

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Jasna M. Kureljušić

**FENOTIPIZACIJA, GENOTIPIZACIJA I  
OSETLJIVOST NA ANTIMIKROBNE LEKOVE  
*SALMONELLA* SPP. IZOLOVANIH SA TRUPOVA  
ZAKLANIH SVINJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Jasna M. Kureljušić

**FENOTIPIZACIJA, GENOTIPIZACIJA I  
OSETLJIVOST NA ANTIMIKROBNE LEKOVE  
*SALMONELLA* SPP. IZOLOVANIH SA TRUPOVA  
ZAKLANIH SVINJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Jasna M. Kureljušić

**PHENOTYPING, GENOTYPING AND  
SUSCEPTIBILITY ON ANTIMICROBIAL DRUGS  
OF *SALMONELLA* SPP. ISOLATED FROM  
SLAUGHTERED PIG CARCASSES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

**Mentor:**

**Dr Nedeljko Karabasil, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine**

**Članovi komisije:**

**Dr Nedeljko Karabasil, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine**

**Dr Vlado Teodorović, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine**

**Dr Vera Katić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine**

**Dr Dejan Vidanović, naučni saradnik,  
Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo“, Kraljevo**

**Dr Ljubiša Šarić, naučni saradnik  
Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad**

**Datum odbrane:**

\_\_\_\_\_

***Veliku zahvalnost za pomoć pri izradi ove disertacije dugujem:***

- *svom mentoru profesoru dr Neđeljku Karabasilu, na poverenju, znanju i iskustvu koje mi je preneo, nesebičnoj podršci, pomoći, razumevanju i strpljenju počev od prvih koraka u izradi ove disertacije;*
- *profesorki dr Veri Katić, što me je usmeravala u mom stručnom radu, omogućila vetar u leđa i „sigurnu“ plovidbu mikrobiološkim vodama. Za pomoć i podršku u trenucima kada je bila potrebana;*
- *profesoru dr Vladi Teodoroviću, na ukazanom poverenju i nesebičnoj podršci pri izradi ove disertacije;*
- *dr Dejanu Vidanoviću, za svu ljudsku i profesionalnu pažnju koju mi je pružio u izradi ove doktorske disertacije, kao i kolegama kolektiva Veterinarskog specijalističkog instituta Kraljevo;*
- *dr Ljubiši Šariću na velikom broju stručnih i korisnih saveta*
- *kolektivu Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije na ukazanom poverenju i interesovanju sa kojim su pratili moj rad i brojnim dragocnim uslugama;*
- *mojim roditeljima i sestrama za pruženu ljubav i podršku tokom ovih godina. Mami koja je čuvala Vikicu i posvetila joj svaki trenutak. Sestrama Snežani i Ivani koje su uvek tu, moj oslonac i moje bogatstvo.*

*Na kraju bih želela da izrazim posebno veliku zahvalnost svom suprugu, najboljem prijatelju i velikoj ljubavi Branislavu, na strpljenju i ogromnoj podršci koju mi je pružao i pruža tokom ovih godina.*

***Mom najvećem životnom uspehu, mojoj Višnji...***

# **FENOTIPIZACIJA, GENOTIPIZACIJA I OSETLJIVOST NA ANTIMIKROBNE LEKOVE *SALMONELLA* SPP. IZOLOVANIH SA TRUPOVA ZAKLANIH SVINJA**

## **REZIME**

Cilj ove doktorske disertacije je da se utvrdi zastupljenost salmonela u uzorcima briseva sa trupova svinja u različitim fazama proizvodnje i sadržaja ileuma, izvrši njihova fenotipizacija, genotipizacija i utvrdi osetljivost na antimikrobne lekove.

Ispitivanje je sprovedeno na jednoj klanici srednjeg kapaciteta iz okoline Beograda. Prilikom posete klanici, vršeno je i anketiranje, odnosno prikupljanje podataka o: poreklu svinja (farma, otkup), mestu nabavke, načinu ishrane (suva, tečna, kombinovana), telesnoj masi svinja, starosti, dužini trajanja transporta, dužini boravka u stočnom depou, eventualnom mešanju svinja u stočnom depou sa svinjama drugog porekla i higijeni stočnog depoa.

Za ispitivanje su uzorkovani brisevi sa 100 trupova svinja kao i sadržaj ileuma. Uzorkovanje je trajalo deset nedelja, svake nedelje se rotirao dan, kako bi se obuhvatili svi dani u nedelji. Prilikom uzorkovanja, uzimali su se brisevi sa trupova nakon omamljivanja, zatim nakon završne obrade, a pre hlađenja i 24h posle početka hlađenja. Pored toga, uzorkovano je i 100 uzoraka sadržaja ileuma od istih trupova. Brisevi su uzimani sa obe polovine (polutke) istog trupa, što čini 200 uzoraka briseva nakon omamljivanja, 200 nakon završne obrade i 200 briseva nakon hlađenja, odnosno ukupno 600 briseva za ispitivanje na prisustvo salmonela i enterobakterija.

Izolacija *Salmonella* spp. vršena je prema standardu SRPS EN ISO 6579:2008, *Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za otkrivanje Salmonella spp.* Izolacija *Salmonella* spp. u uzorcima sadržaja ileuma vršena je prema istom standardu SRPS EN ISO 6579:2008, Annex D, *Otkrivanje Salmonella spp. u*

fecesu životinja i u uzorcima iz životne sredine u primarnoj fazi proizvodnje. Pored toga, uporedo sa ispitivanjem na prisustvo *Salmonella* spp. u uzorcima briseva vršeno je određivanje broja *Enterobacteriaceae*, prema standardu SRPS ISO 21528-2, *Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja Enterobacteriaceae - Deo 2: Metoda brojanja kolonija*.

Za biohemijsko potvrđivanje korišćen je identifikacioni kit za *Enterobacteriaceae* i druge Gram negativne bakterije, API 20E kit (BioMérieux®, France).

Za identifikaciju salmonela polivalentnim i monovalentnim serumima prema Kauffman-White shemi odnosno standardu ISO/TR 6579-3:2014, korišćeni su antiserumi proizvođača Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ i Statens Serum Institute (Danska).

Određivanje antimikrobne osetljivosti *Salmonella* rađeno je disk difuzionom metodom, a za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije korišćen je E test.

PFGE metoda se obavljala po protokolu U.S. CDC PulseNet protocol (One-Day 24-28h, Standardized Laboratory Protocol for molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)).

Anketom je utvrđeno da su svinje u osam ispitivanih nedelja poticale sa farme, dok su u prvoj i devetoj nedelji bile iz otkupa, odnosno poticale su od individualnih proizvođača. U dve ispitivane nedelje svinje su poticale iz Surčina, u drugoj ispitivanoj nedelji iz Vršca, iz Vrbasa tokom šest nedelja, a iz Obrenovca u četvrtoj nedelji ispitivanja. Najzastupljeniji način ishrane je bio kombinovani, dok je u tri slučaja bila zastupljena čvrsta hrana (2., 3., i 4. nedelja). Masa svinja je u sedam ispitujućih nedelja bila u opsegu od 90-100 kg, dok je u tri nedelje bila u opsegu 100-110 kg (1., 2., i 3. nedelja). Starost svinja se tokom devet ispitujućih nedelja kretala u opsegu od 6-9 meseci, dok su tokom devete nedelje svinje bile starosti od 9-12 meseci. Transport svinja do klanice trajao je od jedan do četiri sata. Prema rezultatima ankete svinje su boravile u stočnom depou od jedan do četrnaest časova. Tokom svih deset nedelja nije došlo do mešanja svinja u stočnom depou sa svinjama drugog porekla, a higijena je bila na zadovoljavajućem nivou.

Od ukupno ispitanih 100 trupova svinja tokom deset nedelja u 41% je dokazano prisustvo *Salmonella* spp. nakon omamljivanja, dok je nakon završene obrade potvrđeno

u 2% ispitivanih trupova. Nalaz salmonela, tokom deset nedelja uzorkovanja, nakon omamljivanja kretao se u opsegu od 0 do 90 %. Nakon završene obrade, salmonele su izolovane samo sa dva trupa u trećoj nedelji ispitivanja. Od ukupno ispitanih 100 uzoraka sadržaja ileuma zaklanih svinja tokom deset nedelja u 5% dokazano je prisustvo *Salmonella* spp.

Analizirajući prevalenciju *Salmonella* spp. na trupovima svinja ustanovljena je veća prevalencija u brisevima uzetim sa trupova nakon omamljivanja nego u brisevima uzetim nakon obrade i hlađenja ( $p < 0,01$ ). Nalaz salmonela u brisevima trupa nakon omamljivanja, u odnosu na nalaz u sadržaju ileuma je bio značajno veći ( $p < 0,01$ ), a značajna razlika u nalazu salmonela u brisevima trupova nakon hlađenja u odnosu na nalaz u sadržaju ileuma ( $p < 0,05$ ). Međutim, nije utvrđena značajna razlika u nalazu salmonela u brisevima trupova nakon obrade i sadržaju ileuma ( $p > 0,05$ ).

U ovom ispitivanju je ustanovljeno da je prosečan broj *Enterobacteriaceae* bio najmanji nakon hlađenja ( $0,13 \pm 0,05 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ), što je značajno manje ( $p < 0,01$ ) od prosečne vrednosti nakon omamljivanja ( $1,79 \pm 0,88 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ) i prosečne vrednosti nakon obrade ( $0,78 \pm 0,46 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ). Najveći koeficijent varijacije zabeležen je nakon obrade (51,48%), a najniži nakon hlađenja (34,66%).

Najčešće izolovani serotip bio je *S. Derby* (90,74%), potom *S. Infantis* (5,56%) i *S. Typhimurium* (3,7%). *S. Derby* je izolovana iz briseva posle omamljivanja, nakon obrade i iz sadržaja ileuma, dok je *S. Infantis* bila utvrđena samo u uzorcima briseva posle omamljivanja. *S. Typhimurium* je bila izolovana samo iz sadržaja ileuma kod dve svinje (3,7%).

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekve disk difuzionom metodom pokazali su da su ispitivani izolati salmonela bili osetljivi na pet antimikrobnih lekova (ceftazidim, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim, meropenem i gentamicin), a rezistentni na tetraciklin. Rezistencija se kretala od 7,41% za ampicilin i hloramfenikol, do 12,96% za nalidiksinsku kiselinu.

Ispitivanje osetljivosti izolovanih salmonela na antimikrobne lekove pomoću E-test traka obuhvatilo je ukupno 30 izolata *Salmonella* spp., od čega 23 izolata *S. Derby*, 3 izolata *S. Infantis* i 4 izolata *S. Typhimurium*. Svi ispitani izolati salmonela su osetljivi na četiri antimikrobna leka (ceftazidim, trimetoprim, meropenem i gentamicin), a



rezistentni na tetraciklin. Rezistencija se kretala od 10% za ampicilin, 14,4% za hloramfenikol, 20% za ciprofloksacin i do 23,3 % za nalidiksinsku kiselinu.

Genotipizacijom je bilo obuhvađeno 20 izolata *S. Derby*, tri izolata *S. Infantis* i četiri izolata *S. Typhimurium*. Kod *S. Derby* su utvrđena 2 PFGE profila međusobne sličnosti od 98%. Prvi profil SDERXB0001, kome su pripadali izolati 13, 31, 46, 55, 65, 79, 111, 116, 125, 137, 142, 151, 155, 159, 164, 168, 171, 178, i drugi profil SDERXB0002 kome su pripadali izolati 4 i 10. Izolati unutar ova dva profila su imali 100% međusobne sličnosti.

Kod *S. Infantis* utvrđen je jedan profil, SINFXB0001 kome su pripadala sva tri izolata (10, 22, 43). Kod *S. Typhimurium* je utvrđen takođe samo jedan profil STYPXB0001 kome su pripadala sva četiri izolata.

**Ključne reči:** svinja, klanica, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, antimikrobna rezistencija, PFGE

**Naučna oblast:** Veterinarska medicina

**Uža naučna oblast:** Higijena i tehnologija namirnica animalnog porekla

**UDK broj:** 579.67 : 637.5' 64 : 615.28

# **PHENOTYPING, GENOTYPING AND SUSCEPTIBILITY ON ANTIMICROBIAL DRUGS OF *SALMONELLA* SPP. ISOLATED FROM SLAUGHTERED PIG CARCASSES**

## **SUMMARY**

The aim of this doctoral thesis was to establish the presence of *Salmonella* in swab samples from pig carcasses and from the content of the ileum collected at various stages of production. Phenotyping, antimicrobial susceptibility testing and molecular typing by pulse field gel electrophoresis was also done for selected *Salmonella* strains.

