče na prisustvo *Salmonella* spp., sa statistički značajno većim nalazom u fecesu kod ženskih jedinki ($\chi^2 = 8,25$; $p < 0,05$). Životinje starije od 36 meseci koje su težile više od 75 kg su imale značajno veću prevalenciju *Salmonella* spp. ($\chi^2 = 16,69$; $p < 0,05$) u odnosu na druge starosne kategorije.

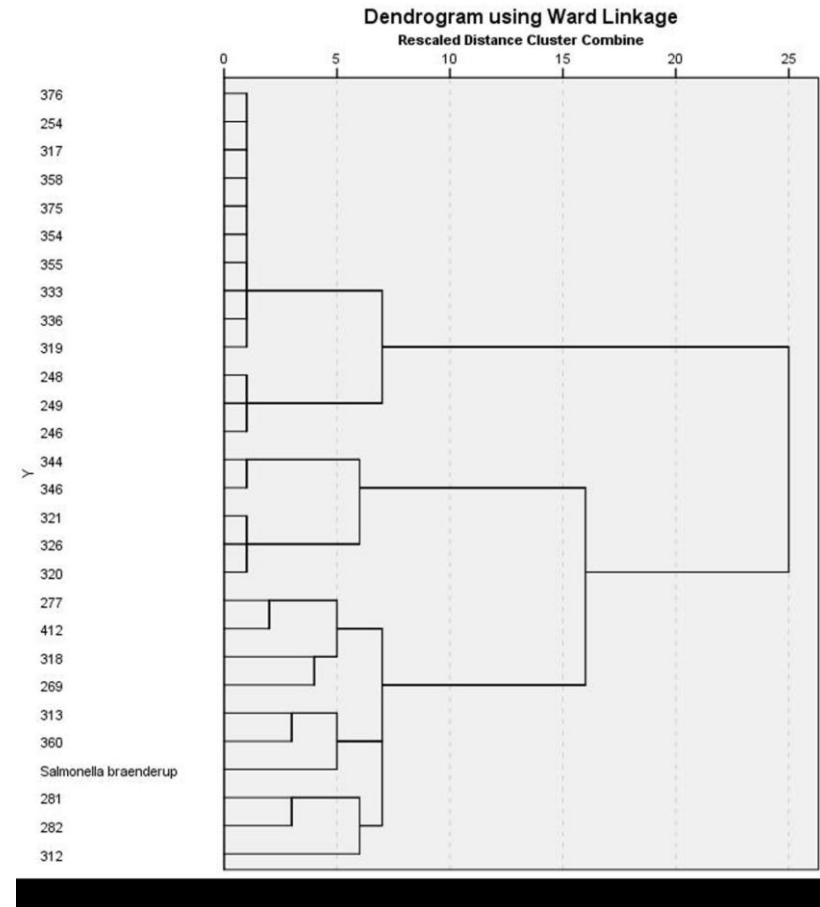
4.1.4.3. Karakterizacija izolata *Salmonella* spp.

Dendrogram dobijen Wardovom metodom povezivanja koeficijenata korelacije između različitih *SpeI* makrorestrikcionih PFGE profila, ukazuje na postojanje 8 grupa izolata (Slika 2). Glavna grupa identičnih izolata nakon digestije sa *SpeI* restrikcijom enzimom obuhvata izolate 376, 254, 317, 358, 375, 354, 355, 333, 336 i 319. Izolati 344 i 346 su bili identični kao i izolati 248, 249, 246 i izolati 321, 326 i 320. Izolati 277 i 412 su blisko srodni kao i izolati 318 i 269. Izolati 313 i 360 su blisko srodni sa *S. Braenderup*.

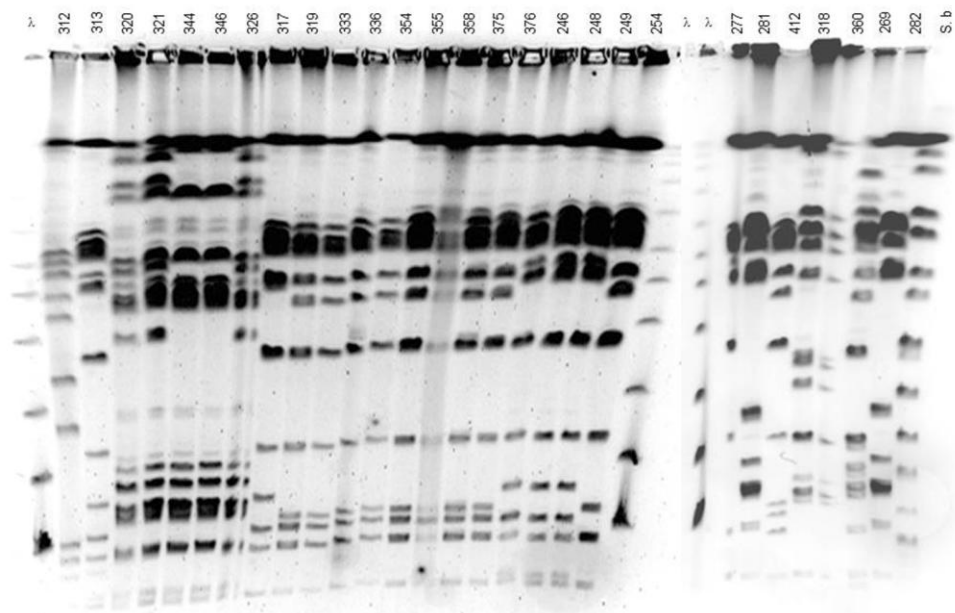
Dendrogram dobijen Wardovom metodom povezivanja koeficijenata korelacije između različitih *XbaI* makrorestrikcionih PFGE profila također ukazuje na postojanje 8 grupa izolata (Slika 3). Glavna grupa izolata posle digestije sa *XbaI* enzimom, obuhvata osam izolata (319, 333, 336, 354, 355, 358, 375 i 376). Izolat 317 je blisko srodan sa izolatima 246, 248 i 249. Izolati 344 i 346 su identični kao i izolati 321, 326 i 320. Blisko su također srodni izolati 281 i 282, a iz različite grane visoko su srodni izolati 254, 412 i 277. Izolati 318 i 269 su blisko srodni sa *S. Braenderup*.



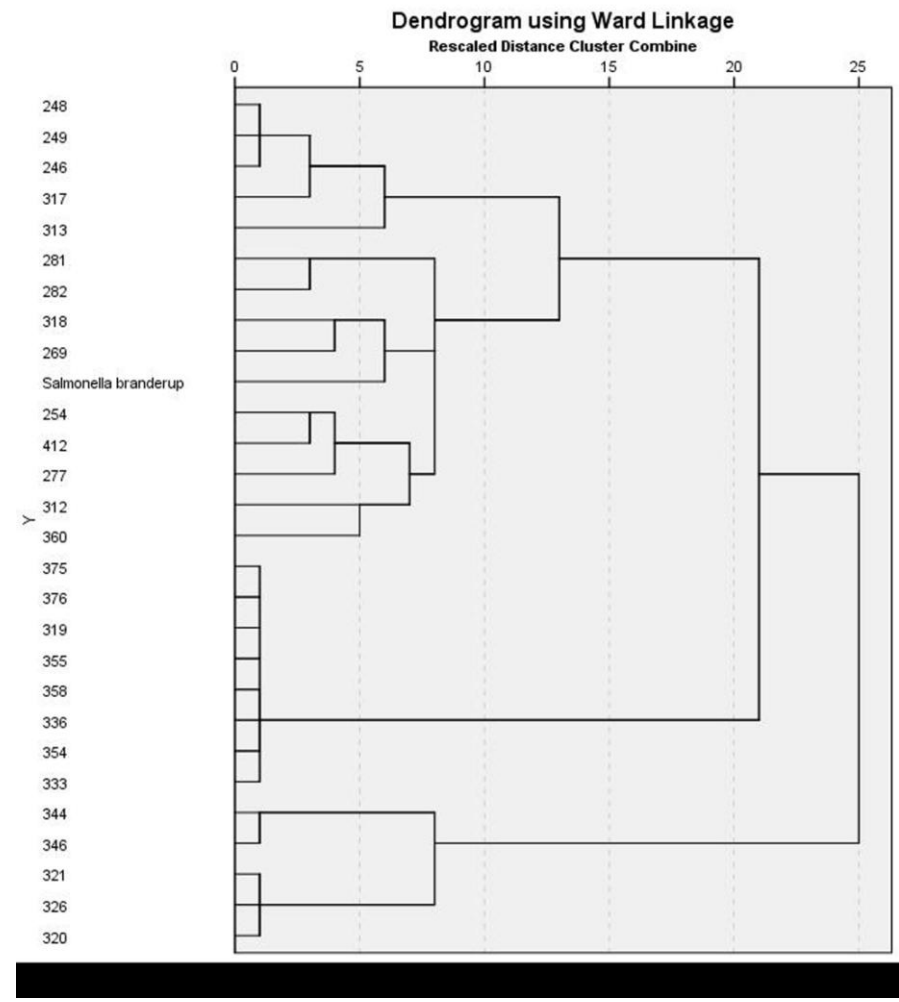
- | | | | |
|-----|---|-----|---|
| 312 | <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja feces "C" | 375 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "E" |
| 313 | <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja koža "E" | 376 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "F" |
| 320 | <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja feces "I" | 246 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja trup "E" |
| 321 | <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja trup "I" | 248 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja trup "E" |
| 344 | <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja feces "D" | 249 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "K" |
| 346 | <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja feces "D" | 254 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "K" |
| 326 | <i>S. Typhimur.</i> - dom. svinja feces | 277 | <i>S. Enteritidis</i> - živina feces |
| 317 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "G" | 281 | <i>S. Enteritidis</i> - živina feces |
| 319 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja trup "I" | 412 | <i>S. Enteritidis</i> - živina feces |
| 333 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | 318 | <i>S. Infantis</i> - div. svinja feces "E" |
| 336 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | 360 | <i>S. Infantis</i> - dom. svinja feces |
| 354 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | 269 | <i>S. Infantis</i> - dom. svinja feces |
| 355 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | 282 | <i>S. Infantis</i> - živina feces |
| 358 | <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | | |



Slika 2. PFGE makro-restrikcioni profil *Salmonella* spp. dobijen sa *SpeI* enzimom i Dendrogram dobijen Wardovom metodom povezivanja koeficijenata korelacije između različitih PFGE *SpeI* makrorestrikcionih profila; Oznake lovnih gazdinstava (pod znacima navoda) i brojeva izolata su dati ispod.



- | | |
|---|---|
| 312 <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja feces "C" | 375 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "E" |
| 313 <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja koža "E" | 376 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "F" |
| 320 <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja feces "I" | 246 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja trup "E" |
| 321 <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja trup "I" | 248 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja trup "E" |
| 344 <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja feces "D" | 249 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "K" |
| 346 <i>S. Typhimur.</i> - div. svinja feces "D" | 254 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "K" |
| 326 <i>S. Typhimur.</i> - dom. svinja feces | 277 <i>S. Enteritidis</i> - živina feces |
| 317 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "G" | 281 <i>S. Enteritidis</i> - živina feces |
| 319 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja trup "I" | 412 <i>S. Enteritidis</i> - živina feces |
| 333 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | 318 <i>S. Infantis</i> - div. svinja feces "E" |
| 336 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | 360 <i>S. Infantis</i> - dom. svinja feces |
| 354 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | 269 <i>S. Infantis</i> - dom. svinja feces |
| 355 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | 282 <i>S. Infantis</i> - živina feces |
| 358 <i>S. Enteritidis</i> - div. svinja feces "D" | |



Slika 3. PFGE makro-restrikcioni profil *Salmonella* spp. dobijen sa *XbaI* enzimom i Dendrogram dobijen Wardovom metodom povezivanja koeficijenata korelacije između različitih PFGE *XbaI* makrorestrikcionih profila; Oznake lovnih gazdinstava (pod znacima navoda) i brojeva izolata su dati ispod.

4.1.5. Diskusija

Ovo istraživanje pruža prve podatke o prevalenciji *Salmonella* spp. u populaciji divljih svinja u Srbiji. Osim toga, ovo su i prvi podaci o prisustvu *Salmonella* spp. na koži divlje svinje i uticaju procesa lova na prevalenciju *Salmonella* spp. na koži i mesu trupa, ali i identifikaciji mogućih izvora *Salmonella* spp. infekcija divljih svinja.

4.1.5.1. Prevalencija *Salmonella* spp. kod divljih svinja

Ovo dvogodišnje istraživanje (2013-2014. godine) je obuhvatilo dvanaest intenzivno gajenih lovišta u jugozapadnoj Vojvodini, sa procenjenom populacijom od ukupno 1.677 jedinki divljih svinja. Četvrtina procenjene populacije divljih svinja (25,3%) je ispitivana na prisustvo *Salmonella* spp. sa ukupnom utvrđenom prevalencijom od 4,2%. Relativno niska prevalencija je objavljena i u drugim studijama. Navarro-Gonzalez i saradnici (2013) utvrdili su učestalost od 5% u fecesu kod divlje svinje u prigradskom području Barselone, dok je prevalencija od 7% utvrđena u Poljskoj u različitim uzorcima poreklom od divljih svinja (uzorci mesa, limfnih čvorova, jetre, bubrega i slezine) (Wisniewski, 2001). Isto tako, veoma niska prevalencija od 1,2% je utvrđena iz uzoraka fecesa i brisa trupa u drugoj studiji iz Španije (Díaz-Sánchez *i sar.*, 2013). Nešto veće vrednosti su dobijene u Švajcarskoj, 12% iz uzoraka tonzila, ali 0% iz uzoraka fecesa (Wacheck *i sar.*, 2010), kao i 22% i 22,8% iz uzoraka fecesa u Portugalu i Italiji (Vieira-Pinto *i sar.*, 2011; Chiari *i sar.*, 2013). U Španiji, seroprevalencija kod divljih svinja bila je mnogo veća, 25,7% (Cano-Manuel *i sar.*, 2014). Utvrđena seroprevalencija je obično viša od prevalencije izolovane *Salmonella* spp. Ovo je potvrđeno podacima iz Italije gde je 66,5% uzoraka seruma bilo pozitivno pomoću ELISA testa na *Salmonella* spp., a mikrobiološki pregled je pokazao da je samo 10,8% divljih svinja imalo *Salmonella* spp. pozitivan nalaz iz fecesa (Zottola *i sar.*, 2012). Ove razlike su očekivane, jer se ne može uspostaviti direktna veza između prisustva antitela sa prisustvom samog patogena. Seroprevalencija je mera istorijske izloženosti, koja može ili i ne mora biti u korelaciji sa mikrobiološkim statusom u vreme uzorkovanja. Tako, serološki nalaz pomaže da se identifikuju zaražene populacije, ali nije koristan za utvrđivanje statusa infekcije pojedinačnih životinja. Zbog toga je kombinacija seroloških i bakterioloških testova veoma važna kod monitoringa infekcija u populaciji životinja (Zottola *i sar.*, 2012).

U ovom istraživanju *Salmonella* spp. je otkrivena u dve trećine uzorkovanih lovišta. Prevalencija *Salmonella* spp. bila je vrlo promenljiva, u četiri lovišta prisustvo nije utvrđeno,

šest je imalo nisku prevalenciju (1-7%) a dva lovišta su imala veoma visoku prevalenciju (33.3%). Promenljiva prevalencija između lovišta je u skladu sa prethodnom studijom iz Španije, gde je *Salmonella* spp. izolovana u 12% uzorkovanih lovišta, sa prevalencijom u rasponu od 5% do 33% između lovišta (Díaz-Sánchez *i sar.*, 2013). Ovakvi podaci ukazuju da je učestalost prisustva *Salmonella* spp. u lovnim gazdinstvima često veoma varijabilna, na šta ukazuje i Gill (2007).

Dominantan serotip u ovom istraživanju bio je *Salmonella* Enteritidis (71,4%) a ostali serotipovi su bili manje prevalentni. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. Infantis* su takođe detektovani u Švajcarskoj, Portugalu i Italiji (Wacheck *i sar.*, 2010; Vieira-Pinto *i sar.*, 2011; Magnino *i sar.*, 2011), ali i ostali serotipovi, kao *S. Salamae*, *S. Diarizonae*, *S. Fischerhuette*, *S. Veneziana*, *S. Bardo* i *S. Montevideo* su takođe utvrđivani u drugim istraživanjima (Díaz-Sánchez *i sar.*, 2013; Zottola *i sar.*, 2012). Nalazi iz divljih svinja potvrđuju da su slični *Salmonella* spp. serotipovi prisutni kod divljih životinja i domaćih svinja i živine u istom geografskom području, gde se *S. Enteritidis*, *S. Infantis* i *S. Typhimurium* periodično utvrđuju kod domaćih životinja (47,7%, 27,9% i 13,9% u studiji Petrović *i sar.* (2015)). Ovi serotipovi su takođe najčešći izolati u slučajevima infekcija ljudi na području Srbije (Institut za javno zdravlje Srbije, 2014). U odnosu na mesto uzorkovanja sa divlje svinje, *Salmonella* spp. je najčešće izolovana iz fecesa (3,1%), a na koži i u mesu trupova odstreljenih svinja su bili značajno ređi nalazi (0,7% i 0,9%). Prisustvo *Salmonella* spp. u fecesu je očekivano i ukazuje na moguće dalje širenje patogena i kontaminaciju kože, a potom i kontaminaciju površina mesa trupova u toku rukovanja i procedure dranja i obrade (Antic *i sar.*, 2010).