The study was conducted at one slaughterhouse of medium capacity closed to the city of Belgrade. During a visit to the slaughterhouse the survey was carried out, and data collected about: the origin of the pig (farm, purchase), place of purchase, type of diet (dry, liquid, combined), body weight of pigs, age, duration of transport, length of stay in lairage, the possibility of mixing pigs in lairage with pigs of different origin and the hygiene of the lairage.

Swab samples were collected from 100 carcasses of pigs and from the content of the ileum. Sampling was done during ten weeks, every week the day was rotated, in order to cover all days of the week. During sampling, the swabs were taken from the carcasses after stunning, then after the completion of processing before chilling and 24 hours after the start of chilling. The contents of 100 samples of ileum from the same carcasses were sampled as well. Swabs were taken from two halves (hemispheres) of the carcass, which makes the 200 swab samples after stunning, 200 after processing and 200 swabs after chilling. By such sampling strategy, total of 600 swabs were cultured to estimate the presence of *Salmonella* and *Enterobacteriaceae*.

The isolation of *Salmonella* spp. was performed according to standard SRPS EN ISO 6579: 2008, Microbiology of food and feed - Horizontal method for the detection

of *Salmonella* spp. The isolation of *Salmonella* spp. from ileum content was performed according to the same standard SRPS EN ISO 6579: 2008, Annex D, *Detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples in the primary stage of production*. In addition, along with the examination for the presence of *Salmonella* spp. in samples of swabs the total *Enterobacteriaceae* count was determined, according to standard SRPS ISO 21528-2, *Microbiology of food and feed - Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method*.

For biochemical confirmation API 20E kit (BioMérieux®, France) was used for *Enterobacteriaceae* and other Gram-negative bacteria.

For the identification of *Salmonella* polyvalent and monovalent sera were used produced by Institute of Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanovic Batut" and the Statens Serum Institute (Denmark), according to the Kauffman-White scheme or ISO/TR 6579-3: 2014.

Determination of antimicrobial susceptibility of *Salmonella* was done by disk diffusion method, and for determining of the minimum inhibitory concentration E test was used.

PFGE method was performed according to the U.S. CDC PulseNet protocol (One-Day 24-28h, Standardized Laboratory Protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)).

The survey has shown that the pigs which were examined during eight weeks originated from the farm, while in the first and ninth week of experiment pigs were purchased from the individual producers. During two weeks the pigs originated from farms located in Surčin, and in the second week from farm located in Vršac. During six weeks pigs were purchased from farms in Vrbas and in the fourth week of the study pigs were purchased from Obrenovac. The most common diet was combined, while in three cases the dry feed was used in 2., 3., and 4. week of the study. Weight of pigs at seven inquiring weeks was in the range of 90-100 kg, and at three weeks was in the range 100-110 kg (1., 2., and 3. week of the study). Age of pigs during the nine weeks was in the range of 6-9 months, while during the ninth week, the pigs were aged 9-12 months.

Transport of pigs to the slaughterhouse lasted from one to four hours. According to the survey pigs were kept in the lairage from one to fourteen hours. During all ten

weeks there was no mixing of pigs in lairage with pigs of different origin, and hygiene was on the satisfactory level.

The presence of *Salmonella* spp. after stunning was determined in 41% of the carcasses (100 carcasses were examined) while after processing, *Salmonella* was confirmed in 2% of the tested carcasses. Detection of *Salmonella* after stunning was within a range of 0 to 90%, during ten weeks of sampling. After processing, *Salmonella* was isolated only in two carcasses both originated from the third week of the study. The presence of *Salmonella* spp. was confirmed in 5% of samples of the ileum content out of 100.

The greater prevalence of *Salmonella* spp. was determined after stunning comparing to swabs taken after processing and chilling ( $p < 0.01$ ). The finding of *Salmonella* in swabs of the carcasses after stunning compared to the results in the content of the ileum was significantly higher ( $p < 0.01$ ). Significant difference in *Salmonella* presence was determined in carcasses swabs after chilling compared to the ileum content ( $p < 0.05$ ). However, no significant difference in the finding of *Salmonella* was determined in swabs from carcasses after processing and the content of the ileum ( $p > 0.05$ ).

The average number of *Enterobacteriaceae* ( $0.13 \pm 0.05 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ) was significantly lower ( $p < 0.01$ ) after chilling but also after stunning ( $1.79 \pm 0.88 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ), and average values after processing ( $0.78 \pm 0.46 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ). The largest coefficient of variation was noted after carcass processing (51.48%), and lowest after chilling (34.66%).

The most frequently isolated serotype was *S. Derby* (90.74%), followed by *S. Infantis* (5.56%) and *S. Typhimurium* (3.7%). *S. Derby* was isolated from swabs after stunning, after processing and from the content of the ileum, while *S. Infantis* was found only in swab samples after stunning. *S. Typhimurium* was isolated only from the content of the ileum in two pigs (3.7%).

Resistotyping by disc diffusion method has showed that *Salmonella* isolates were sensitive to five antimicrobial drugs (ceftazidime, ciprofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim, meropenem and gentamicin), but resistant to tetracycline. Resistance to ampicillin and chloramphenicol was found in 7.41% of the isolates and in 12.96% of the isolates for nalidixic acid.

Susceptibility testing of isolated *Salmonella* to antimicrobial drugs using E-test strips included a total of 30 isolates of *Salmonella* spp., among which 23 isolates of *S. Derby*, 3 of *S. Infantis* isolates and 4 isolates of *S. Typhimurium*. All *Salmonella* tested isolates were sensitive to the four antimicrobial drugs (ceftazidime, trimethoprim, meropenem and gentamicin), but resistant to tetracycline. Resistance ranged from 10% to ampicillin, 14.4% for chloramphenicol, 20% for ciprofloxacin and to 23.3% for nalidixic acid.

Total 20 isolates of *S. Derby*, three of *S. Infantis* and four of *S. Typhimurium* were genotyped. In the case of *S. Derby* two PFGE profiles were detected with mutual similarity of 98%. The first profile SDERXB0001 (isolates number 13, 31, 46, 55, 65, 79, 111, 116, 125, 137, 142, 151, 155, 159, 164, 168, 171, 178) and the second profile SDERXB0002 (isolates number 4 and 10) have shown 100% genetic similarity between isolates. All three isolates (10, 22, 43) of *S. Infantis* belong to one profile SINFXB0001. In the case of *S. Typhimurium* one profile was observed STYPXB0001 in all four isolates.

**Key words:** pigs, slaughter, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, antimicrobial resistance, PFGE

**Scientific field:** Veterinary medicine

**Field of academic expertise:** Hygiene and technology of food of animal origin

**UDK number:** 579.67 : 637.5' 64 : 615.28

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE.....</b>	<b>4</b>
2.1. Osnovne karakteristike porodice <i>Enterobacteriaceae</i> .....	4
2.2. Istorijat, nomenklatura i taksonomija salmonela.....	5
2.3. Morfološke, kulturelne i biohemijske osobine salmonela.....	7
2.4. Epidemiološki značaj salmonela.....	9
2.5. Svinje i meso svinja kao izvor salmoneloza kod ljudi.....	14
2.5.1. Nalaz salmonela na trupovima svinja.....	16
2.5.2. Monitoring i nadzor salmoneloze.....	18
2.6. Patogeneza i klinička slika netifoidnih salmoneloznih infekcija svinja.....	22
2.7. Antimikrobna rezistencija kod salmonela.....	25
2.7.1. Mehanizmi rezistencije.....	28
2.7.2. Prenosivost rezistencije.....	29
2.7.3. Rezistencija na više antimikrobnih lekova ili multirezistentne salmonele.....	29
2.7.4. Antimikrobna rezistencija salmonela izolovanih od svinja.....	30
2.8. Metode za identifikaciju salmonela.....	32
2.8.1. Konvencionalna serotipizacija.....	33
2.8.2. Fagotipizacija.....	34
2.8.3. Molekularna tipizacija.....	35
2.8.3.1. Tehnike bazirane na restrikcionoj digestiji.....	35
2.8.3.2. Tehnike bazirane na amplifikaciji.....	37
2.8.3.3. Tehnike zasnovane na sekvencioniranju nukleotida.....	37
<b>3. CILJ I ZADACI RADA.....</b>	<b>38</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>39</b>
4.1. Formiranje baze podataka o poreklu životinja, načinu transporta, načinu ishrane i boravku u depou.....	39
4.2. Opis linije klanja u ispitivanom objektu.....	41
4.3. Uzorkovanje.....	44
4.3.1. Uzimanje uzoraka briseva sa trupova zaklanih svinja.....	44
4.3.2. Uzimanje uzoraka sadržaja ileuma.....	44

4.4. Izolacija i identifikacija <i>Salmonella</i> spp.....	45
4.4.1. Izolacija <i>Salmonella</i> spp. ....	45
4.4.2. Identifikacija <i>Salmonella</i> spp.....	46
4.4.2.1. Biohemijsko potvrđivanje .....	46
4.4.2.2. Serološko potvrđivanje <i>Salmonella</i> spp. ....	47
4.5. Određivanje broja <i>Enterobacteriaceae</i> .....	47
4.6. Određivanje antimikrobne osetljivosti <i>Salmonella</i> spp. ....	48
4.6.1. Disk difuziona metoda .....	48
4.6.2. E TEST.....	49
4.7. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE).....	50
4.8. Statistička analiza .....	51
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>53</b>
5.1. Rezultati obrade podataka o poreklu životinja, načinu transporta, načinu ishrane i boravku u depou .....	53
5.2. Nalaz <i>Salmonella</i> spp. u brisevima uzetim sa trupova .....	54
5.2.1. Rezultati izolacije <i>Salmonella</i> spp. iz uzoraka briseva sa trupova svinja nakon omamljivanja, nakon završene obrade i nakon hlađenja .....	54
5.2.2. Rezultati izolacije <i>Salmonella</i> spp. iz sadržaja ileuma .....	55
5.2.3. Struktura prevalencije <i>Salmonella</i> spp. na trupovima svinja i sadržaju ileuma .....	56
5.3. Rezultati određivanja broja <i>Enterobacteriaceae</i> iz uzoraka briseva sa trupova svinja nakon omamljivanja, nakon završene obrade i nakon hlađenja .....	57
5.4. Rezultati fenotipizacije izolata salmonela .....	59
5.5. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove .....	61
5.5.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antimikrobne lekove disk-difuzionom metodom.....	62
5.5.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove dobijene E-testom.....	65
5.6. Rezultati genotipizacije salmonela izolovanih sa trupova svinja i sadržaja ileuma .....	68
<b>6. DISKUSIJA .....</b>	<b>70</b>
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>82</b>
<b>8. SPISAK LITERATURE.....</b>	<b>84</b>
<b>8. PRILOG .....</b>	<b>99</b>
PRILOG A .....	99
PRILOG B .....	103
Biografija.....	103

## 1. UVOD

Salmoneloza je infektivna bolest domaćih i divljih životinja koju izazivaju gram-negativne bakterije iz roda *Salmonella*. Do danas je iz različitih vrsta kičmenjaka izolovano preko 2500 različitih serotipova ovog roda, od kojih je više od 200 izolovano i kod ljudi. Manji broj serotipova je visoko adaptiran na pojedine vrste domaćina, izazivajući teške septikemične oblike bolesti. Najveći broj serotipova ipak nije adaptiran na pojedine domaćine pa pripadaju grupi tzv. specijes nespecifičnih serotipova. Na farmama svinja sa kliničkim oblicima salmoneloze, u Evropi je najčešće izolovana *S. Typhimurium*, dok je u SAD to *S. Choleraesuis*. S obzirom da je mogućnost iskorenjivanja bolesti minimalna, preduzimaju se različite mere za njenu kontrolu, a programi su zasnovani na testiranju uzoraka sa farmi, kao i uzoraka sa klanica. Značaj salmoneloze se ogleda pre svega u tome što je salmoneloza zarazna bolest koja opterećuje savremenu proizvodnju svinja. Pored toga, značajna je i sa aspekta bezbednosti hrane životinjskog porekla zbog svog zoonotskog karaktera, a na kraju značaj se ogleda u uticaju ove infekcije na zdravlje svinja i ekonomiku proizvodnje. U okviru zemalja EU postoji legislativa koja obavezuje zemlje članice da sprovode monitoring salmoneloze u priplodnim zaptima kao i farmama tovnih svinja.