Kod svih testiranih životinja, izvršen je *post-mortem* pregled i nisu pronađeni znakovi lezija kod *Salmonella* spp. pozitivnih životinja. *Salmonella* spp. infekcija kod divlje svinje se retko manifestuje kroz kliničke znakove bolesti, međutim izbijanje epidemije salmoneloze sa septikemijom kod divljih svinja, izazvano sa *Salmonella Choleraesuis* prijavljeno je u Italiji (Conedera *i sar.*, 2014).

Kategorija divljih svinja pod najvišim rizikom od infekcije sa *Salmonella* spp. bile su jedinke ženskog pola starije od 36 meseci i teže od 75 kg. Veća prevalencija utvrđena kod jedinki ženskog pola je slična kao u izveštaju Cano-Manuel *i sar.* (2014), ali je u suprotnosti sa istraživanjem Closa-Sebastià *i sar.* (2011), gde je viša seroprevalencija *Salmonella* spp. antitela bila utvrđena kod mlađih životinja. Međutim, ovi autori su takođe utvrdili i višu seroprevalenciju kod odraslih, za drugih jedanaest ispitivanih virusnih i bakterijskih patogena i zaključili su da odrasle divlje svinje imaju veću verovatnoću da budu izložene patogenima.

Viša prevalencija kod starijih ženki divljih svinja se adekvatno uklapa u ponašanje ženskih jedinki koje su posmatrane u lovištima tokom ovog istraživanja. Polno zrele ženke imaju povećanu potrebu za unosom proteina tokom laktacije, aktivnije su u potrazi za hranom i kretanjem pokrivaju veliku površinu lovišta često nailazeći na razne vrste otpadaka životinjskog porekla. One se hrane, između ostalog, i leševima jelena, svinja, divljih ptica, pacova i domaćih životinja što doprinosi prenosu i širenju patogena.

4.1.5.2. Uticaj različitih ispitivanih faktora na nalaz *Salmonella* spp.

Uticaj procedura lova i rukovanja sa trupovima na prevalenciju *Salmonella* spp. na mesu trupova nije detaljno istraživano u ranijim studijama. Neki podaci postoje samo u odnosu na indikatore opšte i fekalne kontaminacije, odnosno ukupan broj bakterija i broj *Enterobacteriaceae* (Atanassova *i sar.*, 2008; Avagnina *i sar.*, 2012). Mikrobiološki status mesa trupova divljih svinja može biti pogoršan loše plasiranim pogotkom tokom lova (u predelu abdomena), evisceracijom i rukovanjem trupovima na otvorenom, u polju nakon odstrela gde nema pristupa pitkoj vodi, kao i nakon ostavljanja trupova tokom dužeg vremena na ambijentalnoj temperaturi (Gill, 2007; Paulsen, 2011).

Ovo istraživanje je pokazalo da oštećenje trbušne duplje izazvano neadekvatnim pogotkom značajno povećava mogućnost prisustva *Salmonella* spp. na koži, ali iznenađujuće ne i na mesu trupova. Ovi nalazi su do izvesne mere u skladu sa izveštajima Atanassova *i sar.* (2008) i Avagnina *i sar.* (2012), koji su utvrdili da se kod životinja odstreljenih u bilo kojoj regiji posteriorno od dijafragme javlja veći rizik od mikrobiološke kontaminacije mesa trupova (sa indikatorima opšte kontaminacije i sa patogenima) u odnosu na jedinke gde je pogodak na bilo kom drugom mestu (srce, glava, vrat ili kičma). Međutim, ova istraživanja nisu obuhvatila kožu divljih svinja kao važan izvor mikrobiološke kontaminacije mesa trupa. Još jedan interesantan rezultat ovog istraživanja bio je nalaz da u slučajevima kada je životinja bila odstreljena dva ili više puta, dolazilo je do statistički značajnog povećanja *Salmonella* spp. nalaza na koži, ali ne i na mesu trupova.

Kiša tokom lova povećava verovatnoću otkrivanja *Salmonella* spp. na koži, verovatno zbog boljeg prenosa bakterija na briseve sa mokre nego sa suve kože, kao što je utvrđeno na koži goveda za klanje (Blagojević *i sar.*, 2012). S druge strane, nije utvrđeno da kiša ima uticaja na prisustvo *Salmonella* spp. na mesu trupova odmah nakon evisceracije. Jedan od razloga može biti drugačiji način uzorkovanja kože i mesa trupa (uzorak mesa trupa je uzet sa 2,5 puta manje površine). U svakom slučaju, iako finalno obrađeni trupovi divljih svinja nisu

bili predmet ovog istraživanja, razumno je očekivati da bi koža mogla imati uticaja na njihovu kontaminaciju, s obzirom na činjenicu da mokra koža omogućava lakši prenos bakterija sa kože na meso trupova tokom procesa dranja kože.

Zanimljivo je da uklanjanje dijafragme i peritoneuma, kao higijenske mere koja se obično obavlja tokom evisceracije trupova, nije imalo statistički značaj na prevalenciju *Salmonella* spp. na mesa trupova, kao i da nema razlike između sprovođenja evisceracije na podu ili u visećem položaju. Međutim, mora se naglasiti da je ovo istraživanje faktora rizika na prisustvo *Salmonella* spp. zasnovano na veoma malom broju nalaza *Salmonella* spp. pozitivnih koža i trupova (0,7% i 0,9%), što predstavlja glavno ograničenje za tumačenje ovog dela rezultata.

PFGE karakterizacijom *S. Typhimurium* izolata pronađenih u fecesu (izolat 320) i izolata na površini mesa trupa iste životinje (izolat 321) utvrđeno je da su bili identični prema *SpeI* i *XbaI* profilima. Ovaj nalaz je potvrdio da je izvor kontaminacije mesa trupova u ovom slučaju bio feces iste životinje. Takođe je primećeno da je ova životinja bila stručno odstreljena (jedan pogodak u regiju glave), ali eviscerirana u ležećem položaju na terenu i bez pridržavanja dobre higijenske prakse. Dalje, izolati 344 i 346 *S. Typhimurium* iz fecesa iste životinje su upoređeni i razlika nije uočena u PFGE profilima. Isti je bio slučaj između *S. Enteritidis* izolata 246 i 248 poreklom sa mesa trupa iste životinje. Poređenje izolata istog serotipa od iste životinje je izvršeno jer životinje mogu da budu inficirane različitim genotipovima *Salmonella* spp. zbog dostupnosti različitih izvora hrane i kontaminiranog okruženja.

Niska stopa prisustva *Salmonella* spp. na mesu trupa divljih svinja u odnosu na nalaz u fecesu kao primarni izvor mikrobiološke kontaminacije trupa je u izvesnoj meri očekivana. Uprkos često uočenoj lošoj higijenskoj praksi rukovanja sa trupovima tokom ovog istraživanja, kontaminacija mesa trupova sa enteričnim patogenima često može biti niska (Gill, 2007).

4.1.5.3. Epidemiologija *Salmonella* spp.

PFGE subtipizacijom izolata *S. Typhimurium* poreklom od divlje svinje (izolat 320 iz fecesa i izolat 321 posledično utvrđen na mesu trupa iste životinje) i domaće svinje (izolat 326), utvrđeno je da su ovi izolati identični prema *SpeI* i *XbaI* profilima. Lovište I i farma domaćih svinja odakle sve ove životinje vode poreklo se nalaze udaljene <20km. Visok

stepen srodnosti je takođe utvrđen kod *S. Infantis* poreklom od divlje svinje (izolat 318) i domaćih svinja (izolat 269).

Salmonella Enteritidis se uglavnom karakteriše veoma niskom genetičkom raznovrsnošću, ali su utvrđene i određene razlike, kao i molekularna poklapanja između pojedinih izolata. *S. Enteritidis* izolat 254 utvrđen kod divljih svinja (lovište K) je bio visoko srodan sa izolatima poreklom sa obližnje farme živine (izolati 277 i 412).

Identični profili su takođe utvrđeni kod izolata *S. Enteritidis* koji su pronađeni kod divljih svinja iz ograđenog lovišta E (izolat 246) i otvorenog lovišta K (izolat 249). Ova dva lovišta su relativno blizu (<20km), što ukazuje na mogućnost komunikacije između divljih svinja iz oba lovišta. Isti izolati su imali visok stepen sličnosti sa izolatom 317 (ograđeno lovište G, >100km udaljenosti). Moguće objašnjenje bi moglo biti uticaj trgovine divljim svinjama između lovišta. Jasno je da isti *Salmonella* spp. genotipovi cirkulišu između različitih lovišta, kao i unutar istog lovišta (*S. Enteritidis* identičan izolat 333, 354, 358 poreklom iz lovišta D).

Lovišta sa najvećom prevalencijom *Salmonella* spp. od 33,3% bila su K (otvoreno) i D (ograđeno lovište). Tokom jednog lovnog dana uzorkovano je dvanaest životinja u lovištu D i to čak osam ženskih jedinki (među kojima je bilo šest starijih od 36 meseci), što znači da je polovina odstreljenih životinja bila iz visoko rizične grupe.

Prevalencija *Salmonella* spp. u otvorenim lovištima je bila promenljiva, odnosno 0% u lovištu L i 33,3% u lovištu K. Istraživanje iz Španije je takođe potvrdilo relativno visoku seroprevalenciju u otvorenim lovištima u planinskim područjima od 25,7% (Cano-Manuel *i sar.*, 2014). U otvorenim planinskim lovištima, obično nedostaje relevantna populacija domaćih svinja, pa divlje svinje najčešće služe kao pravi domaćin za *Salmonella* spp., kao i za neke druge patogene koji se prenose hranom (*Mycobacterium*, *Leptospira*, *Erisipelotrix*). Ovim se održava aktivna infekcija i cirkulacija patogena (Cano-Manuel *i sar.*, 2014). Međutim, u ravničarskim područjima (kao u ovom istraživanju), situacija je drugačija. Izolati sa identičnim i visoko srodnim PFGE profilom utvrđeni kod divljih svinja i domaćih svinja i živine, ukazuju na jasno postojanje genetske veze (naročito u slučaju *S. Typhimurium* i *S. Infantis*), kao i mogućnost postojanja epidemiološke veze. Interakcije između divljih svinja i domaćih životinja su prisutne u regionu Vojvodine. Divlje svinje iz ograđenih lovišta mogu se mešati sa svinjama iz otvorenih lovišta. Isto tako, divlje svinje iz otvorenih lovišta mogu lako doći u kontakt sa domaćim životinjama zbog nizijske prirode terena Vojvodine i slobodnog načina držanja domaćih svinja. Ovo je potvrđeno u jednom od ranijih istraživanja u ovom regionu Vojvodine (Petrović *i sar.*, 2014), gde je zaključeno da *Trichinella spiralis* cirkuliše

od domaćih svinja do divljih svinja i u suprotnom smeru. Važan epidemiološki faktor kod divljih svinja je njihovo karakteristično ponašanje, odnosno visoka tolerancija na prisustvo ljudi i često gravitiranje prema prigradskim naseljima. Divlje svinje reaguju veoma brzo na dostupnost hrane i često menjaju oblasti hranjenja. Važan izvor patogena za divlje svinje može biti otpad poreklom od domaćih životinja, koji se često može naći u područjima sa neadekvatnom veterinarsko-sanitarnom kontrolom. Uslovi držanja domaćih svinja i živine u malim seoskim gazdinstvima su često veoma loši. Njihova ishrana se često bazira na otpacima od hrane i pomijama koji mogu da sadrže ostatke od svinjskog mesa, a ove životinje takođe često imaju i pristup deponijama. Dodatno, leševi ovih domaćih životinja se često nepropisno ostavljaju u poljima. U Vojvodini, prisustvo divljih svinja iz otvorenih lovišta je primetno oko deponija gde je velika količina nepropisno odloženih trupova domaćih životinja (na primer, u lovištu K). Ovo je direktno povezano sa statistički značajno višom prevalencijom *Salmonella* spp. kod divljih svinja iz otvorenih lovišta u odnosu na ograđena lovišta.

Pored toga, drugi važan aspekt je širenje *Salmonella* spp. u životnoj sredini putem stajnjaka iz objekata za uzgoj domaćih životinja što takođe vodi kontaminaciji i površinskih voda, kao što su pojilišta i reke. Takođe, i drugi domaćini, kao što su insekti, ptice i glodari, imaju značajnu ulogu u širenju *Salmonella* u životnoj sredini (Hilbert *i sar.*, 2012). Na osnovu nalaza iz ovog istraživanja sprovedenog u ravničarskom području Vojvodine, teško je izvući čvrst zaključak da li su domaće životinje stvarni izvor infekcije za divlje svinje ili obrnuto. Činjenica je da postoji cirkulacija *Salmonella* spp. između domaćih i divljih životinja u istom geografskom području.

4.1.6. Zaključak

Ova studija pruža dragocene podatke o prisustvu *Salmonella* spp. u populaciji divljih svinja poreklom iz ravničarskog regiona Vojvodine i takođe popunjava neke praznine u znanju u pogledu epidemiologije ovog važnog alimentarnog patogena. Ukupna prevalencija *Salmonella* spp. kod divljih svinja iz lovišta u Vojvodini bila je 4,2%, a dominantni serotip *S. Enteritidis*. Ženske jedinice teže od 75 kg (i starije od 36 meseci) su bile povezane sa najvišim rizikom od prisustva *Salmonella* spp.

Veoma varijabilna prevalencija je utvrđena između lovišta i bila je naročito visoka u otvorenim lovištima koja direktno komuniciraju sa naseljenim mestima. Visoke molekularne podudarnosti pronađene između sojeva *Salmonella* spp. izolovanih poreklom od divljih svinja

i domaćih životinja pokazuju jasnu genetsku i moguću epidemiološku vezu između ovih životinja u ravničarskom regionu.

Jedan od važnijih nalaza ovog istraživanja je takođe potvrda da je izvor kontaminacije površine mesa trupa odstreljene divlje svinje sa *Salmonella* spp. feces iste životinje.

Iako je utvrđeno da prevalencija *Salmonella* spp. nije visoka kod divljih svinja, dalje procedure u narednim fazama lanca mesa divlje svinje (naročito hlađenje i dalja obrada, rasecanje i priprema proizvoda od sirovog mesa divlje svinje) mogu sa velikom verovatnoćom dovesti do značajne izloženosti potrošača ovom patogenu. Iz tog razloga, dobra praksa lova i obuka lovaca sa aspekta higijenske prakse su od suštinskog značaja za smanjenje rizika od salmoneloze kod potrošača mesa divlje svinje.

4.2. Ocena mikrobiološke kontaminacije mesa trupova divljih svinja²

4.2.1. Kratak sadržaj

U cilju ispitivanja mikrobiološkog statusa mesa trupova divljih svinja i faktora koji doprinose mikrobiološkoj kontaminaciji mesa trupova, prikupljeno je 210 uzoraka briseva kože i mesa trupa poreklom od sveže odstreljenih divljih svinja. Srednje vrednosti ukupnog broja bakterija (ACC) i broja *Enterobacteriaceae* (EBC) na koži divljih svinja bile su 5,2 i 3,6 \log_{10} cfu/cm², a na prisustvo *Salmonella* spp. bilo je pozitivno 1,4% briseva kože životinja. Neznatno veće prosečne vrednosti ACC i EBC od 5,4 i 3,8 \log_{10} cfu/cm² su utvrđene na mesu trupova, sa prevalencijom *Salmonella* spp. od 1,9%. Utvrđeno je da su neadekvatne higijenske procedure u rukovanju i obradi trupova divljih svinja, kao što su evisceracija u ležećem položaju na zemlji i pranje kože i unutrašnjih površina trupa nakon evisceracije, imale najznačajniji uticaj na mikrobiološki status mesa evisceriranih trupova. Iz tog razloga, ovi rezultati ukazuju na neophodnost uvođenja i striktno primene dobre higijenske prakse u lovištima i objektima za obradu trupova divljači.

4.2.2. Uvod

Meso divljači, uključujući meso divljih svinja, sve više dobija na značaju poslednjih godina jer se smatra zdravom hranom. Proizvodi od mesa divlje svinje u Srbiji se često ne podvrgavaju ikakvom načinu termičke obrade, već se uglavnom samo hladno dime i suše (tradicionalni suvomesnati proizvodi i suve fermentisane kobasice). Ovo ukazuje na neophodnost korišćenja sirovog mesa dobrog higijenskog i mikrobiološkog kvaliteta u cilju zaštite javnog zdravlja (Avagnina *i sar.*, 2012). U tom smislu, lovna gazdinstva kao primarni proizvođači i registrovani objekti za obradu i rasecanje trupova divljači koji meso stavljaju u

² Rezultati su u celosti objavljeni u studiji: Mirčeta, J., Petrović, J., Malešević, M., Blagojević, B. and Antić, D. (2017). Assessment of microbial carcass contamination of hunted wild boars. *European Journal of Wildlife Research*, 63: 37.

promet, imaju odnosne odgovornosti u osiguranju bezbednosti i sistemu sledljivosti mesa divljači (EC, 2004a).

Tradicionalno, divlje svinje se love u otvorenim lovištima ili u velikim ograđenim lovištima. Mikrobiološki kvalitet mesa divlje svinje zavisi od više faktora i može značajno da varira (Gill, 2007), naročito zbog prirode lova i obrade divljači, čime se u tom pogledu značajno razlikuje od domaćih farmskih životinja (Paulsen, 2011). Zdravstveno stanje životinja pre odstrela, lokacija ustrelne rane i nivo primenjene higijenske prakse prilikom rukovanja sa trupovima (od momenta prikupljanja odstreljenih životinja do hlađenja) značajno utiču na konačan mikrobiološki kvalitet mesa divljači (Paulsen, 2011). Međutim, sistematskih studija o uticaju različitih tehnika rukovanja i obrade divljači na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupova nedostaje u literaturi. Takođe, iako se koža životinja smatra najznačajnijim izvorom mikrobiološke kontaminacije mesa trupova u slučaju domaćih životinja za klanje (Antic *i sar.*, 2011), nema objavljenih studija o mikrobiološkom statusu kože krupne divljači i/ili o oceni njene uloge u kontaminaciji mesa trupova krupne divljači, sem skorašnjeg pilot istraživanja na ograničenom broju divljih svinja (Mirceta *i sar.*, 2015).

Mikrobiološki status mesa trupova sveže odstreljenih divljih svinja je istraživao u veoma malom broju studija, sa aspekta indikatora opšte kontaminacije (ukupan broj bakterija, ACC) i fekalne kontaminacije (broj *Enterobacteriaceae*, EBC), ali i prisustva patogenih bakterija (Atanassova *i sar.*, 2008; Avagnina *i sar.*, 2012; Mirceta *i sar.*, 2015). Ovo uključuje i prisustvo *Salmonella* spp. koja se smatra relevantnim biološkim hazardom za meso lovne divljači (Gortazar *i sar.*, 2007) i koja je ocenjena kao visoki prioritet u osiguranju bezbednosti mesa divlje svinje (EFSA, 2013a). Takve studije generišu značajne podatke koje mogu biti korišćene u oceni rizika od mesa divljači, ali sveukupno nedostaju u literaturi (Paulsen *i sar.*, 2012).

Glavni cilj ovog istraživanja bio je da se ispita mikrobiološki status mesa trupova divljih svinja analizom uzoraka prikupljenih od sveže odstreljenih životinja posle evisceracije, poreklom iz lovišta regiona jugozapadne Vojvodine. Dodatni cilj ovog istraživanja je bio da se ispita uticaj različitih faktora, kao što su lokacija ustrelne rane i higijenske procedure (evisceracija, pranje kože i uklanjanje dijafragme i peritoneuma), na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupova sveže odstreljenih divljih svinja, kako bi se izradile preporuke za razvoj i uvođenje odgovarajućih mera kontrole.

4.2.3. Materijal i metode

4.2.3.1. Životinje, procedure lova i obrade trupova

Istraživanje je sprovedeno u jesenjem periodu otvorene lovne sezone između oktobra i decembra, u regionu jugozapadne Vojvodine. Uzorci su sakupljeni u osam različitih lovnih gazdinstava (velika ograđena lovišta) koja su imala pripadajuće objekte za primarni prihvata, obradu i rasecanje trupova divljači. Ukupno 210 divljih svinja odstreljenih tokom zvaničnog lova je uzorkovano u ovom istraživanju, sa šest lovnih gazdinstava posećenih jednom i dva gazdinstva posećena tokom dva dana. Lov je obično izvođen sa fiksne pozicije („lov sa čeke“) i korišćeno je oružje sa olučenim cevima (minimalni kalibar 7x64 mm). Nakon završetka lova i prikupljanja odstreljenih životinja, evisceracija je vršena ili na terenu na mestu sabiranja trupova u slučaju dva lovišta (32% uzorkovanih životinja), ili su odstreljene životinje transportovane u pripadajući objekat za primarni prihvata i obradu trupova gde je vršena evisceracija i dalja obrada, u slučaju šest lovišta (68% uzorkovanih životinja). U ovom drugom slučaju, blizina lovišta i objekta za primarni prihvata i obradu trupova omogućavala je da se evisceracija izvrši u roku od 1,5 sat od ostrela. Međutim, u slučaju svih lovišta, eviscerirani i/ili neeviscerirani trupovi su transportovani u vozilima koja nisu bila opremljena ramovima za kačenje trupova, tako da su trupovi bili nagomilavani tokom transporta. Ukoliko je evisceracija vršena na terenu, životinje su obično bile obrađivane u ležećem položaju na zemlji, bez zaštite od kontaminacije sa zemlje ili fecesa. U objektima za obradu trupova, većina trupova je bila eviscerirana u visećem položaju kačenjem na ramove, a manji deo njih u ležećem položaju na podu. Kao mera za smanjenje kontaminacije, naročito u slučaju kada je dolazilo do ustreljivanja u regiju stomaka, kod više od 90% trupova je vršeno uklanjanje dijafragme i peritoneuma. Međutim, praksa pranja kože i unutrašnjih površina trupova nakon evisceracije je takođe sprovedena u tri lovna gazdinstva (37% uzorkovanih životinja). U svim slučajevima, period između ostrela divljih svinja i početka hlađenja trupova nije prelazio 3 sata. Nakon završetka uobičajene procedure lova i obrade trupova, svi trupovi su bili skladišteni u koži nekoliko dana pre otpremanja ili dalje obrade.

4.2.3.2. Procedure uzorkovanja

Uzorci sa koža i mesa trupova divljih svinja su uzimani od životinja nakon njihovog dovoženja na sabirno mesto na terenu ili u objektu za privremeni prihvata i obradu (zavisno od toga gde je evisceracija vršena) i to u okviru 1,5 sata od momenta odstrela. Za svaku uzorkovanu jedinku zabeleženi su podaci uključujući: (1) anatomsku lokaciju ustrelne rane (ispravan pogodak ili stomak); (2) vremenski uslovi (kišno ili suvo); i (3) vreme koje je proteklo između odstrela i evisceracije. Takođe, u cilju ocene uticaja higijenske prakse radnika na mikrobiološki status mesa obrađenih trupova, prikupljane su informacije vezane za: (1) nivo obuke radnika i higijenske prakse koja je vršena tokom evisceracije i obrade trupova (ili nedostaci istih); (2) korišćena tehnika evisceracije (na terenu ili u objektu za obradu, u visećem ili u ležećem položaju); i (3) primena pranja kože i unutrašnjih površina trupova posle evisceracije.

Uzimani su uzorci površine kože i unutrašnje površine mesa trupova, koristeći tehniku vlažnog brisa. Svaki sterilni sunđer (Nasco, Whirl-pack, Fort Atkinson, WI, USA) je bio natopljenom sa po 10 ml MRD (Maximum Recovery Diluent; Oxoid) pre uzimanja brisa. Tokom procedure uzorkovanja korišćene su sterilne rukavice za svaki uzorak kako bi se sprečila unakrsna kontaminacija. Uzorci brisa kože su prikupljeni neposredno pre evisceracije sa oko 1000 cm² površine kože (linija od zadnjeg skočnog zgloba - spoljna strana buta – perianalna regija – medijalna linija abdomena i grudi - vrat). Uzorci sa unutrašnje površine mesa trupova su uzimani u roku od 10 minuta nakon što su evisceracija i bilo koje druge procedure (tj. pranje kože i/ili uklanjanje dijafragme i peritoneuma) bile završene. Uzorci brisa mesa trupova su uzimani sa četiri mesta koja korespondentno odgovaraju lokaciji prethodno uzorkovane kože (npr. unutrašnje površine grudne duplje, trbušne duplje, buta i karlične regije), sunđerom sa pet uzastopnih prelaza površine od 100 cm² pomoću sterilnog kvadratnog plastičnog šablona za jednokratnu upotrebu. Brisevi poreklom sa svakog trupa su smeštani u posebne stomaher kese (Nasco, Whirl-pack, 19x30 cm; Fort Atkinson) i transportovani u laboratoriju u roku od 3 h u ručnom frižideru na 4°C.

4.2.3.3. Mikrobiološke analize

U svaku stomaher kesu sa brisom je bilo dodato 90 ml MRD i sadržaj je homogenizovan u digestoru tokom 1 minuta (easyMIX, BioMerieux, France), a dalja

decimalna razblaživanja su urađena u MRD (ISO metoda 6887: ISO, 2008a). Odgovarajuća razblaženja su dalje korišćena za mikrobiološke analize.

4.2.3.3.1. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija i broja Enterobacteriaceae

Za ukupan broj bakterija i broj *Enterobacteriaceae*, korišćene su ISO procedure 4833: 2008 (ISO, 2008b) i 21528-2:2009 (ISO, 2009).

4.2.3.3.2. Utvrđivanje *Salmonella* spp.

Izolacija i utvrđivanje *Salmonella* spp. je izvedena u skladu sa metodom ISO 6579: 2002 (ISO, 2002a). Sumnjive kolonije su dalje presejane na hranljivi agar i potvrđene biohemijski pomoću API-20E kita (BioMérieux, France) i serološki koristeći poli O serum (Pro-Lab Diagnostics, Canada).

4.2.3.4. Analiza rezultata

Za uzorke brisa površine kože i mesa trupa, ACC i EBC su izračunati kao cfu/cm² i konvertovani u log₁₀ cfu/cm². Za svaku odgovarajuću grupu uzoraka, srednja vrednost i standardna devijacija, kao i značajnost razlika između srednjih vrednosti (Studentov T-test) na bazi log₁₀ cfu/cm² vrednosti kako za ACC i EBC su izračunate pomoću IBM SPSS Statistics 20 (IBM, Armonk, NY, USA). Rezultati statističkih testova su obrađeni za stepen značajnosti od $P < 0,05$.

4.2.4. Rezultati i diskusija

4.2.4.1. Mikrobiološka kontaminacija kože i mesa trupova divlje svinje

Uzorci briseva površine kože i mesa trupa poreklom od ukupno 210 sveže odstreljenih divljih svinja su prikupljeni iz osam različitih lovnih gazdinstava. Srednja vrednost ACC i EBC na koži divljih svinja bila je 5,2 i 3,6 log₁₀ cfu/cm², a u rasponu od 2,0-8,4 log₁₀ cfu/cm² i 0,3-6,8 log₁₀ cfu/cm². Vremenski uslovi nisu značajno uticali na kontaminaciju kože divljih svinja. Neznatno veća vrednost ACC i EBC su utvrđene na površini mesa trupa i bile su 5,4 i 3,8 log₁₀ cfu/cm² (u rasponu od 2,4-7,9 log₁₀ cfu/cm² i 0,4-6,9 log₁₀ cfu/cm²) (Tabela 4.2.1). U

klanicama koje kolju domaće životinje, gde se curenje i razlivanje crevnog sadržaja javljaju veoma retko (pa čak i ako se dogode, u okviru HACCP-a su predviđene korektivne mere), koža je glavni izvor kontaminacije mesa trupova i to u relativno maloj proporciji ukupnog nivoa bakterija sa kože (Blagojević *i sar.*, 2011). Međutim, nalaz da je, u proseku, na mesu trupa divlje svinje utvrđen veći nivo ukupnog broja bakterija i broja *Enterobacteriaceae* u odnosu na nivoe utvrđene na koži, nije toliko iznenađujući s obzirom na uticaj razlivanja sadržaja creva kao posledice ustreljivanja u abdomen (iako u celini nije statistički značajno, Tabela 4.2.2) kao i drugih nehigijenskih postupaka (evisceracije koja je vršena na šumskom tlu nakon koje je prana koža i unutrašnje površine trupova). Takođe, moguće je da je prenos bakterija na suđer brisa tokom uzorkovanja sa prirodno vlažnijeg mesa trupa bio mnogo intenzivniji nego sa kože, koja je obično uprljana suvim blatom i fecesom (Blagojević *i sar.*, 2012). Osim toga, površina kože sa koje je bio uziman bris je 2,5 puta veća od površine sa koje je bio uziman bris mesa trupa, tako da je moguće da suđeri nisu bili u stanju da apsorbuju isti procenat bakterijske kontaminacije po cm². Druge studije su utvrdile niže nivoe vrednosti ACC i EBC na mesu trupova divlje svinje. Avagnina *i sar.* (2012) su utvrdili srednju vrednost ACC od 4,6 log₁₀ cfu/cm² i EBC od 3.0 log₁₀ cfu/cm² koristeći slične procedure uzorkovanja brisem kao u ovom istraživanju. Niže nivoe kontaminacije mesa trupova su našli Atanassova *i sar.* (2008) sa 3,2 log₁₀ cfu/cm² za ACC i 2,1 log₁₀ cfu/cm² za EBC (geometrijske srednje vrednosti) iako su autori koristili metod uzorkovanja isecanjem površine trupa (kojim se obično dobijaju više vrednosti nivoa bakterija), ali sa površine trupova nakon pažljivog uklanjanja malih delova kože.

Primećene su velike varijacije u mikrobiološkoj kontaminaciji mesa trupova između različitih lovišta i razlike su uglavnom bile značajne ($P < 0,05$). Srednje vrednosti ACC i EBC za različita lovišta su bile u rasponu od 3,9-6,0 log₁₀ cfu/cm² i 1,9-4,4 log₁₀ cfu/cm² (Tabela 4.2.1). Lovišta B, E i G su imala u proseku visinu kontaminacije mesa trupova > 6 log₁₀ cfu/cm² za ACC, i > 4 log₁₀ cfu/cm² za EBC (Tabela 4.2.1). Glavni razlog za tako visoku kontaminaciju mesa trupova divljih svinja u lovištima B i G je verovatno bila praksa pranja kože i unutrašnjih površina trupova nakon završene evisceracije i činjenica da je evisceracija vršena na terenu van objekta za obradu trupova, u ležećem položaju na zemlji. Sa druge strane, lovište E je karakterisala loša, nestandardizovana higijenska praksa (jedna trećina trupova je eviscerirana u ležećem položaju unutar objekta za obradu tokom drugog dana uzorkovanja), kao i neobučeni radnici (Tabela 4.2.3).

Ukupna prevalencija *Salmonella* spp. na koži odstreljenih divljih svinja je bila 1,4%, dok je na mesu trupova iznosila 1,9% (Tabela 4.2.1). Prema dostupnoj literaturi, ne postoje

objavljeni podaci o prisustvu *Salmonella* spp. na koži divljih svinja. Takođe, podaci iz literature o rasprostranjenosti *Salmonella* spp. na mesu trupova divljih svinja su oskudni i variraju od slučaja u Nemačkoj, Italiji i Austriji gde ovaj patogen nije detektovan (Atanassova *i sar.*, 2008; Avagnina *i sar.*, 2012; Paulsen i Winkelmayer, 2004) do 1,2% u Španiji (Díaz-Sánchez *i sar.*, 2013). Navedena istraživanja se mogu direktno porediti sa istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije jer je korišćena slična tehnika uzorkovanja, sem u Atanassova *i sar.* (2008), kao što je pomenuto ranije. Nedostatak detaljnijih studija o prisustvu *Salmonella* spp. kod divlje svinje onemogućava da se sa sigurnošću utvrdi da li koža predstavlja važan izvor kontaminacije mesa trupova divljih svinja ovim patogenom (kao što je to slučaj sa domaćim životinjama za klanje), u situacijama kada se sve druge procedure lova i obrade trupova divljači propisno vrše. Uz veoma malo pozitivnih nalaza kontaminacije sa *Salmonella* spp. na koži i mesu trupova divljih svinja (tj. samo 3 i 4 od 210 jedinki, tabela 4.2.1), nije moguće utvrditi jasnu vezu u odnosu koža-meso trupova u slučaju ovog patogena.

Tabela 4.2.1. Mikrobiološki status kože i mesa trupova sveže odstreljenih divljih svinja u osam različitih lovnih gazdinstava.