Najčešći izazivači alimentarnih toksikoinfekcija su *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. Wirchov*. Gotovo sve salmonele su primarni stanovnici digestivnog trakta životinja. Najčešći izvori salmonela su domaće životinje (svinje, goveda, ovce) i živina (kokoške, patke, guske, ćurke). Zaražene životinje izlučuju salmonele preko izmeta, sekreta i ekskreta, a salmonele kod zaraženih životinja nalaze se i u njihovom mleku, mesu, kao i u jajima kod živine. Domaće životinje veoma često mogu biti samo kliconoše, a da ne pokazuju nikakve znakove bolesti. Kod obolelih životinja salmoneloza se ispoljava u



vidu septikemije ili zapaljenja digestivnog trakta. Upotreba kontaminirane hrane za životinje pogoduje širenju salmoneloza.

Prema izveštaju Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u 2014. godini bilo je 1512 potvrđenih slučajeva salmoneloze, a od toga 470 u Vojvodini i 1042 u Centralnoj Srbiji. Prema uzrasnoj dobi, najzastupljenija su bila deca sa dve godine i osobe preko 60 godina. Najčešći uzročnik je bila *Salmonella* Enteritidis i otkrivena je u 67 slučajeva alimentarnih epidemija.

Posle pilećeg mesa, svinje i svinjsko meso predstavljaju drugi po učestalosti izvor salmoneloza kod ljudi u Evropi. Od ukupno 533 izolata salmonela sakupljenih iz 17 zemalja članica EU, Danska je prijavila najveći broj izolata (92), zatim Belgija (62), Rumunija (59), i Nemačka (57). Najzastupljeniji serotip je bio *S. Typhimurium* sa učešćem od 27,8%, zatim *S. Derby* 24,4% i monofazna *S. Typhimurium*. Procenjuje se da je 15 do 23% svih slučajeva salmoneloza kod ljudi u Evropskim zemljama povezano sa konzumiranjem svinjskog mesa. U SAD statistički modeli predviđaju da svake godine približno 100.000 slučajeva salmoneloze kod ljudi se vezuje za konzumiranje svinjskog mesa, sa troškovima na godišnjem nivou od oko 80 miliona dolara.

Upotreba antibiotika, promotera rasta u intenzivnoj proizvodnji svinja i živine pogodovala je razvoju rezistencije kod nekih bakterija. Iz tih razloga od januara 2006. godine regulativom EC No 1831/2003 zabranjena je upotreba svih antimikrobnih lekova kao aditiva za hranu za životinje. Upotreba antibiotika kod životinja danas je predmet velike zabrinutosti i straha čovečanstva od pojavljivanja novih multirezistentnih sojeva bakterija potencijalno opasnih po zdravlje ljudi. U lancu ishrane postoji veliki rizik od prenošenja multirezistentnih patogenih uzročnika sa životinja na ljude.

Nalaz bakterija roda *Salmonella* u brisevima sa trupova zaklanih svinja predstavlja indikator higijene proizvodnog procesa. Kontaminacija trupa može nastati kao posledica tehničkih grešaka tokom procesa obrade (npr. slučajno zarezivanje creva ili izlazak fecesa iz anusa). Salmonele preživljavaju u okruženju u klanici, a posebno ih je teško ukolniti sa opreme. Loša higijena osoblja u klanici može rezultirati kontaminacijom trupova, a međusobnim dodiranjem trupova dolazi do unakrsne kontaminacije. Dokazana je veza između svinja kao rezervoara *Salmonella* u fecesu i kontaminiranih polutki na liniji klanja. Ustanovljeno je da 70% kontaminiranih polutki potiče od svinja koje su bile nosioci, dok je 30% bila unakrsna kontaminacija.

Blagovremeno utvrđivanje prisustva salmonela kod svinja je od vitalnog značaja iz više razloga. Prvo pomaže doktorima veterinarske medicine da direktno na farmi na osnovu dobijenih izolata i antibiograma odrede odgovarajuću terapiju kod klinički obolelih svinja. Drugo, unapređenjem interventnih mera može se smanjiti prevalencija salmonela kod svinja. Na kraju, najveća korist jeste u tome da što manji broj kliconoša dospe u klanicu. Na taj način smanjuje se rizik od kasnije kontaminacije trupa na liniji klanja i eventualnih alimentarnih infekcija ljudi.

Bez ikakve sumnje, danas se živi u vremenu u kome hrana predstavlja vrlo važan činilac svakodnevnog života savremenog društva. Svakako, to ujedno nameće vrlo ozbiljne zahteve proizvođačima hrane u smislu eliminisanja mnogih faktora koji ugrožavaju zdravlje ljudi. Salmonele sasvim sigurno predstavljaju vrlo čest uzrok navedenih poremećaja. Stoga, njihova kontrola mora da bude sastavni deo integrisanog programa kontrole namirnica od “farme do trpeze”.

Imajući u vidu napred navedeno, kao i ograničena saznanja iz ove oblasti, ova disertacija je imala za cilj da se utvrdi zastupljenost salmonela u uzorcima briseva sa trupova svinja u različitim fazama proizvodnje i sadržaja ileuma, izvrši njihova fenotipizacija, genotipizacija i utvrdi osetljivost na antimikrobne lekove.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Osnovne karakteristike porodice *Enterobacteriaceae*

Porodica *Enterobacteriaceae* predstavlja heterogenu i veoma brojnu grupu bakterija koje su stanovnici digestivnog trakta ljudi i životinja, a putem fecesa dospevaju u spoljašnju sredinu gde mogu kontaminirati zemljište, vodu i biljke. Naziv je dobila od reči *enteron* što na grčkom jeziku znači crevo. Bakterije iz ove porodice su sastavni deo svakog lanca ishrane u prirodi i mogu se naći u svim delovima sveta, kako u tropskim tako i u predelima koji su stalno pod snegom i ledom (Winn i sar., 2006). Taksonomski, porodica *Enterobacteriaceae* ima 53 roda sa preko 170 vrsta. Nomenklatura *Enterobacteriaceae* je kompleksna i bazirana je na biohemijskim i antigenim karakteristikama. Primena novih tehnologija, kao što je DNK hibridizacija, rezultirala je brojnim promenama u klasifikaciji *Enterobacteriaceae*. Neki od ovih rodova su izraziti patogeni i izazivači velikog broja različitih oboljenja kod ljudi, koji se mogu manifestovati kao septikemija, pneumonija, meningitis, infekcije urinarnog trakta, infekcije organa za varenje i dr. Bakterije iz ove porodice se nalaze u crevnoj flori, genitalnim organima, usnoj i nosnoj šupljini, na koži i drugim delovima čovekovog organizma. Veliki broj patogenih bakterija proizvodi toksine koji su opasni za metabolizam ćelije domaćina (Winn i sar., 2006).

Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* su mali Gram negativni, nesporogeni štapići. Većina rodova su pokretni jer poseduju peritrihijalne flagele. Bakterije iz rodova *Tatumella*, *Shigella* i *Klebsiella* nisu pokretne. Fakultativni su anaerobi i većina vrsta raste pri 37 °C, mada neke vrste bolje rastu pri 25-30 °C. Dobro rastu na medijumu sa peptonom i ekstraktom mesa, dok neke vrste zahtevaju prisustvo D-glukoze kao jedinog

izvora ugljenika i energije. Druge vrste zahtevaju prisustvo vitamina i aminokiselina u podlogama. Uopšteno, oksidaza su negativne, a katalaza varijabilne i redukuju nitrate do nitrita izuzev roda *Erwinia* (Public Health England, 2015).

## 2.2. Istorijat, nomenklatura i taksonomija salmonela

Prve podatke o infekciji salmonelama kod pacijenata obolelih od tifusne groznice iznosi još 1873. godine engleski lekar William Budd. Tada još uvek nepoznat uzročnik bio je povezan sa fekooralnom kontaminacijom vode. Tokom 1884. godine George Gaffky kultivisao je tifoidni bacil koji je Eberth prethodno ustanovio 1880. godine u uzorcima slezine i mezenterijalnih limfnih čvorova nemačkog pacijenta preminulog od tifusa. Mikroorganizam sada poznat kao *Salmonella suis* je prvi put izolovan kod svinja od strane tehničara Theobald Smith-a 1885. godine. Međutim, ime je dobio po veterinaru Daniel Elmer Salmon-u 1886. godine, koji je bio u timu istraživača, koji su ga u to vreme razmatrali kao uzročnika klasične kuge svinja. Ovo je bio samo početak vezan za otkriće ovog uzročnika, pa su novi serotipovi otkrivani gotovo svake godine. Najpre su sojevi salmonela izolovani iz različitih kliničkih uzoraka poreklom od različitih domaćina, razmatrani kao različite vrste. Tako su im davana imena kao na primer tada "*Eberthella typhosa*", a danas *S. Typhi*. Analiza O i H antigena koja je najpre bila inicirana od strane White-a 1926. godine, a zatim i proširena po Kauffmann-u 1941. godine rezultovala je otkrivanjem velikog broja serotipova. Imena serotipova su obično bila vezana za geografsko poreklo serotipa gde je bio prvi put izolovan (npr. *S. London*). Koncept jedan serotip - jedna vrsta koji je najpre bio primenjivan, kasnije je postao neodbranljiv, iz razloga što većina serotipova nije mogla biti diferencirana biohemijskim testovima. Od 1944. do 1963. godine postojale su preporuke da bi trebalo da postoje samo tri vrste salmonela: *S. typhosa*, *S. choleraesuis* i *S. kauffmannii*. Kauffmann je 1966. godine podelio rod *Salmonella* na četiri podroda na osnovu biohemijskih reakcija (I - IV): *S. kauffmannii* – podrod I; *S. salamae* – podrod II; *S. arizonae* - podrod III i *S. houtenae* - podrod IV. Tokom 1980. godine objavljena je odobrena lista naziva bakterija u kojoj je bilo uključeno pet vrsta salmonela: *S.*

*arizonae*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* i *S. typhimurium*. Na osnovu genetskih istraživanja zasnovanih na tehnologiji termalne hibridizovane DNK, Leminor je 1982. godine sve serotipove uvrstio u jednu vrstu koju je označio kao *S. choleraesuis*. U okviru ove vrste postojalo je 6 podvrsta: *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *S. choleraesuis* subsp. *salamae*, *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *houtenae* i *S. choleraesuis* subsp. *bongori*. Nova podvrsta *S. choleraesuis* subsp. *indica* je kasnije pridodata 1986. godine. Zbog zabune koja je nastala usled istovremenog korišćenja naziva *S. choleraesuis* i za vrstu i za serotip 1987. godine predložen je naziv *S. enterica* sa sledećim podvrstama: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *bongori* i *S. enterica* subsp. *indica*. Ovakva podela nije bila prihvaćena od strane komisije Međunarodnog komiteta za sistematiku bakterija pa je na osnovu genetske sličnosti vrsta definisana kao grupa sojeva koji imaju više od 70% sličnosti DNK-DNK hibridizacijom pri  $T_m$  vrednosti ispod 5°C. Primenom ovog principa 1989. godine, rod *Salmonella* je podeljen u dve vrste: *S. enterica* i *S. bongori*. U okviru *S. enterica* nalazi se sada šest podvrsta: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* i *S. enterica* subsp. *indica* (Wray i Wray, 2000). Danas, White-Kauffmann-Le Minor šema objavljena od strane Grimont i Weill-a iz „Instituta Paster” iz Pariza definiše 2579 serotipova u okviru roda *Salmonella* (Tabela 2.2) (Grimont i Weill, 2007).