Lovno gazdinstvo	Evisceracija (lokacija/tehnika)	Pranje kože nakon evisceracije	Obučenos radnika i higijenski rad	Ukupan broj bakterija (ACC) ^a		Broj <i>Enterobacteriaceae</i> ^a		<i>Salmonella</i> spp. pozitivni nalazi (prevalencija, %)	
				koža	trup	koža	trup	koža	trup
A (n = 10)	Objekat / viseća	Da	Ne	6.6±0.3 ^A	4.3±0.5 ^C	2.9±0.8 ^{CD}	2.3±1.0 ^{DE}	0 (0.0)	0 (0.0)
B (n = 18)	Teren / ležeća	Da	Ne	6.4±1.1 ^A	6.0±0.9 ^A	4.1±1.0 ^B	4.4±1.2 ^A	0 (0.0)	2 (11.1)
C (n = 13)	Objekat / viseća	Ne	Da	6.3±1.2 ^A	5.1±1.6 ^{BC}	3.5±1.0 ^{BC}	3.1±1.6 ^{BCD}	2 (15.4)	2 (15.4)
D (n = 11)	Objekat /viseća	Ne	Da	4.9±0.4 ^C	3.9±0.3 ^D	2.2±0.5 ^E	1.9±0.6 ^E	0 (0.0)	0 (0.0)
E (n = 43) ^b	Objekat / viseća (dan 1), većinom ležeća (dan 2)	Ne	Ne	5.4±0.9 ^C	6.0±0.8 ^A	3.6±0.9 ^B	4.3±1.4 ^A	0 (0.0)	0 (0.0)
F (n = 42) ^b	Objekat / ležeća	Ne	Da (dan 1) Ne (dan 2)	4.1±0.8 ^D	4.9±0.8 ^B	3.1±0.9 ^C	3.7±1.0 ^B	0 (0.0)	0 (0.0)
G (n = 49)	Teren / ležeća	Da	Ne	5.7±0.7 ^B	6.0±1.0 ^A	4.7±0.6 ^A	4.4±1.1 ^A	1 (2.0)	0 (0.0)
H (n = 24)	Objekat / obe	Ne	Ne	4.1±1.0 ^D	4.9±0.9 ^{BC}	2.4±1.1 ^{DE}	3.1±0.8 ^C	0 (0.0)	0 (0.0)
Ukupno (n = 210)				5.2±1.2	5.4±1.1	3.6±1.2	3.8±1.3	3 (1.4)	4 (1.9)

n: broj uzorkovanih trupova;

^a srednja vrednost $\log_{10} \text{cfu/cm}^2 \pm$ standardna devijacija; u koloni, odsustvo zajedničkog slova znači statistički značajnu razliku između lovišta ($p < 0,05$);

^b lovište posećeno tokom dva dana.

4.2.4.2. Uticaj anatomske lokacije ustrelne rane na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupa

Ukupno, 73 jedinke (34,8%) su odstreljene nestručno (tj. pogodak je bio u regiju abdomena), a ta vrednost je između vrednosti dobijene u druge dve slične studije u kojima je 21% i 43% divljih svinja odstreljeno nestručno (Atanassova *i sar.*, 2008; Avagnina *i sar.*, 2012). Iako je lov sproveden sa fiksne pozicije (lov sa „čeke“), značajan broj neiskusnih učesnika lova verovatno je doprineo tako velikom broju pogodaka u regiju abdomena. Iako je srednja vrednost ACC i EBC kod jedinki koje su nestručno odstreljene bio veći u odnosu na ispravno odstreljene, razlika nije bila statistički značajna (Tabela 4.2.2).

Tabela 4.2.2. Uticaj mesta ustrela na mikrobiološki status mesa trupova odstreljenih divljih svinja uzorkovanih u lovištima gde je znatan broj jedinki odstreljen nestručno (pogođena regija abdomena).

Ispitivani faktori	Ukupan broj bakterija ^a	Broj <i>Enterobacteriaceae</i> ^a
<i>Mesto ustrela (ukupno svih 8 lovišta)</i>		
Ispravan pogodak (n = 137)	5,3±1,2 ^A	3,7±1,4 ^A
Pogodak u abdomen (n = 73)	5,5±1,0 ^A	4,0±1,2 ^A
<i>Lovište E</i>		
Ispravan pogodak (n = 22)	6,1±0,6 ^A	4,6±1,3 ^A
Pogodak u abdomen (n = 21)	5,9±1,0 ^A	4,1±1,4 ^A
<i>Lovište F</i>		
Ispravan pogodak (n = 25)	4,7±0,9 ^A	3,3±1,0 ^B
Pogodak u abdomen (n = 17)	5,1±0,7 ^A	4,1±1,0 ^A
<i>Lovište G</i>		
Ispravan pogodak (n = 41)	5,9±1,0 ^A	4,4±1,1 ^A
Pogodak u abdomen (n = 8)	6,2±0,7 ^A	4,5±1,2 ^A
<i>Lovište H</i>		
Ispravan pogodak (n = 10)	4,6±1,2 ^A	2,6±0,8 ^B
Pogodak u abdomen (n = 14)	5,2±0,7 ^A	3,4±0,5 ^A

n: broj uzorkovanih trupova;

^a srednja vrednost \log_{10} cfu/cm² ± standardna devijacija; u koloni, u okviru ispitivanog lovišta, odsustvo zajedničkog slova znači statistički značajnu razliku između dve grupe ($p < 0.05$).

Međutim, u pogledu različitih lovišta, broj nestručno odstreljenih životinja se razlikovao po pojedinim lovištima i kretao se od 0 do 58% u lovištu H. Kada se uzmu u obzir samo lovišta u kojima je znatan broj životinja nestručno odstreljen, EBC u lovištima F i H se

značajno razlikuje između vrednosti utvrđenih kod nestručno i stručno odstreljenih životinja i veći je za $0,8 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ (Tabela 4.2.2). Razumno je očekivati da će lokacija ustrelne rane imati veliki uticaj na ukupan mikrobiološki status mesa trupa divlje svinje. Atanassova i saradnici (2008) su utvrdili na mesu trupa vrednost ACC od $3,0 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ i EBC u nivou od $1,8 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ nakon pravilnog odstrela, u poređenju sa vrednostima od $3,9 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ za ACC i vrednosti od $2,4 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ za EBC kod divljih svinja odstreljenih u regiju stomaka. Slično zapažanje su izneli i Avagnina i sar. (2012) navodeći statistički značajno viši nivo ACC na mesu trupova kod jedinki koje su bile odstreljene u regiju stomaka. Drugi faktori od značaja, kao što su loša higijenska praksa tokom evisceracije, a posebno evisceracija na terenu i/ili na podu u ležećem položaju u objektu za primarni prihvati i obradu trupova divljači, kao i pranje evisceriranih trupova, moguće je da su prikrili negativan uticaj pogotka u abdomen na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupa divlje svinje.

4.2.4.3. Uticaj prakse obrade na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupa

Tokom ovog istraživanja primećene su različite prakse rukovanja i obrade trupova, kao što su evisceracija na tlu ili u visećem položaju, pranje kože i unutrašnjih površina trupova i uklanjanje dijafragme i peritoneuma. Do danas, čini se da nema sistematskih istraživanja koja bi ispitala koje higijenske prakse obrade trupova divljači zapravo dovode do smanjenja mikrobiološke kontaminacije mesa (Paulsen, 2011).

U pogledu lokacije gde je vršena evisceracija, 32% (67/210) odstreljenih divljih svinja (iz lovišta B i G) su eviscerirane na terenu na mestu prikupljanja u ležećem položaju na zemlji, i bez pristupa pijaćoj vodi. To je rezultiralo višim vrednostima ACC i EBC utvrđenim na mesu trupa za $0,9 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ u poređenju sa trupovima evisceriranim unutar objekata za obradu trupova, bez obzira na korišćenu tehniku ($p < 0,05$, Tabela 4.2.3). Dalje, kada se koristila ista tehnika evisceracije (u ležećem položaju) ali na različitim lokacijama/uslovima (na terenu bez pristupa čistoj vodi ili unutar objekata za obradu trupova uz bolju higijenu), utvrđen je značajan porast mikrobiološke kontaminacije sa ACC i EBC ($p < 0,05$) od $0,9 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ i $0,5 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ u slučaju divljih svinja evisceriranih na terenu (Tabela 4.2.3). U pogledu korišćene tehnike evisceracije, 66% (139/210) odstreljenih divljih svinja su bile eviscerirane u ležećem položaju (na terenu na tlu ili na podu unutar objekta za primarni prihvati i obradu trupova). Kontaminacija telesne šupljine i mišićnog tkiva nije bila sprečavana u najvećem broju slučajeva prilikom evisceracije u ležećem položaju, što je za posledicu imalo povećanje mikrobiološke kontaminacije površine mesa trupa za $0,3 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ i $1,0$

\log_{10} cfu/cm² za ACC i EBC ($p < 0,05$), poredeći sa 34% (71/210) trupova koji su bili eviscerirani u visećem položaju (svi unutar objekata za obradu trupova divljači). Slični odnosi su primećeni poređenjem samo mikrobiološkog statusa trupova evisceriranih unutar objekata za obradu, sa $3,1 \log_{10}$ cfu/cm² i $3,9 \log_{10}$ cfu/cm² *Enterobacteriaceae* utvrđenih na trupovima evisceriranim u visećem, odnosno ležećem položaju ($p < 0,05$, Tabela 4.2.3). Ukoliko se izvodi nepravilno, evisceracija predstavlja tačku sa visokim rizikom od mikrobiološke kontaminacije mesa trupa usled otvaranja i izlivanja crevnog sadržaja. Ovo, zajedno sa nepravilnim odstrelom (u regiju abdomena) i neadekvatnim hlađenjem trupa, se smatra da ima najveći značaj za mikrobiološki kvalitet proizvoda od mesa divljači (Gill, 2007; Paulsen, 2011). Zbog toga, tehnika evisceracije kada su trupovi okačeni na ram u visećem položaju i unutar objekta za obradu trupova gde se poštuju higijenske procedure, ima prednost u odnosu na evisceraciju u terenskim uslovima kada su trupovi položeni na zemlju, jer se kontaminacija telesnih šupljina i mesa sa zemljom i/ili fecesom lakše izbegava ili značajno smanjuje (Paulsen, 2011). Međutim, ukoliko evisceracija divljih svinja mora da se izvrši na terenu zbog udaljenosti objekta za obradu trupova, preporučuje se da se trupovi okače na ramove i evisceriraju u visećem položaju (Paulsen, 2011).

Međutim, neuobičajena praksa pranja kože i unutrašnjih površina trupova nakon evisceracije je primećena u tri lovišta (77 uzorkovanih životinja). Za pranje je bio korišćen aparat pod pritiskom sa ciljem da kožu divljih svinja „očisti“ do nivoa vizuelne čistoće pre smeštanja trupova na hlađenje. Međutim, ova nehigijenska praksa je za posledicu imala stvaranje veoma kontaminiranog aerosola i direktan prenos mikrobiološke kontaminacije sa kože na unutrašnje površine mesa trupova, što je značajno povećalo ACC i EBC na mesu trupa u proseku za više od $0,5 \log_{10}$ cfu/cm² ($p < 0,05$, Tabela 4.2.3.). Ovo je bilo naročito primetno u lovištima B i G, u kojima je evisceracija takođe bila vršena na terenu, van objekta za obradu trupova i u ležećem položaju (Tabela 4.2.1). Radnici u ova dva lovišta nisu bili adekvatno obučeni i pokazali su značajan nedostatak svesti u vezi sa higijenskom praksom tokom rukovanja trupovima divljih svinja. Pranje (i naknadno sušenje) prljavih goveda je standardna praksa pre klanja u nekim zemljama i klanicama, sa nepouzdanom antimikrobnom efikasnošću, ali sa ciljem da se ukloni vidljiva prljavština kako bi se olakšao proces skidanja kože (Blagojević *i sar.*, 2012).

S druge strane, praksa uklanjanja peritoneuma i dijafragme, koja se koristi za smanjenje kontaminacije telesnih šupljina sadržajem koji potiče iz digestivnog trakta zbog nestručnog pogotka i/ili nepravilno izvedene evisceracije, izvedena je na većini trupova (oko 90% njih) i značajno je unapredila njihov mikrobiološki status u odnosu na EBC ($p < 0,05$,

Tabela 4.2.3). Ipak, činjenica da ova mera kontrole sama nije mogla da doprinese boljem mikrobiološkom statusu mesa trupova (Tabela 4.2.3), jasno ukazuje na to da se malo šta može poboljšati ukoliko su ostali postupci obrade trupova bili neadekvatni, kao što je to bio slučaj u ovom istraživanju.

Značaj pravilne obuke radnika i njihovog striktnog pridržavanja dobre higijenske prakse tokom rukovanja i obrade trupova je dobro prikazan u slučaju dva lovišta (lovište E i F) koja su bila posećena tokom dva različita dana uzorkovanja. U oba lovišta, sličan broj životinja je bio odstreljen u regiju abdomena tokom oba dana i pranje kože nije bilo vršeno, pa je stoga jedina razlika između dva dana uzorkovanja u svakom lovištu bila u pogledu nivoa obuke radnika i primenjene higijenske prakse. Primetno različite prakse rukovanja i obrade trupova viđene su tokom oba dana, što se ogleda u različitim nivoima mikrobiološke kontaminacije (Tabela 4.2.3). Na primer, nivo *Enterobacteriaceae* utvrđen drugog dana u lovištu E je iznosio čak $5,3 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ i bio je viši od nivoa utvrđenog prvog dana za više od $2 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$. Mogući razlog je bio da su radnici tokom drugog dana primenjivali veoma nehigijensku praksu obrade trupova gde je većina njih eviscerirana u ležećem položaju na podu i bez uklanjanja dijafragme i peritoneuma, ali i sa veoma lošom higijenom noževa i ruku. S druge strane, svi trupovi obrađeni tokom prvog dana su eviscerirani u visećem položaju i uklanjana je dijafragma i peritoneum, dok je pranje ruku i noževa bilo nešto češće nego drugog dana. U lovištu F, slična tehnika evisceracije (u ležećem položaju na podu unutar objekta za obradu) i postupak uklanjanja dijafragme i peritoneuma su bili vršeni tokom oba dana. Međutim, različiti radnici su bili zaposleni oba dana i pokazali su različit nivo higijene (tokom 1. dana, radnici su bili propisno obučeni i potpuno su se pridržavali principa GHP, za razliku od 2. dana kada su neobučeni radnici primenjivali veoma nehigijensku praksu obrade). To je dovelo do razlike u broju *Enterobacteriaceae* od $1,5 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ (Tabela 4.2.3).

Uprkos higijenskom radu u rukovanju i obradi trupova divljih svinja u nekim lovištima, što je rezultiralo nižim nivoima mikrobiološke kontaminacije trupova u tim lovištima, mikrobiološki status trupova većine divljih svinja bio je daleko od željenog i preko limita iz mikrobioloških kriterijuma procesne higijene uspostavljenih za meso trupova domačih svinja (Tabela 4.2.4). U tom smislu, jasno je da samo pridržavanje uobičajenih principa dobre higijenske prakse možda nije uvek dovoljno u ovom zahtevnom procesu proizvodnje mesa divljači kako bi se osigurao odgovarajući mikrobiološki kvalitet finalnog proizvoda. Pored osnovnih principa higijene procesa zasnovanih na merama za smanjenje mikrobioloških rizika, trebalo bi razmotriti određene dodatne procedure, kao što su dekontaminacija kože i/ili trupova (Antic *i sar.*, 2011). One bi mogle da se koriste kao

dopunske strategije „višestrukih prepreka“ za kontrolu mikrobiološke kontaminacije trupova divljih svinja, ali svakako ne mogu da budu zamena za dobru higijensku praksu (EFSA, 2013a).

Tabela 4.2.3. Uticaj različitih ispitivanih praksi obrade trupova na mikrobiološki status mesa trupova odstreljenih divljih svinja.

Ispitivani faktori	Ukupan broj bakterija ^a	Broj <i>Enterobacteriaceae</i> ^a
<i>Lokacija evisceracije ukupno (n = 210)</i>		
Na terenu (n = 67)	6.0±0.9 ^A	4.4±1.1 ^A
Unutar objekta za obradu (n = 143)	5.1±1.1 ^B	3.5±1.3 ^B
<i>Evisceracija u ležećem položaju (n = 139)</i>		
Na terenu (n = 67)	6.0±0.9 ^A	4.4±1.1 ^A
Unutar objekta za obradu (n = 72)	5.1±0.9 ^B	3.9±1.3 ^B
<i>Tehnika evisceracije ukupno (n = 210)</i>		
Ležeći položaj (n = 139)	5.5±1.0 ^A	4.1±1.2 ^A
Viseći položaj (n = 71)	5.2±1.3 ^B	3.1±1.3 ^B
<i>Tehnika evisceracije korišćena unutar objekta za obradu (n = 143)</i>		
Ležeći položaj (n = 72)	5.1±0.9 ^A	3.9±1.3 ^A
Viseći položaj (n = 71)	5.2±1.3 ^A	3.1±1.3 ^B
<i>Pranje kože i unutrašnjih površina trupova nakon evisceracije (n = 210)</i>		
Da (n = 77)	5.8±1.1 ^A	4.1±1.3 ^A
Ne (n = 133)	5.2±1.1 ^B	3.6±1.3 ^B
<i>Procedura uklanjanja dijafragme i peritoneuma (n = 210)</i>		
Da (n = 188)	5.4±1.1 ^A	3.7±1.3 ^B
Ne (n = 22)	5.5±0.8 ^A	4.6±1.3 ^A
<i>Razlike u danu uzorkovanja/posmatranoj praksi^b</i>		
Lovište E dan 1 (n = 20)	6.3±1.0 ^A	3.2±0.9 ^B
Lovište E dan 2 (n = 23)	5.7±0.5 ^B	5.3±0.9 ^A
Lovište F dan 1 (n = 21)	4.5±0.9 ^B	2.9±0.9 ^B
Lovište F dan 2 (n = 21)	5.3±0.5 ^A	4.4±0.6 ^A

n: broj uzorkovanih trupova;

^a srednja vrednost \log_{10} cfu/cm² ± standardna devijacija; u koloni, u okviru posmatrane prakse, odsustvo zajedničkog slova znači statistički značajnu razliku između dve grupe ($p < 0,05$);

^b podaci o prethodnoj obuci radnika i korišćenoj higijenskoj praksi tokom obrade trupova su dati u tekstu.

4.2.4.4. Usklađenost rezultata testiranja mesa trupova divljih svinja sa kriterijumima procesne higijene uspostavljenim za trupove domaćih svinja

U cilju verifikacije higijene procesa obrade trupova divljih svinja i u cilju poboljšanja bezbednosti mesa, uspostavljanje mikrobioloških kriterijuma za meso divljih svinja bi moglo da bude korisno (Paulsen, 2011). Trupovima divljih svinja se obično skida koža (izuzev ako ne idu na hlađenje kao trupovi u koži), dok trupovi domaćih svinja uglavnom prolaze proces šurenja, depilacije i opaljivanja i koža ostaje deo finalnog trupa. Iz tog razloga, mikrobiološki limiti uspostavljeni za kriterijume procesne higijene u regulativi EU, za trupove životinja kojima se koža uvek skida u klanicama (na primer kod goveda), mogli bi isto tako biti pogodni za primenu i za meso trupova divljih svinja. Ipak, ukoliko se pojedinačne utvrđene mikrobiološke vrednosti kontaminacije trupova divljih svinja iz ovog istraživanja uporede sa trenutnim kriterijumima procesne higijene za meso trupova domaćih svinja (EC, 2007), otprilike dve trećine trupova testiranih u ovom istraživanju bi bilo u nezadovoljavajućoj kategoriji u odnosu na ACC i EBC (Tabela 4.2.4). Čak i ukoliko bi se gornja granica za ACC postavila na $6 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$, kao što je sugerisano od Paulsen (2011), 61 uzorak (29%) i dalje bi bio u nezadovoljavajućoj kategoriji. S druge strane, testiranje na prisustvo *Salmonella* spp. na mesu trupova domaćih svinja se takođe koristi kao kriterijum procesne higijene sa dozvoljenim vrednostima da 3/50 trupova bude pozitivno (EC, 2014). U tom smislu, sporadičan nalaz *Salmonella* spp. pozitivnih trupova divljih svinja u ovom istraživanju (2/18 u lovištu B i 2/13 u lovištu C) verovatno bi mogao ukazivati na to da bi se procesna higijena u ova dva lovišta mogla okarakterisati kao nezadovoljavajuća, a u preostalih šest lovišta kao zadovoljavajuća, iako većina lovišta ne bi bila u skladu sa limitima za ACC i EBC (Tabela 4.2.1). Ova nedoslednost između rezultata dobijenih testiranjem za indikatore opšte i fekalne kontaminacije i testiranja za patogene, potvrđuje neprikladnost testiranja zasnovanog na prisustvu/odsustvu patogena u oceni higijenskih performansi proizvodnog procesa (Blagojević *i sar.*, 2011). Ovo bi moglo biti od posebnog značaja za lovišta sa malim brojem odstreljenih životinja i koja bi mogla biti izuzeta od uobičajenog mikrobiološkog testiranja.

Tabela 4.2.4. Usklađenost ukupnog broja bakterija i broja *Enterobacteriaceae* utvrđenih na mesu trupova divljih svinja (n=210) poređenjem sa kriterijumima procesne higijene za meso trupova domaćih svinja po Regulativi (EC) No. 1441/2007 (EC, 2007).

Kategorije po kriterijumima procesne higijene	Ukupan broj bakterija ^a	Broj <i>Enterobacteriaceae</i> ^a
Prihvatljivo (≤ 4 ^a ; $\leq 2 \log_{10}$ cfu/cm ² ^b)	33 (15,7%)	24 (11,4%)
Marginalno (4-5 ^a ; 2-3 \log_{10} cfu/cm ² ^b)	36 (17,1%)	44 (21,0%)
Neprihvatljivo (>5 ^a ; $> 3 \log_{10}$ cfu/cm ² ^b)	141 (67,2%)	142 (67,6%)

^a granične vrednosti za ukupan broj bakterija;

^b granične vrednosti za broj *Enterobacteriaceae*.

4.2.5. Zaključak

Ovo istraživanje je identifikovalo i po prvi put analiziralo uticaj niza različitih praksi rukovanja i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status. Nalaz da je većina trupova divljih svinja imala veoma visoke nivoe mikrobiološke kontaminacije izraženo kroz ukupan broj bakterija i broj *Enterobacteriaceae* naglašava potrebu za uvođenjem i strogim pridržavanjem dobre higijenske prakse u lovnim gazdinstvima i objektima za primarni prihvati i obradu trupova divljači. Neke prakse, kao što su pranje kože i unutrašnjih površina trupova i evisceracija na terenu u ležećem položaju treba izbegavati, a takođe je neophodno sprovesti obuke lovaca i radnika uključenih u lanac mesa divlje svinje. Registrovana lovna gazdinstva i objekti za obradu mesa divljači imaju odnosne odgovornosti u osiguranju bezbednosti mesa divljači i moraju biti usklađeni sa svim regulatornim zahtevima kada meso divljači stavljaju u promet. Da bi se proces proizvodnje mesa divljači olakšao, neophodno ga je učiniti transparentnijim i merljivim, te mikrobiološki kriterijumi procesne higijene treba da budu razvijeni i uspostavljeni za meso divljači kao što je to trenutno slučaj sa drugim vrstama životinjska za dobijanje mesa. To bi omogućilo lovnim gazdinstvima i objektima za primarni prihvati i obradu trupova divljači da imaju jasne ciljeve performanse koji bi im omogućili da rade na zadovoljavajući način, kako bi se postigao željeni mikrobiološki kvalitet finalnog proizvoda i zaštitilo javno zdravlje.

5. UKUPNA DISKUSIJA

Ovo istraživanje je sprovedeno sa osnovnom idejom da se dobiju prvi naučni podaci o prisustvu i raširenosti *Salmonella enterica* u divljih svinja, u većem broju lovišta u Srbiji, sa ciljem ocene izloženosti potrošača ovom značajnom alimentarnom patogenu putem mesa divlje svinje. Istraživanja o alimentarnim patogenima poreklom iz divljih svinja generalno nedostaju u literaturi, dok u Srbiji dosad nije sprovedeno jedno ovakvo istraživanje. Iako je ukupni udeo mesa divlje svinje u potrošnji relativno nizak kada se posmatra ukupna populacija ljudi u Srbiji, što bi ukazivalo na relativno nizak rizik od alimentarnih bolesti uzrokovanih konzumacijom ovog mesa, za pojedine kategorije stanovništva koje ovo meso konzumiraju veoma često, ovaj rizik može biti veoma visok. Dodatni faktori koji doprinosi ovome su i činjenice da:

- procedura lova i obrade trupova divljih svinja često nisu najbolje sa aspekta smanjenja mikrobiološke kontaminacije mesa trupova;
- ne postoje jasnije regulisani kriterijumi proizvodnje mesa divljači, već se često proces oslanja na prevaziđene tradicionalne metode koje najčešće ne doprinose osiguranju bezbednosti mesa divljači;
- u nedostatku jasnije regulative (i mikrobioloških kriterijuma kojima bi se proces mogao objektivnije ocenjivati), vodiči dobre lovne i higijenske prakse bi mogli biti korisni, ali nedostaju i oni;
- meso divljih svinja se često koristi za pripremu sirovih proizvoda od mesa, uključujući sirove fermentisane kobasice i suvomesnate proizvode, dakle bez ikakve termičke obrade;
- edukacija lovaca, ljudi koji vrše obradu trupova divljih svinja i potrošača ove vrste mesa nije adekvatna da bi se rizik od pojave alimentarnih bolesti povezan sa ovom vrstom mesa smanjio na prihvatljiv nivo.

Takođe, epidemiološka istraživanja alimentarnih patogena u divljači uključujući primenu molekularnih metode su retka, i nisu dosad sprovedena u Srbiji. S obzirom da je poznato da divlje svinje i domaće farmske životinje često mogu dolaziti u kontakt i tako prenositi patogene iz jednog u drugo životno stanište, jedan od glavnih aspekata ovog istraživanja je bio da se utvrde izvori i putevi infekcija sa *Salmonella enterica* u divljih svinja, opservacijom njihovog ponašanja, staništa u kome žive, kao i primenom molekularnih metoda praćenja ovog patogena.

5.1. Prisustvo, karakterizacija i epidemiologija *Salmonella enterica* u divljih svinja

U cilju boljeg sagledavanja raširenosti infekcije sa *Salmonella enterica* u populaciji divljih svinja, obuhvaćen je veliki broj lovišta različitog tipa (otvorena i ograđena), kao i oko 1/4 odstreljenih divljih svinja različitih starosnih kategorija u ovim lovištima, tokom dužeg vremenskog perioda. Feces i mezenterijalni limfni čvorovi su uzorkovani sa ciljem utvrđivanja raširenosti infekcije, dok su brisevi kože i mesa trupova uzorkovani da bi se ocenili higijenski aspekti procesa lova i dalje obrade trupova divljih svinja.

Utvrđena je relativno niska prevalencija *Salmonella enterica* u populaciji divljih svinja od 4,2%, s tim da je u dve trećine lovišta bilo pozitivno. U odnosu na vrstu uzorka, u fecesu je utvrđen najviši procenat 3,1%, dok su koža i meso trupa bili znatno manje kontaminirani (0,7% i 0,9%). Kod samo jedne životinje je *Salmonella* utvrđena u mezenterijalnom limfnom čvoru (0,2%). Ovi rezultati su relativno slični u poređenju sa sličnim studijama, a naročito sa istraživanjima sprovedenim u drugim ravničarskim lovištima kontinentalne Evrope.

Utvrđen je dominantan serotip *S. Enteritidis* (71,4%), dok su manje bili zastupljeni serotipovi *S. Typhimurium* (23,8%) i *S. Infantis* (4,8%). Struktura izolovanih serotipova se razlikuje u odnosu na druga istraživanja kod divljih svinja gde je *S. Enteritidis* uglavnom ređe izolovana. Međutim, ovaj nalaz se poklapa sa istraživanjima prisustva serotipova *Salmonella enterica* kod domaćih svinja istog geografskog porekla. Ovakvi nalazi nagoveštavaju da je profil serotipova *Salmonella enterica* vezan za region porekla i ukazuju na mogućnost prenosa patogena između domaćih i divljih životinja.

Tokom istraživanja posmatrani su različiti faktori koji mogu imati uticaj na raširenost *Salmonella enterica*, kako vezani za same osobenosti jedinke (pol, starost, težina), tako i vezano za tehniku lova i praksu obrade trupova (mesto ustrela, broj ustrelnih rana, praksa uklanjanja peritoneuma i dijafragme, pranje kože, lokacija i tehnika evisceracije, i formalna obučenosť radnika). Takođe posmatrani su faktori tipa lovišta i vremenske prilike. Mora se naglasiti, ipak, da sveukupno relativno nizak nalaz *Salmonella* (18 jedinki, od kojih 3 pozitivno na koži, a 4 na mesu trupova) do izvesne mere ograničava izvođenje čvršćih zaključaka o uticaju odnosnih faktora na prisustvo *Salmonella*, ali se određene indikacije ipak mogu sagledati nakon statističke analize dobijenih podataka.

Utvrđeno je da se u kategoriji visokog rizika od infekcije sa *Salmonella* javljaju starije ženske jedinke, dok povreda trbušne duplje, broj ustreljivih rana i vremenske prilike imaju uticaj na povećanje prevalencije *Salmonella* na koži ali ne i na mesu trupova. Veća prevalencija kod jedinki ženskog pola je prijavljivana u literaturi, dok je veća prevalencija kod odraslih u suprotnosti sa literaturnim izveštajima. Ovaj nalaz se uklapa u ponašanje ženskih jedinki koje su posmatrane u lovištima tokom ovog istraživanja (imaju povećanu potrebu za unosom proteina tokom perioda dojenja, te su često u potrazi za hranom i obilaze velika područja lovišta čime su pod većim rizikom da dođu u kontakt sa hranom kontaminiranom sa *Salmonella*). Tokom tog perioda hrane se i leševima drugih divljih životinja, a čak i nepropisno uklonjenih leševa domaćih životinja, što sve značajno doprinosi prenosu ovog patogena. Vremenske prilike imaju statistički značajan uticaj na utvrđenu prevalenciju ovog patogena, verovatno zbog bolje prenosivosti bakterija na bris sa mokre nego sa suve kože.

Drugi značajan aspekt ovog dela istraživanja bio je da se razjasni epidemiologija *Salmonella enterica* u lovištima u Srbiji, identifikuju izvori infekcije i putevi njenog kretanja. Za tu svrhu, korišćena je metoda karakterizacije dobijenih izolata *Salmonella* spp. poreklom od divljih svinja, kao i izolata ovog patogena poreklom iz domaćih svinja i živine sa farmi koje su se graničile sa ispitivanim lovištima, a gde su izolati dobijeni iz ranijih istraživanja. Sveukupno, molekularna karakterizacija izolata *Salmonella enterica* metodom elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE) omogućila je da se donese nekoliko važnih zaključaka:

- identičan profil *Salmonella enterica* (serotipa Typhimurium) je utvrđen u fecesu i na površini mesa trupa iste divlje svinje, čime je dokazan prenos ovog patogena originalno poreklom iz fecesa na površinu mesa trupa kao posledica procesa obrade (evisceracije);
- identičan profil *Salmonella enterica* (serotipa Enteritidis) je utvrđen kod divljih svinja poreklom iz različitih lovišta, što može ukazivati na cirkulisanje ovih sojeva između ograđenih i otvorenih lovišta kao i između lovišta udaljenih i do preko 100 km, putem direktnog kontakta između divljih svinja ili prenosom vektorima;
- identičan profil *Salmonella enterica* (serotipa Typhimurium) je utvrđen kod divljih svinja i domaćih svinja poreklom sa obližnje farme (20 km udaljenosti). Takođe, visoka srodnost je utvrđena između izolata serotipa Enteritidis kod divljih svinja i živine sa farme u okolini lovišta, i između izolata serotipa Infantis poreklom iz divljih svinja i domaćih svinja sa obližnje farme. Ovo ukazuje na jasno postojanje genetske veze (naročito u slučaju *S. Typhimurium* i *S. Infantis*), kao i mogućnost

postojanja epidemiološke veze između divljih svinja i domaćih životinja u pogledu *Salmonella enterica*.

Iako su ovi nalazi bazirani na relativno malom broju pozitivnih izolata, s obzirom da nedostaju u dostupnoj literaturi, oni daju novi uvid u puteve kretanja alimentarnih patogena u lancu mesa divljači. Takođe, identifikacija izvora i puteva kretanja *Salmonella enterica* u lancu mesa divlje svinje u lovištima u Srbiji je veoma važna sa aspekta razumevanja koje kontrolne strategije treba primeniti sa ciljem smanjenja rizika od ovog mikrobiološkog hazarda za potrošače. Nalaz prenosa *Salmonella enterica* iz fecesa na meso trupa divlje svinje, potvrđuje sumnje da se kontaminacija mesa trupova kao posledica loše higijenske prakse verovatno redovno dešava. Ovaj nalaz je potvrđen kod samo jedne životinje, od ukupno dve kod kojih je *Salmonella enterica* utvrđena na više od jednog uzorkovanog mesta. Međutim, interesantno je da je ta životinja bila stručno odstreljena (jedan hitac u glavu), ali je evisceracija bila obavljena u ležećem položaju na terenu van objekta za primarni prihvata i bez pridržavanja dobre higijenske prakse tokom obrade trupa. Stoga, verovatni uzrok kontaminacije površine mesa trupa je bio prolivanje sadržaja creva tokom loše izvedene evisceracije.