**Tabela 2.2.** Prisustvo različitih serotipova u svakoj vrsti i podvrsti salmonela (Grimont i Weill, 2007)

Vrsta i podvrsta	Broj serotipova
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1.531
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>S. bongori</i> (V)	22
<b>Ukupno</b>	<b>2.579</b>

### 2.3. Morfološke, kulturelne i biohemijske osobine salmonela

Bakterije roda *Salmonella* su pravi štapići, uglavnom pokretni, sa peritrihijalnim flagelama, rastu na hranljivom agaru, aero-anaerobi, fermentuju glukozu, često sa produkcijom gasa, redukuju nitrate u nitrite, oksidaza test su negativne i katalaza pozitivne (D'Aoust i sar., 1985). Postoje i izuzeci pa su serotipovi *S. Gallinarum* i *S. Pullorum* nepokretani (Škrinjar, 2001). Većina sojeva salmonela su prototrofni tj. ne zahtevaju prisustvo faktora rasta i mogu da rastu u medijumu sa minimalnim sadržajem glukoze kao izvorom ugljenika i energije i amonijumovog jona kao izvora azota. Optimalna temperatura rasta je 37°C (D'Aoust i sar., 1985). Neki serotipovi koji su adaptirani na domaćine (npr. Typhi, Paratyphi A, Gallinarum) su auksotrofni i zahtevaju jedan ili više faktora rasta. Sledeće biohemijske karakteristike se koriste za identifikaciju salmonela: ne hidrolizuju ureu, ne vrše dezaminaciju triptofana i fenilalanina, ne proizvode acetoin, ne fermentuju laktozu, adonitol, sukrozu, salicin i 2-ketoglukonat. Vodoni sulfid proizvode iz tiosulfata, vrše dekarboksilaciju lizina i ornitina, rastu na Simmons citratnom agaru, hidrolizuju 4-metilumbeliferin kaprilat (MUCAP). Neki serotipovi se ponašaju drugačije, pa tako na primer *S. Typhi* ne vrši dekarboksilaciju ornitina i ne raste na Simmons citratnom agaru.

Jedan od najvažnijih parametara koji utiče na rast mikroorganizama je temperatura. Bakterijske ćelije rastu u okviru potpuno određenog temperaturnog raspona. Taj raspon rasta određen je minimalnom temperaturom, ispod koje su ćelije metabolički neaktivne, i maksimalnom temperaturom, iznad koje ćelije ne rastu. Između tih ekstrema je optimalna temperatura rasta pri kojoj ćelije najbrže rastu i razmnožavaju se (Duraković i sar., 2002). *Salmonella* spp. raste na temperaturi od 5,2-46,2°C, a optimalna temperatura je u opsegu od 35 do 43°C (Tabela 2.3.) (ICMSF 1996). Delovanje temperature zamrzavanja ima štetan uticaj na opstanak *Salmonella* spp., ali ne rezultira uništavanjem mikroorganizma. Postoji početni pad broja mikroorganizama na temperaturi mržnjenja kao rezultat oštećenja bakterijske ćelije. Međutim, na nižim temperaturama *Salmonella* spp. ima sposobnost preživljavanja (Jay i sar., 2003). Istraživanja Strawn i Dayluk

(2010) su pokazala da *Salmonella* spp. preživljava na uzorcima papaje i manga, tokom 180 dana na temperaturi -20 °C.

Otpornost *Salmonella* spp. na dejstvo visokih temperatura zavisi od sastava hrane, pH vrednosti i aktivnosti vode ( $a_w$ ). Otpornost na visoke temperature se povećava shodno smanjenju aktivnosti vode u hrani. Hrana koja je bogata mastima sa niskom aktivnošću vode, kao npr. čokolada i kikiriki puter mogu imati protektivno dejstvo na salmonele pri visokim temperaturama. U uslovima niske pH vrednosti, otpornost *Salmonella* spp. na visoke temperature se smanjuje (Jay i sar., 2003; Shachar i Yaron 2006; Podolak i sar., 2010).

Salmonele rastu u širokom opsegu pH vrednosti od 3,8-9,5 sa optimalnim opsegom od 7-7,5 (ICMSF, 1996). Minimalne pH vrednosti na kojima *Salmonella* spp. može da raste zavise od temperature, prisustva soli, nitrita i raznih vrsta kiselina u hrani. Isparljive masne kiseline kao na primer mlečna, limunska i sirćetna imaju intenzivnije baktericidno dejstvo u odnosu na organske kiseline (Bell i Kyriakides 2002; Jay i sar., 2003).

Voda je osnovni rastvarač i važna je za svaku reakciju u živom organizmu. Iz tih razloga udeo vode značajno utiče na rast i razmnožavanje mikroorganizama. Jedinica mere za potrebe mikroorganizama za vodom se izražava kao aktivnost vode ( $a_w$ ). Aktivost vode ima značajan uticaj na rast i preživljavanje *Salmonella* spp. Optimalni opseg se kreće od 0,99 do 0,93. Prema literaturnim podacima *Salmonella* spp. može da preživi mesecima ili čak i godinama u hrani sa niskom aktivnošću vode kao što je npr. crni biber, čokolada, želatin (ICMSF 1996; Podolak i sar., 2010).

**Tabela 2.3.** Opseg temperature, pH vrednosti i  $a_w$  za rast *Salmonella* spp. (ICMSF 1996; Podolak i sar., 2010)

	<b>Minimalno</b>	<b>Optimalno</b>	<b>Maksimalno</b>
<b>Temperatura</b>	5.2	35–43	46.2
<b>pH</b>	3.8	7–7.5	9.5
<b>Aktivnost vode</b>	0.93	0.99	>0.99

## 2.4. Epidemiološki značaj salmonela

Različiti serotipovi salmonela imaju različite domaćine. Neki serotipovi su patogeni isključivo za čoveka kao na primer *S. Typhi* i *S. Paratyphi*, dok drugi serotipovi (*S. Typhimurium* i *S. Newport*) inficiraju različite vrste (Miller i Pegues, 2000; Rabsch i sar., 2002). Netifoidalne salmoneloze ljudi obično prouzrokuje nekoliko desetina serotipova. U međuvremenu, sve više i više serotipova se izoluje naročito od imunokompromitovanih pacijenata. Ključni faktor koji definiše određeni serotip salmonele kao uspešnog patogena je njegova sposobnost da preko određenih molekularnih mehanizama uđe u nefagocitnu ćeliju domaćina, i da se prilagodi širokom krugu domaćina (Garcia-del Portillo, 2001).

Molekularna osnova patogeneze salmoneloza je dosta proučavana. Inicijalni korak podrazumeva ulazak u citosol ćelije domaćina i modifikaciju aktina, što dovodi do nabiranja ćelijske membrane i ulaska bakterije u ćeliju domaćina (Hayward i Koronakiss, 2002). Bakterijski produkti takođe imaju sposobnost da aktiviraju puteve koji omogućavaju da se izbegne odbrambeni sistem domaćina. Smatra se da se jedinstveni faktori virulencije kod salmonela nasleđuju horizontalnim transferom gena i njihovom integracijom u bakterijski hromozom. Jedan od primera je i gen virulencije nazvan "*Salmonella Pathogenicity Islands*" (SPI). Identifikovano je pet takvih SPI gena koji se često nalaze kod različitih serotipova. Ovi geni se nalaze na plazmidima, česti su kod mnogih sojeva, a odgovorni su za specifičnu interakciju, što omogućava da salmonele postanu adaptirani na svog domaćina (Marcus i sar., 2000).

*Salmonella Choleraesuis* je prvi serotip salmonele koji je izolovan od svinja (Salmon i Smith, 1886) i to samo dve godine nakon što je salmonela prvi put izolovana od strane Gafkija 1884. godine (Le Minor, 1994). Serotipovi salmonela se razlikuju na osnovu njihovih somatskih i flagelarnih antigena. Na osnovu vrste koju inficiraju (Uzzau i sar., 2000) serotipovi salmonela se mogu podeliti na: 1. serotipove koji prouzrokuju tifoidne salmoneloze kod jedne vrste (specijes specifični serotipovi, kao na primer *Salmonella Typhi* kod ljudi); 2. serotipovi udruženi sa jednom vrstom domaćina, ali mogu da prouzrokuju bolest i kod drugih domaćina (specijes adaptirani serotipovi



kao na primer *Salmonella Choleraesuis* i *Salmonella Typhisuis* kod svinja) (Timoney i sar., 1988; Selander i sar., 1990); 3. Velika većina drugih serotipova koji retko prouzrokuju sistemsku infekciju, ali mogu da kolonizuju digestivni trakt različitih vrsta životinja (specijes nespecifični serotipovi kao na primer *Salmonella Typhimurium* i *Salmonella Derby* (Fedorka-Cray i sar., 2000).

Postoji nekoliko načina prenosa salmonela, a najučestaliji je putem kontaminirane hrane životinjskog porekla, što potvrđuju brojna istraživanja. Salmoneloze ljudi se svrstavaju u grupu najučestalijih i ekonomski najznačajnijih zoonoza. Po učestalosti zauzimaju drugo mesto odmah iza kampilobakterioze (EFSA, 2011; EFSA, 2015). Uredbom Evropske komisije (EC 2160/2003) o kontroli salmonela i drugih uzročnika zoonoza koji se prenose hranom, propisano je sprovođenje mera u svrhu otkrivanja i kontrole salmonela kao 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 raširenost i rizik koji predstavljaju za javno zdravlje.

U skladu sa izveštajem Evropske agencije za bezbednost hrane (European Food Safety Authority - EFSA) o rezultatima utvrđivanja prevalencije bakterija roda *Salmonella* kod svinja za klanje sprovedenim u okviru zemalja Evropske unije (EU), infekcije svinja za klanje salmonelama predstavljaju značajan rizik za kontaminaciju mesa svinja te, putem unosa u lanac hrane i moguća posledična oboljenja ljudi. Sigurno rukovanje sirovim mesom i odgovarajuća toplotna obrada (kuvanje) su mere od izuzetne važnosti za smanjenje rizika za oboljenje ljudi putem kontaminiranog mesa svinja.

Tokom 2009. godine u zemljama EU prijavljeno je ukupno 108.164 slučajeva salmoneloze kod ljudi, što predstavlja smanjenje broja obolelih za 17,4% u odnosu na 2008. godinu. Ovo ukazuje na uspešno sprovođenje nacionalnih programa kontrole *Salmonella*, kao i na uspešnu primenu adekvatnih mera u lancu proizvodnje hrane. Tokom 2009. godine u EU *Salmonella* je izolovana iz pilećeg mesa u 5,4% uzoraka, u ćurećem mesu 8,7% i u svinjskom mesu u 0,7% uzoraka. *Salmonella* je takođe nađena i u mlečnim proizvodima, voću i povrću (EFSA i ECDC, 2013). Istraživanja na klanicama svinja tokom 2006. i 2007. godine koja su obuhvatila 24 zemlje članice EU, su pokazala prevalenciju *Salmonella* u limfnim čvorovima od 10,3%, dok je na trupovima svinja poreklom iz 13 zemalja EU prevalencija bila 8,3% (EFSA, 2008).

U 2014. godini potvrđeno je 88.715 slučajeva salmoneloze od strane 28 članica zemalja EU, što predstavlja incidencu pojave od 23,4 slučaja na populaciju od 100.000 ljudi. U istoj godini zabeleženo je 65 slučajeva smrtnog ishoda od strane 11 članica zemalja EU sa incidencom od 0,15% na 43.955 potvrđenih slučajeva (EFSA, 2015).

Inficirane svinje mogu biti kliconoše i intermitentno izlučivati salmonele izmetom u okolinu. Izlučivanje uzročnika podstaknuto je stresom pa veliku ulogu u tome ima pravilan postupak prilikom utovara i transporta životinja od mesta nabavke do klanice uz uvažavanje načela dobrobiti životinja.

Salmoneloza je oboljenje želudačno-crevnog trakta ljudi i životinja. Salmoneloze su primarno bolesti domaćih životinja, koje se na čoveka prenose konzumiranjem hrane animalnog porekla, kontaminirane salmonelom (Yan i sar., 2003).