Literaturni izvori navode da u otvorenim planinskim lovištima, gde obično nedostaju domaće svinje, divlje svinje imaju ulogu jedinog značajnog domaćina za *Salmonella enterica*, gde održavaju aktivnu infekciju i cirkulaciju patogena. Međutim, u ravničarskim geografskim područjima (kao što je slučaj u ovom istraživanju), situacija je drugačija. Identični i/ili visoko srodni PFGE profili utvrđeni kod divljih svinja između različitih lovišta, kao i divljih svinja i domaćih životinja (svinje i živina), ukazuju na postojanje genetskih i potencijalno epidemioloških veza u pogledu ovog patogena u lovištima u Vojvodini. Divlje svinje iz otvorenih lovišta mogu se mešati sa svinjama iz ograđenih lovišta. Takođe, divlje svinje iz otvorenog lovišta mogu lako doći u kontakt sa domaćim životinjama zbog prirode ravničarskog terena Vojvodine, i neki zoonotski patogeni (kao *Trichinella spiralis*) na području Vojvodine cirkulišu od domaćih svinja ka divljim svinjama i u suprotnom smeru. Jedan od bitnih epidemioloških faktora kod divljih svinja je njihovo karakteristično ponašanje, jer su navikle na prisustvo ljudi i često gravitiraju ka prigradskim naseljima gde pronalaze izvore hrane. Divlje svinje često menjaju svoja hranidbena područja, pa važan izvor patogena za divlje svinje može biti i otpad domaćih životinja, koji se može pronaći u područjima sa neadekvatnom veterinarsko-sanitarnom kontrolom (što je bio slučaj i u ovom istraživanju). Iako ovde nisu korišćene dodatne epidemiološke metode kojima bi se napravila jasna

epidemiološka veza između divljih svinja i domaćih životinja sa okolnih farmi, uspostavljena je genetska veza i jasne indikacije da određene nedozvoljene prakse doprinose širenju ovog patogena u oba smera.

Sveukupno, može se reći da je ovaj deo istraživanja doprineo boljem sagledavanju raširenosti infekcije divljih svinja sa *Salmonella enterica* i identifikacije faktora koji tome doprinose u lovištima u Srbiji.

5.2. Mikrobiološki status mesa trupova divljih svinja

U cilju karakterizacije procesa lova i procedura obrade trupova divljih svinja, sa aspekata higijenskog i mikrobiološkog statusa, uzorkovani su brisevi kože i unutrašnjih površina mesa trupova divljih svinja u većem broju lovnih gazdinstava. Kao referentne grupe mikroorganizama, ispitivani su indikatori opšte kontaminacije, odnosno nivoi ukupnog broja bakterija (ACC), kao i indikatori fekalne kontaminacije, odnosno broj *Enterobacteriaceae* (EBC).

Utvrđene prosečne vrednosti ACC i EBC na koži su bile 5,2 i 3,6 \log_{10} cfu/cm², a na mesu trupova 5,4 i 3,8 \log_{10} cfu/cm², što je za do 2 \log_{10} viši nalaz na mesu trupova u odnosu na dva slična ranija istraživanja. Podataka o kontaminaciji kože u dostupnoj literaturi ranije nije bilo, tako da je ovo prvo istraživanje koje se bavi mikrobiološkom kontaminacijom kože divljih svinja. Iako se smatra da je koža glavni izvor mikrobiološke kontaminacije mesa trupova domaćih životinja u klanicama, ovde to nije bio slučaj kada se analiziraju nivoi bakterija na koži i dobijenom trupu. Nalaz da je, u proseku, na mesu trupa divlje svinje utvrđen veći nivo ACC i EBC u odnosu na nivo utvrđene na koži, nije toliko iznenađujući s obzirom na uticaj razlivanja sadržaja creva kao posledice ustreljivanja u abdomen kao i drugih nehigijenskih postupaka tokom obrade trupova.

Utvrđene su i velike razlike u mikrobiološkom statusu trupova između različitih lovišta, što se može pripisati značajnim razlikama u korišćenim praksama lova i obrade trupova. Pretežna tehnika lova na teritoriji Vojvodine je sa čeke u ograđenom delu, iz razloga tendencije smeštanja populacija divljih svinja u ograđena lovišta radi lakšeg rukovanja jedinkama i smanjenja šteta koje korisnici lovišta moraju da refundiraju poljoprivrednim proizvođačima. Iako je lov za različite kategorije dozvoljen tokom skoro cele godine, najveći

broj jedinki se odstrelili tokom novembra i decembra, dakle uglavnom u vlažnijem delu godine. Međutim, vremenske prilike sveukupno nisu imale uticaj na mikrobiološku kontaminaciju mesa trupova. Sa druge strane, mesto ustrelne rane je imalo određeni uticaj na ukupni mikrobiološki status mesa trupa. Kada se analizira na ukupnom nivou, ne može se videti statistički značajna razlika između ispravnog pogotka i pogotka u abdomen, jer su verovatno drugi faktori imali dodatni uticaj i maskirali ovaj aspekt. Međutim, poređenjem na nivou pojedinih lovišta, jasno se primećuje da lovišta sa nižim nivoima ukupne kontaminacije (gde druge prakse nisu imale dodatni uticaj na mikrobiološku kontaminaciju) imaju statistički značajnu razliku između grupe sa ispravnim pogotkom i grupe sa pogotkom u abdomen u pogledu EBC. Ovo se podudara sa drugim sličnim studijama gde se ističe važnost pravilnog pogotka u cilju izbegavanja probijanja trbušnog zida i creva kako bi se izbegla značajna mikrobiološka kontaminacija mesa trupova.

Pored procedura lova i odstrela, veoma važan aspekt je i način rukovanja i obrade trupova divljih svinja. U ovom istraživanju je primećena velika razlika u primenjenim praksama između lovišta i jasno su utvrđene tendencije više kontaminacije trupova kada su bile primenjene određene nehigijenske procedure. Na viši nivo mikrobiološke kontaminacije je najviše uticala procedura evisceracije na terenu na otvorenom u ležećem položaju na zemlji i bez dostupne čiste vode, kao i veoma nehigijenska praksa pranja kože i unutrašnjih površina trupova nakon obavljene evisceracije. Ovo je povezano sa činjenicom da većina radnika u lovištima nije imala nikakvu prethodnu obuku iz higijenskog rada sa trupovima, a u pojedinim slučajevima su prikazivali potpuni nedostatak svesti i brige o higijenskim procedurama. Sa druge strane, praksa uklanjanja peritoneuma i dijafragme nakon svih obavljenih procedura obrade je imala pozitivan efekat u smanjenju mikrobiološke kontaminacije sa EBC. Generalni problem procedura rukovanja i obrade divljači u lovnim gazdinstvima predstavlja činjenica da se lovci i radnici oslanjaju na tradicionalne prakse koje često ne doprinose osiguranju bezbednosti ovog mesa već, nasuprot, povećavaju nivo mikrobioloških rizika.

Sveukupno, ovaj deo istraživanja daje prve detaljnije podatke o uticaju pojedinih procedura rukovanja i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status.

5.3. Kontrolne mere za *Salmonella enterica* u lancu mesa divlje svinje

U okviru ovog istraživanja je identifikovano nekoliko aspekata koji čine meso divlje svinje potencijalno visoko rizičnim za potrošače. Iz tog razloga, mogu se doneti neke preporuke kako da se ova situacija prevaziđe i mikrobiološki status mesa divlje svinje unapredi, posebno sa aspekta korišćenja ovog mesa za pripremanje proizvoda koji ne podležu termičkom tretmanu.

Nalaz da postoji cirkulacija *Salmonella enterica* između divljih svinja i domaćih životinja sa farmi i malih seoskih gazdinstava u okolini istraživanih lovnih gazdinstava, ukazuje da su potrebne mere kontrole kako bi se ovi kontakti smanjili na veoma nizak nivo, kao i identifikovali *Salmonella* pozitivni zapati divljih svinja. Monitoring prisustva infekcije i/ili kontaminacije sa *Salmonella enterica* u lovnim gazdinstvima i izrada profila pozitivnih zapata na osnovu monitoringa fecesa živih i odstreljenih jedinki bio bi koristan da se kategorišu lovna gazdinstva na osnovu nivoa rizika. Takođe je potrebno sprečiti nesmetano kretanje jedinki iz otvorenog lovišta ka jedinkama u ograđenom lovištu putem uskočnih rampi, koje su tehnički objekat u svakom ograđenom lovištu, formiranjem internih karantinskih separata. Pojačana veterinarsko sanitarna kontrola malih seoskih gazdinstava, posebno sa aspekta odlaganja leševa i drugog otpada životinjskog porekla, bi omogućila sprečavanje ili smanjenje cirkulacije *Salmonella* između divljih i domaćih životinja.

Od izuzetnog značaja je razvoj i primena vodiča dobre lovne i higijenske prakse kojima bi se unapredile i ujednačile higijenske procedure rukovanja i obrade trupova divljači u svim lovnim gazdinstvima u Srbiji. Obuka lovaca i radnika koji rukuju i obrađuju trupove je neophodna i bitan preduslov higijenskog rada, koji bi morao da bude uslov da bi se lovna gazdinstva i objekti za primarni prihvrat divljači mogli registrovati. S obzirom da u Srbiji ne postoji pravilnik koji propisuje obaveznu obuku radnika u lovištima ili lovaca iz dobre prakse sa odstreljenim jedinkama, potrebno je u tom smislu izvršiti i dopune regulative. Prakse kao što su evisceracija na terenu u ležećem položaju na zemlji, kao i pranje kože, treba obeshrabrivati. Ukoliko evisceracija mora da se izvrši na mestu sakupljanja trupova na terenu zbog udaljenosti objekata za obradu trupova, ona se mora vršiti u visećem položaju primenom svih higijenskih mera da se spreči kontaminacija mesa trupova poreklom iz digestivnog trakta ili sa kože. Dodatno je uvek preporučljivo vršiti uklanjanje peritoneuma i dijafragme radi

uklanjanja površinske kontaminacije unutrašnjih površina trupova. Jedinke kod kojih je došlo do prolivanja sadržaja digestivnog trakta zbog ustrelne rane u predelu abdomena ili grešaka tokom obrade trupa, trebale bi da se tretiraju kao uslovno upotrebljive samo za proizvode od mesa koji se podvrgavaju termičkom tretmanu.

U cilju verifikacije higijene procesa obrade trupova divljih svinja i u cilju poboljšanja bezbednosti mesa, uspostavljanje mikrobioloških kriterijuma za meso divljih svinja bi moglo biti korisno. Uvođenje jasnih, objektivnih i merljivih mikrobioloških kriterijuma bi omogućilo lovnim gazdinstvima i objektima za primarni prihvata i obradu trupova divljači da imaju jasne ciljeve performanse, a bilo bi moguće i kategorisanje različitih lovnih gazdinstava prema nivou rizika za javno zdravlje. Način dobijanja mesa lovne divljači i specifičnosti koje izdvajaju ovaj proces, moraju se uzeti u obzir u procesu naučnog uspostavljanja mikrobioloških kriterijuma. Pojedini autori daju preporuke da se mikrobiološki kriterijumi za krupnu divljač uspostave u nivoima višim za $1 \log_{10}$ u odnosu na meso trupova domaćih životinja, što je generalno potvrđeno i u ovom istraživanju, čak i u slučaju lovnih gazdinstava gde je primenjena najbolja higijenska praksa.

5.4. Značaj rezultata i potreba za daljim istraživanjima

Sveukupno, može se reći da je glavni rezultat i doprinos ovog istraživanja obezbeđivanje prve detaljne naučne informacije o prisustvu i raširenosti *Salmonella enterica* u populaciji divljih svinja u Srbiji, kao i uticaju procesa lova i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status. Dobijeni podaci značajno doprinose razumevanju epidemiologije *Salmonella enterica* u divljih svinja u Srbiji i rizičnih faktora koji doprinose njenom širenju i mogućnosti prenosa na ljude alimentarnim putem. Značaj za regulatorna tela se ogleda u identifikovanju ključnih nedostataka u regulativi rada lovnih gazdinstava i objekata za obradu divljači, kao i mogućnosti da se ovi podaci koriste za ocenu mikrobioloških rizika poreklom od divljih svinja za potrošače. Lovna gazdinstva kao primarni proizvođači i registrovani objekti za obradu i rasecanje trupova divljači koji meso stavljaju u promet, imaju odnosne odgovornosti u osiguranju bezbednosti mesa divljači. Iz tog razloga su ovi rezultati veoma vredni jer se ukazuje na postojeće probleme u procesu proizvodnje mesa divlje svinje, kao i potencijalna rešenja u cilju unapređenja mikrobiološke bezbednosti mesa divljih svinja.

Rezultati ovog istraživanja su delimično potvrdili naučnu hipotezu da je meso trupova divlje svinje mikrobiološki visoko kontaminirano, uključujući sa *Salmonella enterica*, kao i da su faktori koji utiču na pojavu ovog patogena u divljih svinja povezani sa kontaktom sa domaćim životinjama. Dodatna šira epidemiološka istraživanja su neophodna da se u potpunosti sagleda cirkulacija ovog i sličnih patogena između divljači i domaćih farmskih životinja, a takođe i istraživanja u pravcu razvoja i verifikacije sistema dobre higijenske prakse u procesu obrade trupova divljači.

6. UKUPAN ZAKLJUČAK

1. Rezultati ovog istraživanja predstavljaju prve detaljne naučne informacije o prisustvu i raširenosti *Salmonella enterica* u populaciji divljih svinja u Srbiji, kao i uticaju procesa lova i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status.
2. Prisustvo *Salmonella enterica* je utvrđeno u 4,2% uzorkovanih divljih svinja, dok je pozitivan nalaz potvrđen u dve trećine lovnih gazdinstava. Od ukupno 18 pozitivnih divljih svinja, više od jednog izolata je utvrđeno kod dve životinje, pa je stoga ukupan broj dobijenih izolata bio 21. Najviše izolata je dobijeno iz fecesa (13, odnosno 3,1%), dok je iz brisa kože i površine mesa trupova dobijeno 3 (0,7%) odnosno 4 izolata (0,9%). Samo je jedan pozitivan uzorak mezenterijalnog limfnog čvora utvrđen (0,2%). Serotipizacijom izolata *Salmonella enterica* potvrđeni su serotipovi *S. Enteritidis* (71,4% od ukupnog broja izolata), *S. Typhimurium* (23,8%) i *S. Infantis* (samo jedan izolat, 4,8%).
3. *Salmonella enterica* je statistički značajno češće utvrđena kod životinja iz otvorenog lovišta u odnosu na ograđena lovišta. Na njeno prisustvo na koži značajno je uticalo oštećenje trbušne duplje izazvano nestručnim pogotkom kao i vlažni vremenski uslovi i padavine tokom lova. *Salmonella enterica* je statistički najčešće bila utvrđena kod jedinki ženskog pola starijih od 36 meseci i težih od 75 kg, što može da bude povezano sa njihovim načinom ishrane.
4. Molekularnom karakterizacijom izolata *Salmonella enterica* metodom elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE) utvrđen je identičan profil *Salmonella enterica* serotip Typhimurium u fecesu i na površini mesa trupa iste divlje svinje, čime je dokazan prenos ovog patogena poreklom iz fecesa na površinu mesa trupa kao posledica procesa obrade (evisceracije u ležećem položaju u nehigijenskim uslovima).
5. PFGE metodom je utvrđen identičan profil *Salmonella enterica* serotip Enteritidis kod divljih svinja poreklom iz različitih lovišta, što može da ukazuje na cirkulisanje ovih sojeva između ograđenih i otvorenih lovišta kao i između lovišta udaljenih i do preko 100 km, putem direktnog kontakta između divljih svinja ili prenosom vektorima.
6. Identičan profil *Salmonella enterica* serotip Typhimurium je utvrđen kod divljih svinja i domaćih svinja poreklom sa obližnje farme. Takođe, visoka srodnost je utvrđena između

izolata *S. enterica* serotip Enteritidis kod divljih svinja i živine sa farme u okolini lovišta, i između izolata *S. enterica* serotip Infantis poreklom iz divljih svinja i domaćih svinja sa obližnje farme. Ovo ukazuje na postojanje genetske veze, kao i mogućnost postojanja epidemiološke veze između divljih svinja i domaćih životinja u pogledu *Salmonella enterica*.