Najčešći izazivači alimentarnih toksikoinfekcija su *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. Wirchov*. Gotovo sve salmonele su primarni stanovnici digestivnog trakta životinja. Najčešći izvori salmonela su domaće životinje (svinje, goveda, ovce) i živina (kokoške, patke, guske, ćurke). Inficirane životinje izlučuju salmonele preko izmeta, sekreta i ekskreta, a salmonele kod zaraženih životinja se nalaze i u njihovom mleku, mesu, kao i u jajima kod živine. Domaće životinje veoma često mogu biti samo kliconoše, a da ne pokazuju nikakve znakove bolesti. Kod obolelih životinja salmoneloza se ispoljava u vidu septikemije ili zapaljenja digestivnog trakta. Upotreba kontaminirane hrane za životinje pogoduje širenju salmoneloza. Alimentarne toksikoinfekcije, izazvane salmonelama najčešće nastaju konzumiranjem kontaminiranog mesa i mesnih prerađevina (mesne salate, mleveno meso, kobasice za mazanje i sveže sirove kobasice), mleka i proizvoda od mleka (sladoled, sir, kremovi), jaja (sveža, smrznuta, osušena), riba, rakova i školjki. Pojava salmoneloza kod ljudi dovodi se u vezu sa prljavim rukama kliconoše ili obolelog, kao i upotrebom zagađenog pribora i posuđa. Izvori infekcije salmonelama mogu biti i zaraženi glodari, kućni ljubimci i čovek. Infekcija bakterijama iz roda *Salmonella* najčešće ima sledeći tok (Bem,1991):

HRANA ZA ŽIVOTINJE → ŽIVOTINJE → HRANA → ČOVEK

Hrana poreklom od zdravih životinja, može se naknadno kontaminirati salmonelama: nehigijenskim postupcima obrade hrane, upotrebom higijenski neispravne

vode, izlučevinama zaraženih glodara, preko insekata, kao i neadekvatnim postupcima u toku transporta, čuvanja i distribucije hrane. Salmoneloze kod čoveka mogu nastati nakon konzumiranja mesa, mleka i jaja, koja potiču od zaraženih životinja i njihovih proizvoda, ili naknadno kontaminiranih salmonelom. Kontakt sa zaraženim životinjama i vodom su znatno ređi način prenošenja salmonela. Salmoneloze se kod ljudi javljaju tokom cele godine, a najčešće leti i početkom jeseni. Oboljenje se javlja sporadično ili u vidu epidemija u porodici ili kolektivnim ustanovama, kao što su vrtići, škole, restorani i bolnice. Od unosa kontaminirane hrane pa do pojave prvih znakova bolesti može proći od 6 do 72 sata, a najčešće se bolest manifestuje u periodu od 12 do 36 sati. Vreme pojave prvih simptoma bolesti, kao i intenzitet oboljenja zavise od stepena kontaminacije namirnice, ali i od opšteg stanja obolelog. Da bi došlo do bolesti u organizam je potrebno uneti oko  $10^9$  živih ćelija *S. Pullorum* po gramu namirnice, ili svega nekoliko živih ćelija *S. Typhi*. Kod većine vrsta salmonela potrebno je uneti  $10^5$  do  $10^6$  ćelija/g namirnice. Infektivna doza, kada su u pitanju infekcije salmonelama, varira i zavisi od soja i imunološkog statusa pacijenta. Dostupni podaci ukazuju na to da infekcija može nastati ingestijom 10 – 45 bakterijskih ćelija. Infektivna doza je niža ukoliko se salmonele nalaze u namirnicama sa visokim sadržajem masti i proteina, koji štite bakterijsku ćeliju od uticaja niskog pH želudačnog soka (Blaser i Newman, 1982; D'Aoust i sar., 1985; Lehmacher i sar., 1995).

Na infekcije salmonelama su osetljivija deca, rekovalescenti, trudnice, dojilje, stari i osobe koje već boluju od neke bolesti (Isaacs, 2005). Salmoneloze obično počinju naglo sa groznicom, bolovima u truhu, mučninom, prolivom i povraćanjem. Stolica su retke, neprijatnog mirisa, zelenkaste boje. Uz navedene simptome javljaju se i glavobolja, povišena temperatura, malaksalost i pospanost. Obilna povraćanja i prolivi mogu dovesti do dehidracije organizma, kada mogu nastati i izrazito teška oboljenja: artritis, meningitis, sepsa i upala pluća. Smrtni ishod kao rezultat salmoneloze je veoma retka, javlja se u svega 1-2% slučajeva. Obolele osobe potrebno je obavezno staviti pod nadzor lekara. Posle akutne faze bolesti, salmonele se često duže vremena zadržavaju u crevima ili se naseljavaju u žučnom mehuru, jetri ili bubrezima. U takvim slučajevima osobe koje su preležale salmonelozu, bez ikakvih znakova oboljenja mogu i u toku više meseci izlučivati salmonele. Iz tih razloga neophodna je zdravstvena kontrola svih radnika zaposlenih u prehrambenoj industriji i u objektima u kojima se prerađuje ili

priprema hrana. Razvijeni su različiti programi nadzora na globalnom nivou, ali i nacionalni u različitim zemljama u cilju praćenja epidemiologije salmoneloza i antimikrobne rezistencije salmonela, kako bi se na vreme utvrdio izvor infekcije, faktori rizika i pravovremeno izvršilo ispitivanje epidemije (Yan i sar., 2003).

Prema zvaničnom izveštaju o zaraznim bolestima u 2012. godini, koji objavljuje Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ na teritoriji Republike Srbije je registrovano 15.677 lica obolelih od crevnih zaraznih bolesti. U grupi crevnih zaraznih bolesti animalne salmoneloze zauzimaju treće mesto sa 1550 slučajeva obolevanja, procentualnim učešćem 9,89% i incidencijom 21,56/100.000 stanovnika. Na teritoriji Republike Srbije registruje se trend pada stope incidencije salmoneloza. Najviša specifična incidencija registrovana je u uzrasnoj grupi 0–4 godine (157,19/100.000), a najniža u uzrasnoj grupi 40–49 i 60 i više godina (10,69/100.000, odnosno 10,96/100.000). U 2012. godini je registrovan jedan smrtni ishod kod osobe ženskog pola starije od 60 godina, obolele od salmoneloze sa teritorije Nišavskog okruga. Registrovane su 63 epidemije salmoneloza u kojima je put prenosa bila hrana, sa ukupno 483 obolele osobe, od kojih je 139 osoba hospitalizovano, šest epidemija sa neutvrđenim putem prenosa, sa 18 obolelih i dve hospitalizovane osobe i četiri epidemije sa kontaktnim putem prenosa, 66 obolelih i jednim hospitalizovanim licem. Najčešći uzročnik salmoneloze kod ljudi bila je *S. Enteritidis* (Institut za javno zdravlje Srbije, 2012).

Prema izveštaju Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ (2015) u 2014. godini bilo je 1512 potvrđenih slučajeva salmoneloze, a od toga 470 u Vojvodini i 1042 u Centralnoj Srbiji. Prema uzrasnoj dobi, najzastupljeniji su bila deca sa dve godine i osobe preko 60 godina. Najčešći uzročnik je bila *Salmonella* Enteritidis i otkrivena je u 67 slučajeva alimentarnih epidemija (Institut za javno zdravlje Srbije, 2015).

U SAD se procenjuje da oko 1,2 milion ljudi godišnje oboli od netifoidnih oblika salmoneloza (CDC, 2012). Klinički se infekcija salmonelom manifestuje gastroenteritisom, mučninom, povraćanjem, prolivom, a može biti praćena i povišenom temperaturom. Kod malog broja pacijenata (<5%) razvija se invazivna forma salmoneloze, praćena ekstragastrintestinalnom infekcijom koja uključuje bakterijemiju, koja u manjem procentu (5-10%), kasnije može preći u lokalizovanu

formu (Lesser i Miller, 2003). Invazivni oblici salmoneloznih infekcija mogu biti prouzrokovani različitim serotipovima, a u patogenezi zajedničko za sve serotipove je adhezija i ulazak salmonela u epitelne ćelije crevnih resica. Adhezija je proces za koji je ključno postojanje nekoliko vrsta fimbrija ili pila salmonela. Invazija crevnih resica je osnovna karakteristika i to je osobina koju poseduju svi serotipovi salmonela. Bakterije roda *Salmonella* imaju sposobnost da invadiraju nefagocitne ćelije crevnog epitela prouzrokujući gastroenteritis. One se umnožavaju prevashodno u limfatičnom tkivu gastrointestinalnog sistema (Pajerove ploče). Progresija bolesti ka sistemske infekciji zahteva dolazak salmonela do mezenterijalnih limfnih čvorova i njihov transport preko fagocitnih ćelija do jetre i slezine (Groisman i Mouslim, 2000; Santos i sar., 2001).

## **2.5. Svinje i meso svinja kao izvor salmoneloza kod ljudi**

Infekcija svinja adaptiranim serotipovima Typhisuis i Choleraesuis obično dovodi do tifusa svinja, koji se karakteriše teškom sistemskom bolešću koja često završava letalno. Patogeneza infekcije kod svinja sa specijes nespecifičnim serotipovima salmonela je prilično zanemarivana do skoro. Mada ove infekcije mogu rezultovati pojavom enterične forme i fatalne sistemske infekcije, inficirane svinje mogu biti i asimptomatski nosioci ovih serotipova na tonzilama, u crevima i limfatičnom tkivu digestivnog trakta (GALT – „gut associated lymphoid tissue“) (Wood i sar., 1989; Fedorka-Cray i sar., 2000). Ovakve svinje su kliconoše i glavni rezervoari salmonela i predstavljaju važnu pretnju za zdravlje životinja i ljudi. Dobro poznavanje serotipova koji inficiraju svinje treba da bude osnova za razvoj i procenu efikasnog monitoringa i kontrolnih mera (Boyle i sar., 2007).

Tokom pedesetih i šezdesetih godina prošlog veka, *S. Choleraesuis* uključujući i varijetet Kunzendorf je bio dominantan serotip kod svinja širom sveta (Fedorka-Cray i sar., 2000). Sada je *S. Choleraesuis* visoko zastupljena u Americi i Aziji, a retko se nalazi kod svinja u Australiji i zemljama zapadne Evrope (Wilcock i Schwartz, 1992; Fedorka-Cray i sar., 2000). Svinje mogu biti inficirane sa nekoliko serotipova, a pojava pojedinih serotipova je delimično geografski određena (Fedorka-Cray i sar., 2000;

Loynachan i sar., 2004). Svi serotipovi izolovani od svinja se razmatraju kao opasni za javno zdravlje prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane (EFSA, 2006b). Međutim, širom sveta najčešće izolovani netifoidni serotipovi izolovani iz svinja i svinjskog mesa su *S. Typhimurium* uključujući varijetet Copenhagen i *S. Derby* (Lettelier i sar., 1999; Gebreyes i sar., 2004; EFSA, 2006b).

Posle pilećeg mesa, svinje i svinjsko meso predstavljaju drugi po učestalosti izvor salmoneloza kod ljudi u Evropi (EFSA, 2014). Od ukupno 533 izolata salmonela sakupljenih iz 17 zemalja članica EU, Danska je prijavila najveći broj izolata (92), zatim Belgija (62), Rumunija (59), i Nemačka (57). Najzastupljeniji serotip je bio *S. Typhimurium* sa učešćem od 27,8%, zatim *S. Derby* 24,4% i monofazna *S. Typhimurium* (EFSA, 2015).

*S. Enteritidis* je najznačajniji serotip koji prouzrokuje salmonelozu kod ljudi u mnogim zemljama. Međutim, značajno je smanjenje infekcija prouzrokovanih *S. Enteritidis* preko jaja tokom 2005. i 2006. godine u Evropskim zemljama (Gillespie i Elsom 2005; Mossong i sar., 2006), a *S. Typhimurium* sada postaje predominantni serotip izolovan od ljudi u Evropi i svinje su možda najvažniji izvor infekcije ovim serotipom u ovim zemljama. Procenjuje se da je 15 do 23% svih slučajeva salmoneloza kod ljudi u Evropskim zemljama povezano sa konzumiranjem svinjskog mesa (Borch i sar., 1996; Berends i sar., 1998). Relativni značaj svinjskog mesa kontaminiranog salmonelama kao izvora salmoneloze kod ljudi u evropskim zemljama verovatno će biti i veći, zbog opadanja slučajeva uzrokovanih sa *S. Enteritidis*. U SAD statistički modeli predviđaju da svake godine približno 100.000 slučajeva salmoneloze kod ljudi se vezuje za konzumiranje svinjskog mesa, sa troškovima na godišnjem nivou od oko 80 miliona dolara (Miller i sar., 2005).

Rizik za javno zdravlje od infekcije salmonelama konzumacijom kontaminiranog svinjskog mesa zavisi od više faktora koji uključuju nivo infekcije na farmi svinja, higijene tokom obrade trupova u klanici uslova pri skladištenju mesa i distribuciji i konačno od rukovanja svežim mesom od strane potrošača. Kao prvi korak u integrisanom evropskom pristupu u kvantitativno mikrobiološkoj proceni rizika (QMRA- „Quantitative microbial risk assessment“), EFSA priprema da izvede QMRA za salmonelu kod svinja, od farme do trpeze (Borch i sar., 1996; Hill i sar., 2003; Mann i sar., 2004; EFSA, 2006b).