7. Utvrđena je visoka mikrobiološka kontaminacija kože i mesa trupova divljih svinja indikatorima opšte i fekalne kontaminacije. Prosečan ukupan broj bakterija (ACC) utvrđen na koži bio je je $5,2 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$, a broj *Enterobacteriaceae* (EBC) $3,6 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$. Prosečan ACC utvrđen na mesu trupova iznosio je $5,4 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$, a EBC $3,8 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$. Viši nivo mikrobiološke kontaminacije na mesu trupova divljih svinja u odnosu na kožu ukazuje da drugi faktori (prolivanje sadržaja creva kao posledice ustreljivanja u abdomen i druge nehigijenske procedure tokom obrade trupova) igraju važniju ulogu u kontaminaciji mesa trupova nego koža.
8. Utvrđene su velike razlike u mikrobiološkom statusu trupova između različitih lovišta, gde je na nivou pojedinih lovišta utvrđena statistički značajna razlika između trupova kada su životinje bile ispravno odstreljene i kada su bile pogođene u abdomen. Na viši nivo mikrobiološke kontaminacije sa ACC i EBC je najviše uticala procedura evisceracije na terenu na otvorenom u ležećem položaju na zemlji i bez dostupne čiste vode, kao i veoma nehigijenska praksa pranja kože i unutrašnjih površina trupova nakon obavljene evisceracije.
9. Predložene potencijalne kontrolne mere za *Salmonella enterica* u divljih svinja, kao i za smanjenje mikrobiološke kontaminacije na mesu trupova uključuju: (i) kategorizaciju lovnih gazdinstva na osnovu nivoa rizika od prisustva *Salmonella enterica* prema podacima dobijenim monitoringom; (ii) sprečavanje kontakata divljih svinja iz otvorenih lovišta i onih u ograđenim lovištima primenom određenih tehničkih rešenja; (iii) sprečavanje kontakata divljih svinja sa domaćim farmskim životinjama i otpacima njihovog porekla; (iv) razvoj i primenu vodiča dobre lovne i higijenske prakse uključujući neophodne obuka lovaca i radnika koji rukuju i obrađuju trupove čime bi se unapredile i ujednačile higijenske procedure rukovanja i obrade trupova divljači; (v) klasifikaciju trupova divljih svinja koji su visoko fekalno kontaminirani kao uslovno upotrebljive samo za termički tretirane proizvode od mesa; i (vi) uvođenje jasnih, objektivnih i merljivih mikrobioloških kriterijuma za meso divlje svinje u cilju verifikacije higijene procesa

obrade trupova divljih svinja i kategorisanja različitih lovnih gazdinstava prema nivou rizika za javno zdravlje.

10. Sveukupno, rezultati ovog istraživanja predstavljaju naučnu osnovu za dalji razvoj strategija za kontrolu *Salmonella enterica* u populaciji divljih svinja u Srbiji i sveukupne mikrobiološke kontaminacije na mesu trupova. Dobijeni podaci značajno doprinose razumevanju epidemiologije *Salmonella enterica* u divljih svinja i rizičnih faktora koji utiču na njeno širenje i mogućnost prenosa na ljude alimentarnim putem, kao i uticaja procesa lova i obrade trupova divljih svinja na njihov mikrobiološki status. Dalja šira epidemiološka istraživanja u lovnim gazdinstvima u Srbiji, kao i u pravcu razvoja i verifikacije dobre higijenske prakse u procesu obrade trupova divljači, su takođe neophodna u cilju unapređenja mikrobiološke bezbednosti mesa divlje svinje za potrošače.

7. SPISAK LITERATURE

Ahl, A., Nganwa, D., Wilson, S. (2002). Public health considerations in human consumption of wild game. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 48–50.

Anon (1997a). Principles for the development and application of microbiological criteria for foods. Codex Alimentarius Food Hygiene Basic Texts, 1997; CAC/GL 21.

Anon (1997b). Principles for the development of microbiological criteria for animal products and products of animal origin intended for human consumption, European Commission, Luxembourg, 1997.

Anon (2011). „Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu“. Ministarstvo poljoprivrede, trgovine šumarstva i vodoprivrede http://www.vet.minpolj.gov.rs/veterinarsko_javno_zdravstvo/instrukcije_i_vodici/Vodic%20za%20mikrobioloske%20kriterijume%20za%20hranu.pdf (pristupljeno 15. 07. 2016).

Antic, D., Blagojević. B., Ducic, M., Nastasijevic, I., Mitrovic R., Buncic, S. (2010). Distribution of microflora on cattle hides and its transmission to meat via direct contact. *Food Control*, 21, 1025-1029.

Antic, D., Blagojevic, B., Buncic, S. (2011). Treatment of cattle hides with Shellac solution to reduce hide-to-beef microbial transfer. *Meat Science*, 88, 498-502.

Arvanitidou, M., Kanellou, K., Vagiona, D.G. (2005). Diversity of *Salmonella* spp. and fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. *Environmental Research*, 99(2), 278–284.

Atanassova, V., Apelt, J., Reich, F., Klein, G. (2008). Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat Science*, 78, 414-419.

Avagnina, A., Ferroglio, E., Grassi, M.A., Civera, T. (2009). Investigation about microbiological quality of freshly shot gamemeat from alpine ungulates. III. Convengno Nazionale die Ecopatologica della Fauna Selvatica. Torino. (pp.22). http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/718/09SIEF.pdf (pristupljeno 15. 07. 2016).

Avagnina, A., Nucera, D., Grassi, M., Ferroglio, E., Dalmasso, A., & Civera, T. (2012). The microbiological conditions of carcasses from large game animals in Italy. *Meat science*, 91(3), 266-271.

Backhus, R. (2000). Hygienestatus frisch erlegter Fasanen (*Phasianus colchicus*, *Ph. torquatus*, *Ph. mongolicus*, *Ph. versicolor*) aus verschiedenen Revieren in Deutschland. Thesis. Hannover: University of Veterinary Medicine (in German).

Bandick, N., Hensel, A. (2011). Zoonotic diseases and direct marketing of game meat: aspects of consumer safety in Germany, Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance (pp. 93–95). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

Bäumler, A.J., Tsois, R.M., Ficht, T.A., Adams, L.G. (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 66(10), 4579–4587.

- Bensink, J., Ekaputra, I., & Taliotis, C. (1991). The isolation of *Salmonella* from kangaroos and feral pigs processed for human consumption. *Australian Veterinary Journal*, 68(3), 106-107.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385–2397.
- Blagojevic, B., Antic, D., Ducic, M., & Buncic, S. (2011). Ratio between carcass-and skin-microflora as an abattoir process hygiene indicator. *Food Control*, 22(2), 186-190.
- Blagojevic, B., Antic, D., Ducic, M., & Buncic, S. (2012). Visual cleanliness scores of cattle at slaughter and microbial loads on the hides and the carcasses. *Veterinary Record*, 170(22).
- Brodowski, G., Beutling, D. (1998). Die hygienische Gewinnung von Wildbret unter jagdlichen Bedingungen. *Fleischwirtsch*, 78, 1208-1210.
- Cano-Manuel, F.J., Lopez-Olvera, J., Fandos, P., Soriguer, R.C., Pérez, J.M., Granados, J.E., (2014). Long-term monitoring of 10 selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sierra Nevada national park, southern Spain. *Veterinary Microbiology*, 174, 148-154.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011). National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2011. http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf (pristupljeno 15. 07. 2016).
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013). Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157: H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.
- Chiari, M., Zanoni, M., Tagliabue, S., Lavazza, A., Alborali, L.G. (2013). *Salmonella* serotypes in wild boars (*Sus scrofa*) hunted in northern Italy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 1.
- Closa-Sebastià, F., Casas-Díaz, E., Cuenca, R., Lavín, S., Mentaberre, G., Marco, I. (2011). Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *European Journal of Wildlife Research*, 57, 977-981.
- Coburn, H.L, Snary, E.L, Kelly, L.A, Wooldridge, M.A. (2005). Qualitative Risk Assessment of the hazards and risks from wild game. *Veterinary Record*, 157(11), 321-322.
- Codex Alimentarius Commission (CAC) (1997). Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods, CAC/GL-21. 1997; FAO, Rome.
- Codex Alimentarius Commission (CAC) (2005). Code of Hygienic Practice for Meat, CAC/RCP 2005; 58-2005, Rome, Italy.
- Conedera, G., Ustulin, M., Barco, L., Bregoli, M., Re, E., Vio, D. (2014). Outbreak of atypical *Salmonella* Choleraesuis in wild boars in North Eastern Italy, in: Paulsen, P., Bauer, A., Vodnansky, M., Winkelmayr, R., Smulders, F.J.M. (Ed.), Trends in game meat hygiene. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.

Cox, J. (2000). Salmonella. U P. Robinson, C. A. Batt, P. D. Patel (Eds.), Encyclopaedia of food microbiology, Vol. 3, London: Academic Press.

Deutz, A., Fuchs, K., Pless, P., Deutz-Pieber, U., Köfer, J. (2000). Hygienerisiken bei Wildfleisch - Oberflächenkeimgehalte und humanpathogene Keime. *Fleischwirtsch*, 80, 106-108.

Deutz, A., Völk, F., Pless, P., Fötschl, H., Wagner, P. (2006). Game meat hygiene aspects of dogging red and roe deer. *Arch. Lebensmittelhyg*, 57, 197-202.

Deutz, A., Guggenberger, T., Gasteiner, J. (2011). Influence of climate change on diseases of animals. In Paulsen P, Bauer A, Vodnansky M, Winkelmayr R, Smulders F J M. (Eds.). Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance (pp. 157–172). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

Díaz-Sánchez, S., Sánchez, S., Herrera-León, S., Porrero, C., Blanco, J., Dahbi, G., Blanco, J., Mora, A., Mateo, R., & Hanning, I. (2013). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in large game animals intended for consumption: relationship with management practices and livestock influence. *Veterinary microbiology*, 163(3), 274-281.

Ecco, R., Guedes, R.M.C., Tury, E., Santos, H.L.Jr., Perecmanis, S. (2006). Outbreak of enterocolitic salmonellosis on a wild pig farm. *Veterinary Record*, 158:242–243.

El-Ghareeb, W.R., Smulders, F.J.M., Morshdy, A.M.A., Winkelmayr, R., Paulsen, P. (2009). Microbiological condition and shelf life of meat from hunted game birds. *European Journal of Wildlife Research*, 55, 317–323.

Ellis, E.M., Williams, J.E., Mallinson, E.T., Snoeyenbos, G.H., Martyn, W.J. (1976). Culture Methods for the Detection of Animal Salmonellosis and Arizonosis. Iowa State University Press, Ames, USA.

European Commission (EC) (1999). Directive (EC) No. 2003/99 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EE, of 17 November 2003

European Commission (EC) (2000). Regulation (EC) White paper on food safety. Commission of the European Communities, Brussels, 12 January 2000

European Commission (EC) (2003). Regulation (EC) No. 2160/2003 on the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. of 17 November 2003; U: EC (Ed.) EC 2160/2003.

European Commission (EC) (2004a). Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council; laying down specific hygiene rules for on the Hygiene of Foodstuffs. of 29 April 2004; *Official Journal of the European Union*, L 139/55 of 30 April 2004.

European Commission (EC) (2004b). Regulation (EC) No. 854/2004 of the European Parliament and of the Council; laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. of 29 April 2004; *Official Journal of the European Union*, L 155/206 of 30 April 2004.

European Commission (EC) (2005). Regulation (EC) No. 2073/2005; on microbiological criteria for foodstuffs. of 15 November 2005; U: EC (Ed.) EC 2073/2005.

European Commission (EC) (2007). Regulation (EC) No. 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union L*, 322/12.

European Commission (EC) (2011). Regulation (EC) No. 1086/2011, amending Annex II to Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council and Annex I to Commission Regulation (EC) No 2073/2005 as regards *salmonella* in fresh poultry meat. of 27 October 2011.

European Commission (EC) (2014). Regulation (EU) No. 217/2014 of 7 March 2014 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 as regards *Salmonella* in pig carcasses. *Official Journal of the European Union L*, 69/93.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2013). Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: 2013; ECDC.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2014). Annual Epidemiological Report 2014. Food-and waterborne diseases and zoonoses 2014. Stockholm: 2014; ECDC.

European Economic Community (EEC) (1992a). Council Directive (EEC) No. 92/45/EEC on public health and animal health problems relating to the killing of wild game and the placing on the market of wild-game meat, of 16 June 1992.

European Economic Community (EEC) (1992b). Council Directive (EEC) No. 92/117/EEC concerning measures for protection against specified zoonoses and specified zoonotic agents in animals and products of animal origin in order to prevent outbreaks of food-borne infections and intoxications. of 17 December 1992.

European Food Safety Authority (EFSA) (2007). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on microbiological criteria and targets based on risk analysis. *The EFSA Journal*, 2007, 462.

European Food Safety Authority (EFSA) (2010). Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs. *The EFSA Journal*, 1547, 90.

European Food Safety Authority (EFSA) (2013a). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from farmed game. *The EFSA Journal*, 11(6), 3264.

European Food Safety Authority (EFSA) (2013b). Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for biological hazards to be covered by meat inspection of farmed game. *The EFSA Journal*, 11(6), 3267.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2010). The community summary report on trends and sources of zoonoses,

zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*, 8(1), 1496.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *The EFSA Journal*, 9(3):2090.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *The EFSA Journal*, 10(3):2597.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *The EFSA Journal*, 11(4):3129.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *The EFSA Journal*, 12(2):3547.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *The EFSA Journal*, 13(1):3991.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *The EFSA Journal*, 13(12):4329.

Ewing, W.H. (1986). Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*, Fourth Edition. Elsevier, New York, USA, London, UK, and Amsterdam, The Netherlands.

Fettinger, V., Smulders, F.J.M., Lazar, P., Omurtag, I., Paulsen, P. (2010). Lesions in thighs from hunted Brown Hares (*Lepus Europaeus* Pall.) and microflora under vacuum-packaging storage. *European Journal of Wildlife Research*, 56, 943-947.

Fosse, J., Seegers, H., Magras, C. (2009). Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. *Zoonoses and Public Health*, 56:429-454.

Fricker, C.R. (1987). The isolation of salmonellas and campylobacters. *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 99-116.

Gerhardt, P. (1981). Manual of Methods for General Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 332-334.

Gill, C., (2007). Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Science*, 77, 149-160.

Gortazar, C., Avedeco, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J. (2006). Disease risks and overabundance of species. *European Journal of Wildlife Research*, 52, 81–87.

Gortazar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., Vicente, J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: A European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, 53(4), 241–256.

Grimont, P.A.D, Weill, F.X. (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars, Ninth Edition, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France

Hanning, I.B., Nutt, J.D., Ricke, S.C. (2009). Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: Sources and potential intervention measures. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(6), 635–648.

Hilbert, F., Smulders, F., Chopra-Dewasthaly, R., Paulsen, P. (2012). *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Research International*, 45, 603-608.

Hofbauer, P., Smulders, F.J.M. (2011). The muscle biological background of meat quality including that of game species. In Paulsen P, Bauer A, Vodnansky M, Winkelmayr R, Smulders F J M (Eds.), *Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance* (pp. 273–295). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

Hughes, L.A., Shopland, S., Wigley, P., Bradon, H., Leatherbarrow, A.H., Williams, N.J., et al. (2008). Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005–2006. *BMC Veterinary Research*, 29(4), 4.

Hutchison, M.L., Walters, L.D., Avery, S.M., Reid, C.A., Wilson, D., Howell, M., Johnston, A.M., Buncic, S. (2005). A comparison of wet dry swabbing- and excision-sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, 68, 2155–2162.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) 1986. *Microorganisms in Foods, 2. Sampling for microbiological analysis. Principles and specific applications*, 2nd Edition, Blackwell Science, Oxford.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) 2009. „Relating Microbiological Criteria to Food Safety Objectives and Performance Objectives“. Van Schothorst, M., Zwietering, M., Ross, T., Buchanan B., Cole, M. *Food Control*, 20:967-979.

Institut za javno zdravlje Srbije „dr Milan Jovanović Batut“ (2012). Zdravstveno-statistički godišnjak Srbije 2011. <http://www.batut.org.rs/download/publikacije/pub2011.pdf> (pristupljeno 15. 07. 2016).

Institut za javno zdravlje Srbije „dr Milan Jovanović Batut“ (2014). Zdravstveno-statistički godišnjak Srbije 2014. <http://www.batut.org.rs/download/publikacije/pub2014.pdf> (pristupljeno 15. 07. 2016).

International Organization for Standardization (ISO) (2002a). ISO 6579:2002, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. *International Organization for Standardization*.

International Organization for Standardization (ISO) (2002b). ISO 6579-3:2014, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.- Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp. *International Organization for Standardization*.

International Organization for Standardization (ISO) (2003). ISO 17604:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis. *International Organization for Standardization*.