U Danskoj je u primeni Nacionalni program za kontrolu salmonela koji je integrisan u lanac proizvodnje svinja od „farme do trpeze“. Tokom uzgoja vrši se ispitivanje uzoraka krvi svinja serološkim metodama, dok se na klanici rade serološka ispitivanja mesnog soka. U periodu od 1993. kada je program implementiran, pa do 1998. godine bakteriološkim pregledom uzoraka uočeno je značajno smanjenje incidencije infekcije svinja salmonelama i to za 50%, odnosno sa 14,7% na 7,2% na manjim farmama i sa 22% na 10,4% na velikim farmama svinja (Christensen i sar., 2002).

### **2.5.1. Nalaz salmonela na trupovima svinja**

Predstavnici porodice *Enterobacteriaceae* su široko rasprostranjeni i većina su komensali, kao što su na primer pojedini sojevi *E.coli*, ali ima i patogenih vrsta koje predstavljaju značajnu opasnost po javno zdravlje. Kontaminacija sirovina, u ovom slučaju trupova svinja, odnosno mesa je najčešće posledica primenjenih postupaka u primarnoj proizvodnji i zavisi od primene dobre proizvođačke/higijenske prakse duž lanca proizvodnje mesa, naročito tokom operacija klanja i dalje obrade. Indikator mikroorganizmi, predstavljaju informaciju o higijeni procesa i neadekvatnim postupcima koji su korišćenji tokom proizvodnje. Predstavnici enterobakterija predstavljaju dobar indikator higijene i poštovanja dobre proizvodne/higijenske prakse, jer se relativno brzo i jednostavno otkrivaju.

Nalaz bakterija roda *Salmonella* u brisevima sa trupova zaklanih svinja predstavlja indikator higijene proizvodnog procesa. Kontaminacija trupa može nastati kao posledica tehničkih grešaka tokom procesa obrade (npr. slučajno zarezivanje creva ili izlazak fecesa iz anusa). Salmonele preživljavaju u okruženju u klanici, a posebno ih je teško ukolniti sa opreme. Loša higijena osoblja u klanici može rezultirati kontaminacijom trupova, a međusobnim dodirima trupova dolazi do unakrsne kontaminacije. Berends i sar. (1997) su dokazali vezu između svinja kao rezervoara *Salmonella* u fecesu i kontaminiranih polutki na liniji klanja. Ustanovljeno je da 70% kontaminiranih polutki potiče od svinja koje su bile nosioci, dok je 30% bila unakrsna kontaminacija.

Ispitivanja u Srbiji su pokazala da je salmonela izolovana sa kože svinja kod 46,7% pregledanih trupova sa kojih su uzeti brisevi neposredno posle omamljivanja (Karabasil

i sar., 2012a). U tom ispitivanju na klanici A je salmonela nađena kod 20% trupova pri prvom uzorkovanju, odnosno kod 53,3% trupova pri drugom uzorkovanju, dok je na klanici B 66,7% trupova bilo pozitivno na prisustvo salmonele. Brisevi su u klanici A uzorkovani sa tri mesta na trupu (grudi, but i koren repa), a u klanici B sa dva mesta na trupu (grudi i but). Najčešći nalaz salmonela bio je na grudima 30%, dok je iz uzoraka buta i korena repa bio niži i iznosio je 23,3% odnosno 13,3%. Serotipovi salmonela koji su izolovani sa trupova svinja nakon omamljivanja su *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Senftenberg*, *S. Menston* i *S. Bredeney*. U drugom delu istraživanja istog autora, koje se odnosilo na ispitivanje zastupljenosti salmonela na trupovima svinja nakon obrade na klanici A, nije utvrđeno prisustvo salmonele ni u jednom uzorku sa grudi, buta i korena repa. Od pregledanih 30 trupova u klanici B, salmonela je izolovana sa tri trupa iz brisa grudi, dok su uzorci buta bili negativni. Izolovani su serotipovi *S. Mbandaka* i *S. Bredeney* (Krabasil i sar., 2012b).

Najčešće izolovani serotipovi iz uzoraka svinja (Anon, 2002) u većini zemalja EU su: *S. Typhimurium* (57%), *S. Derby* (10,4%), *S. Bovismorbificans* (3,2%), *S. Infantis* (2,9%) i *S. Branderburg* (2%). Sa druge strane najčešće izolovani serotipovi iz mesa svinja su: *S. Typhimurium* (37%), *S. Derby* (18%), *S. Infantis* (4%), *S. Enteritidis* (1%) i *S. Anatum* (1%).

Nalaz salmonela na trupu svinja po završnoj obradi prema podacima iz Italije je 6% (Bonardi i sar., 2003), Švajcarske 0,2% (Sauli i sar., 2003), Velike Britanije 5,3% (Davis i sar., 2000), Nemačke 4,7% (Käshborer i sar., 2000).

Salmonele spadaju među važnije patogene bakterije, a meso svinja jedan je od glavnih izvora infekcije ljudi. U Belgiji su prema podacima iz 2008 godine registrovana 3944 slučaja infekcije salmonelama od čega je *Salmonella Typhimurium* (57%) bio najčešći serotip (NRSS, 2008). Smatra se da je stvaran broj infekcija ljudi znatno veći od zabeleženih, jer jedan broj ostaje neprijavljen (EFSA, 2008). Da bi se utvrdili izvori kontaminacije salmonelama u lancu proizvodnje mesa, značajan podatak predstavlja informacija o nalazu ovih bakterija na farmi (Korsak i sar., 2003). Prilikom transporta svinja od farme do klanice prevalencija salmonela se povećava, što ukazuje na to da se radi o unakrsnoj kontaminaciji. Unakrsna kontaminacija u klanici predstavlja značajan problem sa aspekta bezbednosti hrane, a boravkom dužim od 12 časova svinja u stočnom depou povećava se i mogućnost kontaminacije (Karabasil i sar., 2007; De



Busser i sar., 2011). U prilog ovoj činjenici govori podatak da je utvrđen sedam puta češći nalaz salmonela u uzorcima svinja uzetih iz stočnog depoa u odnosu na uzorke svinja sa farme (Hurd i sar., 2001). Ispitivanja Karabasil i sar., (2012c) ukazuju da je stočni depo za svinje redovno kontaminiran salmonelama. Od ukupno 72 pregledana uzorka, 9 (12,50%) je bilo pozitivno na salmonele. Salmonela je utvrđena na sledećim površinama: pod istovarne rampe (22,22%), koridor istovarna rampa – stočni depo (33,33%), pod boksa u stočnom depou (22,22%), koridor stočni depo – boks za omamljivanje (22,22%). Ispitivanjem uzoraka sa zidova bokseva, vode iz napajalica stočnog depoa, kanala za odvod fekalija i prolaza od stočnog depoa do koridora nije ustanovljeno prisustvo salmonele. U istom radu, ispitivanja su pokazala da je iz uzoraka briseva površina boksa za omamljivanje salmonela ustanovljena u 61,11% (18/11) uzoraka. Serotipizacijom je utvrđeno da dobijeni izolati i u stočnom depou i u boksu za omamljivanje pripadaju *S. Typhimurium* i *S. Mbandaka*. Ova ispitivanja ukazuju da su površine u stočnom depou, kao i u boksu za omamljivanje redovno kontaminirane salmonelom, i da mogu predstavljati izvore unakrsne kontaminacije životinja pa i trupova na liniji klanja svinja.

U drugim ispitivanjima sprovedenim na pet klanica u Srbiji (Petrović i sar., 2008) ispitivana je raširenost salmonele na trupovima zaklanih svinja nakon obrade i ustanovljena je kontaminacija salmonelom na klanici A od 1,85%, na klanici B od 6,06%, C od 3,7%, D od 1,85%, dok na klanici E nije ustanovljeno prisustvo salmonela.

### **2.5.2. Monitoring i nadzor salmoneloze**

Različite vrste životinja mogu oboleti od salmoneloze i predstavljati potencijalni rezervoar infekcije ljudi. Salmonela može da uđe u lanac ishrane preko trupova kontaminiranih fecesom na klanici tokom proizvodnje, ili prilikom rukovanja hranom (Daniels i sar., 2002). Međutim, infekcija ljudi može da nastane preko kontaminirane vode, kućnih ljubimaca, i egzotičnih životinja (Ackman i sar., 1995). Mere koje se preduzimaju za kontrolu prenošenja salmonela su efektivni način za prevenciju salmoneloze.

Premortalni pregled životinja treba da omogućiti da se za klanje koriste samo vizuelno čiste i zdrave životinje, ali se njime ne mogu otkriti svinje koje u intestinalnom traktu ili na svojoj koži nose patogene mikroorganizme. Različiti procesi na liniji klanja imaju za cilj dobijanje higijenski ispravnog i bezbednog mesa, ali istovremeno nose i rizik od kontaminacije trupova prilikom manipulacije. Izvori kontaminacije na liniji klanja svinja su brojni i mogu poticati od samih životinja (fekalni sadržaj, faringealni sadržaj) i iz sredine u kojima se životinje nalaze (stočni depo, oprema). Vrlo često, kontaminacija trupa nastaje tokom evisceracije, pa je poštovanje dobre proizvodne prakse i higijene same klanice od presudnog značaja (Karabasil i sar., 2008).

Mašine u kojima se obavlja uklanjanje dlake, mogu takođe predstavljati izvor kontaminacije salmonelama. Feces iz analnog otvora može kontaminirati mašinu, pa se na taj način mogu kontaminirati sledeći trupovi koji dolaze na obradu. Bakterijska rekontaminacija trupova se može smanjiti ako se za pranje mašina koristi vruća voda temperature 60 do 62°C. Nakon šurenja se zaostala dlaka sa trupa uklanja opaljivanjem pri čemu se uništavaju i mikroorganizmi prisutni na koži, ali ni ova operacija ne mora uvek da bude efikasna. Tokom šurenja pri temperaturi od 60 do 62 °C može doći do oštećenja epitela, a potom prilikom uklanjanja dlake u narednoj fazi mikroorganizmi mogu biti potisnuti u subepitelijalnom tkivu (Karabasil i sar., 2008).

Prevalencija salmonela u svežem mesu je u direktnoj vezi sa nalazom kod živih životinja i zavisi od daljeg tehnološkog procesa kom se podvrgavaju trupovi zaklanih svinja. Blagovremeno utvrđivanje prisustva salmonela kod svinja je od vitalnog značaja iz više razloga. Prvo pomaže doktorima veterinarske medicine da direktno na farmi na osnovu dobijenih izolata i antibiograma odrede odgovarajuću terapiju kod klinički obolelih svinja. Drugo, unapređenjem interventnih mera može se smanjiti prevalencija salmonela kod svinja. Na kraju, najveća korist jeste u tome da što manji broj kliconoša dospe u klanicu. Na taj način smanjuje se rizik od kasnije kontaminacije trupa na liniji klanja i eventualnih alimentarnih infekcija ljudi (Karabasil i sar., 2008).

Kolonizacija salmonela i prouzrokovanje bolesti kod pojedinih životinjskih vrsta razlikuje se u vremenu, regionu, sezoni i metodologiji ispitivanja. Neki serotipovi potiču gotovo isključivo iz određenih izvora. Primeri ovih serotipova su *S. Enteritidis*, koja se najčešće izoluje iz jaja (St Louis i sar., 1988) i *S. Choleraesuis* koja se uglavnom nalazi kod svinja (Turk i sar., 1992). Podaci o prevalenciji pojedinih serotipova salmonela i

sojeva za svaku životinjsku vrstu je važna komponenta programa epideimoloških nadzora. Serotipovi salmonela ustanovljeni kod različitih vrsta životinja koje se koriste u ishrani ljudi se razlikuju među sobom, ali takođe može biti preklapanja. Na primer, USDA je prijavila u periodu 1999-2000, da je pet najčešćih serotipova salmonela kod tovne junadi *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Dublin*, *S. Montevideo* i *S. Newport* (Yan i sar., 2003). Serotipovi Derby, Typhimurium, Heidelberg, Worthington i Mbandaka su prijavljeni kao najčešći kod svinja (Davies i sar., 1997), a kod živine kao najčešće izolovani serotipovi prijavljeni su Heidelberg, Kentucky, Hadar, Typhimurium i Thompson (Sarwari i sar., 2001). Takođe, postoje značajna preklapanja kod najčešće izolovanih serotipova salmonela kod životinja koje se koriste u ishrani ljudi i kod salmonela izolovanih od ljudi. Programi nadzora na salmonelama koji prate prevalenciju i antimikrobnu osetljivost humanih i životinjskih izolata su od ključnog značaja za javno zdravlje.