International Organization for Standardization (ISO) (2008a). ISO SRPS 6887-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. *International Organization for Standardization*, 1-12.

International Organization for Standardization (ISO) (2008b). ISO 4833:2008, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of micro organisms - Colony-count technique at 30 C. *International Organization for Standardization*, 1-9.

International Organization for Standardization (ISO) (2009). ISO 21528-2:2009, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count method. *International Organization for Standardization*.

Jakšić, S., Uhitil, S., Asaj, A., Petrak, T., Botka, P.K. (2003). Salmonellen in Wildfleisch. *Allgemeine Forst und Jagdzeitung*, 174(2/3), 57–58.

Kaboré, H., Levallois, P., Michel, P., Payment, P., Déry, P., Gingras, S. (2010). Association between potential zoonotic enteric infections in children and environmental risk factors in Quebec, 1999–2006. *Zoonoses and Public Health*, 57(7–8), 195–205.

Kemper, N., Aschfalk, A., Arnemo, J.M., Höller, C. (2004). Prevalence of enteropathogenic bacteria and *Cryptosporidium* species in moose (*Alces alces*) in Norway. *Veterinary Record*, 154, 827–828.

Kothary, M.H., Babu, U.S. (2001). Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *Journal of Food Safety*, 21, 49-73.

Kozoderović, G. (2012). Analiza prirode rezistencije na hinolone i molekularna tipizacija odabranih serotipova *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki Fakultet.

Lagrange, F., Schmidt, O. (2005). Beurteilung der Oberflächenkeimzahlen von Wildtierkörpern in Verbindung mit Angaben zur Jagd. Proc. 46. AT der Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene. DVG, Gießen, Germany, pp. 475-479.

- Lawrie, R.A., Ledward, D.A. (2006). Lawrie's Meat Science. 7th Ed. Woodhead Publ. Ltd., Cambridge, UK, pp. 159-165.
- Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Clifton-Hadley, F.A., Breslin, M., Davies, R.H. (2003). Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 1024–1029.
- Lillehaug, A., Bergsjø, B., Schau, T., Bruheim, T., Vikoren, T., Handeland, K. (2005). *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., verocytotoxic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46 (1–2), 23–32.
- Lovački savez Srbije (2004). Priručnik za polaganje lovačkog ispita. http://www.ekolss.com/lovacki_prirucnik_2004.pdf
- Lovački savez Srbije (2015). Činjenice o Lovačkom savezu Srbije. <http://www.lovacki-savez-srbije.com/cinjenice.htm>
- Maahs, C. (2010). Examination of microbiological quality of roe deer meat under different cooling-conditions. Thesis. Hannover: University of Veterinary Medicine (in German).
- Magnino, S., Frasnelli, M., Fabbi, M., Bianchi, A., Zanoni, M.G., Meriardi, G., Pacciarini, M.L., Gaffuri, A. (2011). The monitoring of selected zoonotic diseases of wildlife in Lombardy and Emilia-Romagna, northern Italy, in: Paulsen, P., Bauer, A., Vodnansky, M., Winkelmayr, R., Smulders, F.J.M. (Ed.), Game meat hygiene in focus: Microbiology, Epidemiology, Risk Analysis and Quality Assurance. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 223-244.
- Massei, G., Kindberg, J., Licoppe, A., Gačić, D., Šprem, N., Kamler, J., Baubet, E., Hohmann, U., Monaco, A., Ozoliņš, J. (2015). Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Management Science*, 71, 492-500.
- Membré, J.M., Laroche, M., Magras, C., (2011). Assessment of levels of bacterial contamination of large wild game meat in Europe. *Food Microbiology*, 28, 1072-1079.
- Milnes, A.S, Steuart, I., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., Newell, D.G., Sayers, A.R., et al. (2008). Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiology and Infection*, 136, 739–751.
- Mirčeta, J. (2013). Mikrobiološki status mesa divlje svinje. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu.
- Mirceta, J., Petrovic, J., Blagojevic, B., Malesevic, M. & Antic, D. (2015). The microbiological status of carcasses from wild boar in Serbia. *Procedia Food Science*, 5, 199-202.
- Navarro-Gonzalez, N., Casas-Díaz, E., Porrero, C.M., Mateos, A., Domínguez, L., Lavín, S., Serrano, E., (2013). Food-borne zoonotic pathogens and antimicrobial resistance of indicator bacteria in urban wild boars in Barcelona, Spain. *Veterinary Microbiology*, 167, 686-689.

- OIE, (2015). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015*, Chapter 2.9.9. Salmonellosis. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf (pristupljeno 15. 07. 2016)
- Paulsen, P., Hilbert, F., Winkelmayr, R., Mayrhofer, S., Hofbauer, P., Smulders, F.J.M. (2003). Zur tierärztlichen Fleischuntersuchung von Wild, dargestellt an der Untersuchung von Rehen in Wildfleischbearbeitungsbetrieben. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 54, 137–140.
- Paulsen, P., & Winkelmayr, R. (2004). Seasonal variation in the microbial contamination of game carcasses in an Austrian hunting area. *European Journal of Wildlife Research*, 50(3), 157- 159.
- Paulsen, P., Smulders, F.J.M. (2004). Infectious diseases in meat animals: Notifiable and zoonotic diseases. In Jensen W, Devine C, Dikemann M. (Eds.), *Encyclopedia of meat science* (pp. 649–656). Oxford: Elsevier.
- Paulsen, P. (2011). Hygiene and microbiology of meat from wild game: an Austrian view, in: Paulsen, P., Bauer, A., Vodnansky, M., Winkelmayr, R., Smulders, F.J.M. (Ed.), *Game meat hygiene in focus: Microbiology, Epidemiology, Risk Analysis and Quality Assurance*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 19–37.
- Paulsen, P., Smulders F.J.M., Hilbert. F. (2012). *Salmonella* in meat from hunted game: A Central European perspective. *Food Research International*, 45, 609-616.
- Pepperell, R., Reid, C.A., Solano, S.N., Hutchison, M.L., Walters, L.D., Johnston, A.M., Buncic, S. (2005). Experimental comparison of excision and swabbing microbiological sampling methods for carcasses *Journal of Food Protection* 2005, 68(10):2163-8.
- Perez, J., Astorga, R., Carrasco, L., Méndez, A., Perea, A., Sierra, M.A. (1999). Outbreak of salmonellosis in farmed European wild boars (*Sus scrofa ferus*). *Veterinary Record*, 145:464–465.
- Petrović, J., Grgic, Z., Pusic, I., Urosevic, M., (2014). Sylvatic trichinellosis in the Vojvodina region (Serbia), in: Paulsen, P., Bauer, A., Vodnansky, M., Winkelmayr, R., Smulders, F.J.M. (Ed.), *Trends in game meat hygiene*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 175-182.
- Petrović, J., Babic, J., Stojanov, I., Velhner, M. (2015). The change in antimicrobial resistance profile of meat chain-associated *Salmonella* in Serbia. *Procedia Food Science*, 5, 231-234.
- Radojčić, S., Valčić, M., Bosiljka, Đ. (2011). Infektivne bolesti životinja, Specijalni deo, Naučna KMD, Beograd, 81-103,
- Ramanzin, M., Amici, A., Casoli, C., Esposito, L., Lupi, P., Marsico, G., *et al.* (2009). Meat from wild ungulates: Ensuring quality and hygiene of an increasing resource. *Italian Journal of Animal Science*, 9(3), 318–331.
- Ramanzin, M., Amici, A., Casoli, C., Esposito, L., Lupi, P., Marsico, G., Mattiello, S., Olivieri, O., Ponzetta, M.P., Russo, C. (2010). Meat from wild ungulates: ensuring quality and hygiene of an increasing resource. *Italian Journal of Animal Science*, 9, 318-331.

Reissbrodt, R. (1995). Conventional and alternative methods for isolation and identification of *Salmonella* – an overview. *Biotest Bulletin*, 5, 143–156.

Rierner, R., Reuter, G. (1979). Untersuchungen über die Notwendigkeit und Durchführbarkeit einer Wildfleischuntersuchung bei im Inland erlegtem Rot- und Rehwild - zugleich eine Erhebung über die substantielle Beschaffenheit und die Mikroflora von frischem Wildfleisch. *Fleischwirtschaft*, 59, 857-864.

RS, (2009). Službeni glasnik RS 41/09. Zakon o bezbednosti hrane.

RS, (2010). Službeni glasnik RS 68/10. Pravilnik o veterinarsko-sanitarnim uslovima, odnosno opštim o posebnim uslovima za higijenu hrane koje moraju da ispunjavaju objekti za promet odstreljene divljači, kao i načinu vršenja službene kontrole odstreljene divljači.

RS, (2010). Službeni glasnik RS 72/10. Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa.

RS, (2010). Službeni glasnik RS 76/10. Pravilnik o izmenama i dopunama pravilnika o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje infekcija živine određenim serotipovima salmonela.

RS, (2010). Službeni glasnik RS 7/10. Pravilnik o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje infekcija živine određenim serotipovima salmonela.

RS, (2010). Službeni glasnik RS 18/10. Zakon o divljači i lovstvu.

RS, (2010). Službeni glasnik RS 91/05 i 30/10. Zakon o veterinarstvu.

RS, (2012). Službeni glasnik RS 9/12 i 75/16. Pravilnik o proglašavanju lovostajem zaštićenih vrsta divljači.

RS, (2012). Službeni glasnik RS 16/12 i 31/12. Pravilnik o uslovima za stavljanje u promet i načinu obeležavanja ulovljene divljači i trofeja divljači, kao i o načinu vođenja evidencije.

RS, (2014). Službeni glasnik RS 61/16. Pravilnik o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2016. godinu.

Sales J., Kotrba R. (2013). Meat from wild boar (*Sus scrofa* L.): A review. *Meat Science*, 94(2), 187–201.

Sanno, A., Aspan, A., Hestvik, G., Jacobson, M. (2014). Presence of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars. *Epidemiology and Infection*, 142(12), 2542-2547.

Sasaki, Y., Goshima, T., Mori, T., Murakami, M., Haruna, M., Ito, K., Yamada, Y. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of foodborne bacteria in wild boars (*Sus scrofa*) and wild deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Foodborne pathogens and disease*, 10(11), 985-991.

SCVPH (2003). Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in foodstuffs European Commission, Brussels, adopted on 21-22 January 2003.

Skov, M.N., Madsen, J.J., Rahbek, C., Lodal, J., Jespersen, J.B., Jørgensen, J.C., Dietz, H.H., Chriél, M., Baggesen, D.L. (2008). Transmission of *Salmonella* between wildlife and meat-production animals in Denmark. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (5), 1558–1568.

Spallinger, E., Haberleitner, A., Paulsen, P. (2005). Untersuchung von Fasanen auf das Vorkommen von. In P. Paulsen (Ed.), *Proceedings Niederwild – Wildtiergesundheit, Lebensmittelsicherheit und –Qualität* (pp. 117–122). Vienna: Institute of Meat Hygiene Publ.

Statistički godišnjak Republike Srbije 2015. Republika Srbija – republički zavod za statistiku 2015. http://webrzs.stat.gov.rs/WebSite/repository/documents/00/01/88/51/Statisticki_godisnjak_Srbije_2015.pdf (pristupljeno 15. 07. 2016).

Statistik Austria, (2010). Durchschnittliche Lebend-undSchlachtgewichte 2008. Schnellbericht 1.8 (average weights of livestock and carcasses 2008. Summary Report 1.8). Vienna: Bundesanstalt Statistik Österreich.

Türck, N.C., (2008). Sensory and microbiological examinations for an evaluation of game meat. Thesis. Hannover: University of Veterinary Medicine (in German).

Van Schalkwyk, D., Hoffman, L.C., Loubser, L.A. (2011). Game harvesting procedures and their effect on meat quality: The Africa experience. In Paulsen P, Bauer A, Vodnansky M, Winkelmayr R, Smulders FJM (Eds.) *Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance* (pp. 67–92). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

Vicente, J., Segalés, J., Höfle, U., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., Gortázar, C., (2004). Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Research*, 35, 243-253.

Vieira-Pinto, M.M., Themudo, P., Martins, C. (2005). Occurrence of *Salmonella* in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52:476–481.

Vieira-Pinto, M., Morais, L., Caleja, C., Themudo, P., Torres, C., Igrejas, G., Poeta, P. and Martins, C. (2011). *Salmonella* spp. in game (*Sus scrofa* and *Oryctolagus cuniculus*). *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(6), 739-741.

Vought, K.J., Tatini, S.R. (1998). *Salmonella enteritidis* contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak. *Journal of Food Protection*, 61, 5-10.

Wacheck, S. (2008). Microbiological and organoleptic examination of deep-frozen game meat with regard to creating guidance levels for the microbiological evaluation. Thesis. Munich: Ludwig-Maximilians-University (in German).

Wacheck, S., Fredriksson-Ahomaa, M., König, M., Stolle, A., Stephan, R. (2010). Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(3), 307–312.

Wales, A.D., Carrique-Mas, J.J., Rankin, M., Bell, B., Thind, B.B., Davies, R.H. (2010). Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to *Salmonella* in mites, flies and litter beetles. *Zoonoses and Public Health*, 57(5), 299–314.

- Ward, M., Brendan, D.C., Francesca, G.M., Graeme, G., Shawn, W.L., Ian, M., et al. (2013). Salmonella infection in a remote, isolated wild pig population. *Veterinary Microbiology*, 162, 921–929.
- Weber, A. (1994). Salmonellose. In J.Dedek, and T. Steineck (Eds.), *Wildhygiene*: Jena:G. Fischer.
- WHO (2015) *Food Safety and Foodborne Illness Factsheet 399*, World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>, (pristupljeno 15. 07. 2016).
- Wiklund, E., Smulders, F.J.M. (2011). Muscle biological and biochemical ramifications of farmed game husbandry with focus on deer and reindeer. In Paulsen, P., Bauer, A., Vodnansky, M., Winkelmayr, R., Smulders, F.J.M (Eds.), *Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance* (pp. 297–314). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Winkelmayr, R., Malleczek, D., Paulsen, P., Vodnansky, M. (2005). Röntgenanatomische Untersuchungen beim Rehwild in Hinblick auf den optimalen Zielpunkt für den tierschutzgerechten und wildbrethygienisch einwandfreien Schuss. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 92, 40-45.
- Winkelmayr, R., Paulsen, P. (2008). Wildbret-Direktvermarktung in Österreich. *Fleischwirtschaft*, 88(4), 122–125.
- Winkelmayr, R., Paulsen, P., Lebersorger, P., Zedka, H.F. (2008). Wildbret-Hygiene. Zentralstelle österr. Landesjagdverbände.
- Winkelmayr, R. (2009). Animal welfare during hunting: The ethical perspective. In: Smulders, F.J.M. and Algers, B. (eds.). *Food Safety and Veterinary Public Health, Vol. 5: Welfare of production animals: assessment and management of risks*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp. 205-220.
- Wisniewski, J. (2001). The incidence of *Salmonella* spp. in wild boars in Poland. *Poland Medycyna Weterynaryjna*, 57, 399-401.
- Zheng, J., Keys, C.E., Zhao, S., Ahmed, R., Meng, J., Brown, E.W. (2011). Simultaneous Analysis of Multiple Enzymes Increases Accuracy of Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Assigning Genetic Relationships among Homogeneous *Salmonella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 85-94.
- Ziegenfuss, J. (2003). Hygienestatus von erlegtem Schwarzwild (*Sus scrofa*) im Wartburgkreis. Thesis. Hannover: University of Veterinary Medicine (in German).
- Zottola, T., Montagnaro, S., Magnapera, C., Sasso, S., De Martino, L., Bragagnolo, A., D'Amici, L., Condoleo, R., Pisanelli, G., Iovane, G. (2012). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region–Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36, 161-168.
- Zou, W., Lin, W.J., Foley, S.L., Chen, C.H., Nayak, R., Chen, J.J. (2010). Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles for Identification of *Salmonella* Serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 3122-3126.

Biografija

Mr Jovan Mirčeta je rođen 26.07.1978. godine u Kninu. Osnovnu školu je završio u Kninu, a Gimnaziju, u Srbobranu 1996. godine.

Diplomirao je 2002. godine na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu.

Magistarske studije je završio 2013. godine, na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu i odbranio magistarsku tezu pod naslovom “Mikrobiološki status mesa divlje svinje”.

Kandidat je od 2004. do 2007. godine bio honorarni saradnik na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta, u izvođenju praktične nastave iz predmeta Bolesti papkara, Klinička dijagnostika i Patologija.

Tokom 2005-2006. godine proveo je 6 meseci na studijskom boravku na Univerzitetu u Ejmsu (*Iowa State University*) u Ajovi (*Iowa - SAD*).

Zaposlen je u JP „Vojvodinašume“.

Otac dvoje dece.