Programi nadzora na međunarodnom, nacionalnom, regionalnom i lokalnom nivou su uspostavljeni za praćenje epidemija salmonelama, geografske distribucije i antimikrobne rezistencije. Tokom 1996 godine, CDC, FDA i USDA su osnovali Nacionalni sistem za praćenje antimikrobne rezistencije da bi prospektivno pratili promene u antimikrobnoj osetljivosti zoonotskih patogena iz kliničkih uzoraka poreklom od ljudi i životinja, zdravih farmskih životinja i trupova zaklanih životinja na klanicama. Ovaj program je dizajniran da prati prevalenciju i antimikrobnu rezistenciju izolata salmonela izolovanih od ljudi i životinja. Uzorci od životinja uključuju dijagnostičke izolate i izolate sa klanica dok uzorci od ljudi uključuju uglavnom dijagnostičke izolate, a godišnje se objavljuju izveštaji o rezultatima monitoringa (Yan i sar., 2003).

Cilj monitoringa i kontrolnih programa je obezbediti zdravstveno bezbednu namirnicu kroz integrisani lanac proizvodnje i samim tim sprečiti pojavu bolesti kod ljudi i na taj način održati poverenje potrošača. Mere za kontrolu salmoneloze se mogu implementirati na tri nivoa: na farmi, zatim tokom transporta i u klanici, i posle klanja pri rasecanju, obradi, prodaji i pripremi hrane kod kuće. Implementacija programa monitoringa i koordinacija kontrolnih mera na klanici i posle klanja se koriste širom sveta za prevenciju netifoidnih infekcija kod ljudi (Mossel i sar., 2003; Chen i sar.,

2006; Padungtod i Kaneene, 2006; EFSA, 2006b; Hamilton i sar., 2007; Larsen i sar., 2007; Rajic i sar., 2007).

Prošireni nacionalni monitoring i kontrolni programi na nivou farme su uglavnom sprovedeni u evropskim zemljama (regulativa EC 2160/2003; Asai i sar., 2002, 2006; EFSA, 2006b; Hamilton i sar., 2007; Larsen i sar., 2007; Rajic i sar., 2007). Jedino su skandinavske zemlje prijavile malu prevalenciju za salmonelu EFSA. U Švedskoj monitoring na farmi i na klanici su implementirani kao i obavezujući i na dobrovoljnoj osnovi, korišćenjem uglavnom izolaciju za procenu kontaminacije salmonelama (Wahlstrom i sar., 2000; EFSA, 2006b). Danski, britanski, irski i nemački programi su zasnovani na serološkom ispitivanju uzoraka mesnog soka uzetih na klanici, čime su kategorisane farme svinja prema riziku da se u klanicu unese salmonela (Nielsen i sar., 2001; Davies i sar., 2004; EFSA, 2006b; Merle i sar., 2007). Belgijski i holandski programi monitoringa su slični, ali su serološki pregledi trenutno bazirani na pregledu uzoraka krvi ili seruma od svinja na samoj farmi (EFSA, 2006b; Boallaerts i sar., 2007; Hanssen i sar., 2007). Farme koje pripadaju kategoriji sa najvećim rizikom za unošenje salmonela u klanicu su potpomognuti nacionalnim programom vlade za redukovanje salmonela na farmi (EFSA, 2006a,b).

Monitoring na prisustvo *Salmonella* u mesu svinja i proizvoda poreklom od svinjskog mesa, su dužne da primenjuju sve zemlje članice EU. Monitoring je baziran na uzimanju uzoraka briseva u klanicama sa površine trupova i/ili uzoraka mesa. Prvog juna 2014. godine regulativa EU EC No. 2073/2005 proširena je amandmanom broj 217/2014, u kome se smanjuje broj prihvatljivih *Salmonella* pozitivnih uzoraka sa 5 od 50 (10%) na 3 od 50 (6%) (EFSA, 2015). Tokom 2014. godine, u zemljama EU ispitano je 68.134 uzorka svežeg svinjskog mesa, od čega je 0,5% bilo pozitivno na prisustvo *Salmonella*. U poređenju sa 2013. godinom kada je od 78.624 ispitanih uzoraka, 0,7% bilo pozitivno, uočen je značajan pad prevalencije.

U serološkim ispitivanjima tokom 2014. godine predviđenim monitoringom na nivou EU, učestvovalo je 10 zemalja članica što je značajno manje u odnosu na prethodne godine (16 u 2013. god., 16 u 2012. god., 16 u 2011. god.). Od ukupno 2037 ispitanih uzoraka, u 57% je bila potvrđena *S. Typhimurium*, koja je poslednjih pet godina dominantan serotip. Podaci iz 2012. godine ukazuju da je procentualna zastupljenost *S. Typhimurium* bila 72,8%. *S. Typhimurium* je u 2014. godini bila

utvrđena u 9 od 10 zemalja koje su učestvovala u ispitivanju. Druga po učestalosti u ovom ispitivanju je bila *S. Derby*, koja je potvrđena u 17,5% uzoraka i prisutna u 7 od 10 zemalja. Sledeća po zasupljenosti je bila monofazna *S. Typhimurium* sa učešćem od 8,4% i potvrđena je bila u Poljskoj, Malti, Velikoj Britaniji i Italiji (EFSA, 2015).

## **2.6. Patogeneza i klinička slika netifoidnih salmoneloznih infekcija svinja**

Infekcija svinja salmonelama nastaje orofekalnim putem. U zavisnosti od inokulisane doze, u eksperimentima sa peroralnom inokulacijom svinja sa *S. Typhimurium*, infekcija može rezultovati različitim kliničkim znacima i ekskrecijom velikog broja bakterija putem fecesa (Loynachan i Harris, 2005). Neka ispitivanja su pokazala da gornji respiratorni putevi i pluća mogu biti ulazna vrata za infekciju salmonelama (Fedorka-Cray i sar., 1995; Proux i sar., 2001). Skorašnji izveštaji su ukazali na mogućnost prenošenja *S. Typhimurium* preko vazduha kod zalučenih svinja na bliskoj udaljenosti (kohabitacija) (Oliveira i sar., 2006, 2007).

Nespecifični faktori odbrane u usnoj duplji su od prvorazrednog značaja u odbrani organizma od infekcije. Salmonele koje prođu ovu barijeru mogu da kolonizuju tonzile. Nepčane tonzile su često teško inficirane kod svinja i ne bi ih trebalo stoga potcenjivati kao izvor kontaminacije prilikom klanja (Kühnel i Blaha, 2004). Nakon ingestije, salmonele ulaze u tonzile u mekom nepcu i perzistiraju u tonzilarnim kriptama (Fedorka-Cray i sar., 1995). Potom, salmonele moraju da prežive nizak pH u želucu. Dokazano je da se salmonele adaptiraju proizvodnjom kiselih šok proteina i da na taj način mogu da prežive kiselu sredinu do pH 3 (Audia i sar., 2001). Bakterije koje prežive pasažu kroz želudac, putuju dalje do tankog creva gde se susreću sa drugim antibakterijskim faktorima uključujući žučne soli, lizozim i defenzine. Pošto je koncentracija žučnih soli u gornjim delovima creva visoka, salmonele prevashodno kolonizuju ileum, cekum i kolon. Adherencija na intestinalnu sluznicu u distalnim delovima creva je uopšteno smatrano prvim korakom u patogenezi salmoneloznih infekcija svinja (Althouse i sar., 2003).

Nakon adhezije, salmonele invadiraju intestinalni epitel. Dokazano je da salmonele invadiraju apsorptivne enterocite, M ćelije i peharaste ćelije (Schauser i sar., 2004). Bakterije se nalaze intracelularno ili slobodne u citoplazmi ili vezane za ćelijsku membranu (Schauser i sar., 2005).

Brzo umnožavanje *S. Typhimurium* u digestivnom traktu svinja posledično indukuje proinflamatorni odgovor kojim se objašnjava da su u većini slučajeva *S. Typhimurium* samo u tankom crevu, dok sporo umnožavanje *S. Choleraesuis* omogućava da izbegne imunitet domaćina i posledično počne da se širi izvan creva i izazove sistemsku infekciju (Paulin i sar., 2007).

Polimorfonuklearni granulociti u gastrointestinalnom traktu čine prvu liniju odbrane protiv infekcije salmonelama. Neefikasno delovanje polimorfonuklearnih granulocita protiv salmonela može stvoriti mogućnost za kolonizaciju i umnožavanje patogena čime se stvaraju uslovi da inficirane svinje postanu kliconoše ili da ispolje kliničke simptome bolesti (Stabel i sar., 2002). Inluks polimorfonuklearnih granulocita, je međutim „mač sa dve oštrice“. Sa jedne strane, prisustvo velikog broja neutrofilnih granulocita u digestivnom traktu svinja omogućava domaćinu da savlada infekciju salmonelama (Foster i sar., 2003). S druge strane, oštećenje indukovano aktiviranim neutrofilnim granulocitima se smatra glavnim uzrokom patoloških promena u gastrointestinalnom traktu salmoneloznih svinja (Tükel i sar., 2006).

Patogeneza sistemske infekcije svinja sa *S. Typhimurium* nije dovoljno razjašnjena. Uopšteno je prihvaćeno da se salmonele šire u organizmu putem vaskularnog sistema ili limfe i inficiraju unutrašnje organe mada to još kod svinja nije istraženo u potpunosti. Kolonizacija mezenterijalnih limfnih čvorova, slezine i jetre može rezultirati sistemskim i lokalnim imunskim odgovorom (Dlabac i sar., 1997). Makrofage su ćelije od značaja za diseminaciju salmonela u unutrašnje organe. U makrofagima se salmonele replikuju veoma brzo (Hueffer i Galan, 2004). Imunski sistem svinja se međutim razlikuje u odnosu na druge sisare (Scharek i Tedin, 2007). Kod svinja *S. Typhimurium* stiže vrlo brzo u jetru i slezinu posle eksperimentalne inokulacije, ali se izgleda u njima ne replikuje ili čak biva uklonjena iz ovih organa za nekoliko dana od inokulacije (Boyen i sar., 2008a). Salmonele najpre inficiraju digestivni trakt, a potom i limfne čvorove digestivnog trakta. Ovde su makrofage od ključnog značaja u uklanjanju salmonela i sprečavanju nastanka perzistentne infekcije.

Brumme i sar., (2007) su dokazali da SPI-2 delecija u mutantnom soju nije uspjela da dovede do bolesti i kliničkih simptoma kod svinja, ali ova delecija nije rezultovala smanjenjem stope kolonizacije. Monociti svinja i polimorfonuklearni granulociti odgovaraju u *in vitro* uslovima na *S. Typhimurium* fagocitozom, oksidativnim praskom i donekle intracelularnim ubijanjem. Monociti dobijeni od različitih svinja se značajno razlikuju u proizvodnji reaktivnih vrsta kiseonika (slobodni radikali) i njihovoj sposobnosti da ubijaju bakterije. Interesantno, visoka produkcija reaktivnih vrsta kiseonika ne koincidira sa povećanim intracelularnim ubijanjem salmonela (Riber i Lind, 1999).

Infekcija svinja sa *S. Typhimurium* može rezultovati dugotrajnim asimptomatskim kliconoštvom (Wood i sar., 1991). Ponekad je teško ustanoviti kliconoštvo kod živih svinja bakteriološkim ili serološkim metodama pa ove svinje mogu da izmaknu programima monitoringa i predstavljaju zdravstveni rizik za druge svinje i čoveka. Stres indukovana ekskrecija *S. Typhimurium* kod svinja kliconoša koje se transportuju u klanicu može prouzrokovati kontaminaciju opreme za transport i depoa, razultujući u transmisiji salmonela među svinjama pre klanja (Isaacson i sar., 1999; Larsen i sar., 2003; Boughton i sar., 2007). Iako mehanizam ove stres indukovane ekskrecije salmonela nije poznat postoje indicije da kateholamini možda imaju ključnu ulogu. Dokazano je da *S. Typhimurium* može da „oseti“ kateholamine i da počne intenzivno da se umnožava (Rahman i sar., 2000).

Salmoneloza se kod svinja javlja najčešće kod intenzivno gajenih svinja na farmama, i mada je klinička manifestacija oboljenja retka, kod prasadi na sisi i tovljenika, infekcija je prilično česta. Ispitivanja u Holandiji su pokazala da su na 24% farme svinje inficirane salmonelom, na 25% nisu inficirane, a na 50% farmi je utvrđena intermitentna infekcija. Niska učestalost salmoneloze kod prasadi na sisi je posledica postojanja kolostralnog imuniteta, mada je u eksperimentalnim uslovima dokazano da se može javiti i kod tek oprasene prasadi. Oboljenje se javlja u celom svetu sa različitim procentom prevalencije, morbiditeta i mortaliteta. Ispitivanje sprovedeno u Ajovi u SAD je pokazalo da je salmonela bila prisutna u 11% slučajeva pneumonija svinja, u 9% slučajeva enteropatija i 58% slučajeva septikemičnih stanja. *S. Choleleraesuis* je najčešći uzročnik salmoneloze svinja i najčešće izaziva septikemičnu formu bolesti. *S. Typhimurium* je drugi po učestalosti uzročnik salmoneloze svinja i izaziva enterokolitis.

Pored njih *S. Heidelberg* se pominje kao uzročnik kataralnog enterokolitisa kod mladih svinja (Zimmerman i sar., 2012). Klinički se salmoneloza kod svinja može javiti u septikemičnoj formi, formi enterokolitisa i drugih ređe prisutnih oblika kao što su kazeozni limfadenitis, meningoencefalitis, intersticijalna ili gnojna pneumonija. Septikemična forma se obično javlja kod zalučenih svinja, a uzročnik je najčešće *S. Choleraesuis*. Ovaj oblik se može javiti i kod prasadi na sisi, a kod krmača može dovesti do pojave abortusa. Kliničkim pregledom može se ustanoviti inapetenca, letargija, febra, dispneja, cijanoza abdomena i ekstremiteta, a dijareja ne mora biti konstantno prisutan nalaz. Ovaj oblik salmoneloze se najčešće javlja kao posledica stresa. Salmonelozni enterokolitis se najčešće javlja od zalučenja pa do četvrtog meseca života. Oboljenje može biti akutno ili hronično, a najčešće se izoluje *S. Typhimurium*, a ređe *S. Choleraesuis*. Bolest se karakteriše profuznom vodenastom dijarejom žute boje, a kasnije uz primese sluzi i krvi. Životinje su febrilne, dehidrirane i bez apetita (Zimmerman i sar., 2012).

Blagovremeno utvrđivanje infekcije kod svinja je od prvorazrednog značaja iz više razloga. Prvo omogućava veterinarima da na farmi odrede odgovarajuću terapiju klinički manifestne salmoneloze. S druge strane, učinjene interventne mere mogu smanjiti prevalenciju salmonela kod svinja. Na kraju, najveća korist jeste u tome da što manji broj kliconoša dospe u klanicu, čime se smanjuje rizik od potencijalne kasnije kontaminacije trupova na liniji klanja i posledičnih eventualnih infekcija ljudi (Karabasil i sar., 2008).

## **2.7. Antimikrobna rezistencija kod salmonela**

Najveći broj antimikrobnih lekova koji su do danas otkriveni, koriste se istovremeno i u humanoj i u veterinarskoj medicini (gentamicin, ampicilin, amoksicilin). Neki antimikrobni lekovi kao što su na primer enrofloksacin i flumekvin razvijeni su samo za upotrebu u veterinarskoj medicini, a pripadaju grupi fluorohinolona koji se koriste i u terapiji ljudi (npr. ciprofloksacin). Ovo je vrlo bitno sa aspekta osetljivosti na antimikrobne lekove, jer rezistencija prema jednom leku iz grupe može predstavljati i



rezistenciju prema celoj podgrupi ili grupi antimikrobnih lekova (beta-laktamski antibiotici, makrolidi, linkozamidi). Upotreba antibiotika, promotora rasta u intenzivnoj proizvodnji svinja i živine pogodovala je razvoju rezistencije kod nekih bakterija. Iz tih razloga od januara 2006. godine regulativom EC No 1831/2003 zabranjena je upotreba svih antimikrobnih lekova kao aditiva za hranu za životinje (EFSA, 2008). Upotreba antibiotika kod životinja danas je predmet velike zabrinutosti i straha čovečanstva od pojavljivanja novih multirezistentnih sojeva bakterija potencijalno opasnih po zdravlje ljudi. U lancu ishrane postoji veliki rizik od prenošenja multirezistentnih patogenih uzročnika sa životinja na ljude. Geni rezistencije, koji potiču od bakterija iz digestivnog sistema životinja, lako mogu da se inkorporišu u genom uzročnika bolesti ljudi. Sve češći su primeri infekcija životinja izazvanih multirezistentnim uzročnicima kod kojih se javlja problem u sprovođenju terapije, a shodno tome nameće se i etičko pitanje da li bolesne životinje uopšte treba da se leče ili neškodljivo uklone. Najveći broj izolovanih sojeva *Salmonella* Enteritidis koji potiče od ljudi i životinja osetljiv je na većinu antibiotika, odnosno najčešće nema pojave rezistencije. Navedeni uzročnik najčešće se izoluje od obolelih ljudi, a potiče od živine. Obzirom da kod živine ne izaziva značajne kliničke simptome, infekcija se obično ne tretira antibioticima pa nema selektivnog pritiska i razvoja rezistencije (Mišić i sar., 2006).

Rast obima međunarodne trgovine hrane dovodi do sve veće rasprostranjenosti salmonela što rezultira sve većom pojavom salmoneloze kod ljudi. Pod dejstvom selektivnog pritiska nametnutog čestom upotrebom antibiotika u terapiji domaćih životinja salmonele razvijaju veliki broj gena, kompleksa gena ili mutacija koje izazivaju rezistenciju na antibiotike. Posebnu opasnost predstavljaju multirezistentni sojevi salmonela koji mogu preneti gene rezistencije na antibiotike i na druge vrste mikroorganizama. Obično samo nekoliko serotipova salmonela ima epidemiološki i epizootiološki značaj u pojedinim regionima. Dominantni serotipovi se menjaju tokom vremena i razlikuju u zavisnosti od zemlje i regije. Zbog toga je od izuzetne važnosti identifikacija i karakterizacija dominantnih serotipova salmonela kod životinja i ljudi, posebno onih koji nose gene rezistencije na određene antibiotike. Genetskom analizom salmonela izolovanih od ljudi i životinja može se utvrditi postojanje i širenje istih ili sličnih dominantnih klonova salmonela nosioca gena rezistencije. Međunarodno priznate metode za tipizaciju salmonela su serotipizacija i fagotipizacija, kao i

ispitivanje rezistencije na antibiotike. U slučajevima kada je potrebno da se izvrši dodatna diskriminacija unutar serotipova i fagotipova kod izolata koji su izazvali trovanje kod pacijenata, koristi se metoda gel elektroforeze sa visokom moći razdvajanja u pulsirajućem polju (PFGE) (Vidanović i sar., 2008).

Očigledno povećanje antimikrobne rezistencije kod netifoidnih serotipova salmonela je već dokazano ranih devedesetih godina prošlog veka i od tada je postao globalni problem (Su i sar., 2004; Alcaine i sar., 2007). Iako su infekcije ljudi prouzrokovane netifoidnim serotipovima salmonela obično samoograničavajuće, efikasna antimikrobna terapija je od ključnog značaja kod sistemskih infekcija (Chiu i sar., 1999; Su i sar., 2004; Hsu i sar., 2005; Alcaine i sar., 2007). Sistemske infekcije se obično javljaju kod osoba sa imunodeficijencijom (odojčad, stare osobe, pacijenti na hemioterapiji), zatim kod osoba sa gastričnim hipoaciditetom, u trudnoći i pacijenata sa drugim primarnim bolestima. Zajedno osobe sa ovakvim stanjima čine takozvani YOPI (young, old, pregnant, immunodeficient) segment populacije (Mossel i sar., 2003). Ova grupa obuhvata negde oko 10 do 15% ukupne populacije. Rizična grupa pacijenata uključuje i osobe sa transplantiranim organima, pacijente sa limfoproliferativnim bolestima, obolele od HIV infekcije, pacijente sa protetskim zglobovima i vaskularnim graftovima (Lesser i Miller, 2003). Pojava antimikrobne rezistencije kod salmonela privlači sve više pažnje poslednjih godina. Terapija odgovarajućim antimikrobnim sredstvom je od krucijalnog značaja kod teških slučajeva salmoneloza i kod pacijenata sa povećanim rizikom od metastatske infekcije. Pojava antimikrobne rezistencije kod salmonela može rezultovati slabim efektima terapije ili u potpunom izostanku efekata.

Ispitivanja su pokazala (MacDonald i sar., 1987) da je povećana prevalencija izolata salmonela rezistentnih prema najmanje jednom antibiotiku od 16% tokom 1979.-1980., do 24% tokom 1984.-1985., i do 29% tokom 1989.-1990. Takođe, postoji trend pojave multiple rezistencije prema ampicilinu, hloramfenikolu ili kanamicinu, streptomicinu, sulfonamidima i tetraciklinima kod određenih serotipova u poslednjih nekoliko godina (Gebreyes i sar., 2000; Zansky i sar., 2002). U skorije vreme, opisani su izolati salmonela rezistentni prema trećoj generaciji cefalosporina (npr. ceftriakson) (Zansky i sar., 2002) što predstavlja posebnu zabrinutost pošto se ceftriakson i fluorohinoloni koriste kao lekovi izbora u terapiji invazivnih formi salmoneloza. Pored toga, postoji trend smanjenja osetljivosti na ciprofloksacin među izolatima *S. Typhi* i *S. Paratyphi*

(Threlfall i sar., 2001). Iako netifoidne salmonele ostaju osetljive prema ciprofloksacinu, potencijalni gubici terapijskih efekata ovog antibiotika i fluorohinolona može imati nesagledive posledice po javno zdravlje (Allen i Poppe, 2002).

### **2.7.1. Mehanizmi rezistencije**

Porast broja rezistentnih bakterija predstavlja neizbežnu posledicu upotrebe antibiotika i shodno tome praćenje antimikrobne rezistencije pruža bitne informacije neophodne za razumevanje širenja rezistencije i upravo je srazmerna porastu upotrebe antibiotika.

Mehanizmi rezistencije bakterija su obično zasnovani na mehanizmu delovanja odgovarajućeg antimikrobnog leka. Na primer, mehanizam delovanja fluorohinolona zasnovan je na inhibiciji DNK giraze što otežava stvaranje superprstena i ozbiljno remeti prostorne odnose DNK. Usled ovoga se hromozomska DNK degradira u male nefunkcionalne fragmente. Rezistencija nastaje kao posledica modifikacije ciljanog enzima na fluorohinolone tj. DNK giraze (Jezdimirović, 2010). Dok su salmonele suštinski rezistentne prema nekim lekovima, kao što je vankomicin (molekuli vankomicina su preveliki da bi prošli kroz ćelijski zid gram negativnih bakterija), mnogi mehanizmi rezistencije se stiču preko mutacija ili sticanjem gena antimikrobne rezistencije (Randall i Woodward, 2002; Sefton, 2002, Velhner i sar., 2014).

Produkcija  $\beta$ -laktamaza od strane salmonela je najčešći mehanizam odgovoran za rezistenciju na  $\beta$ -laktamske antibiotike. Identifikovano je nekoliko vrsta  $\beta$ -laktamaza (TEMs, OXAs, i dr.) na plazmidima salmonela. Prošireni spektar  $\beta$ -laktamaza je nađen na plazmidima *Salmonella* Typhimurium izolovanih od obolelih ljudi (AitMhand i sar., 2002).

Poslednjih godina, brojni su izveštaji koji pokazuju da izolati salmonela nose plazmide sa bla<sub>CMY-2</sub> genom koji proizvodi jedan enzim AmpC sličan  $\beta$ -laktamazi koji daje rezistenciju prema mnogim cefalosporinima i amoksicilinu sa klavulanskom kiselinom. U jednom ispitivanju sekvencioniranjem DNK bla<sub>CMY</sub> kasete gena od 15 ceftriakson rezistentnih salmonela otkrivena je rezistencija na ceftriakson kod svih testiranih izolata posredovana sa CMY-2 genom (Carattoli i sar., 2002). CMY-4 posredovana cefamicinaza je takođe otkrivena kod bakterija roda *Salmonella* (Zhao i

sar., 2001). Rezistencija salmonela prema fluorohinolonima je dokazana preko nekoliko mehanizama uključujući promenu permeabilnosti membrane, aktivaciju efluks pumpi ili mutacije gena za DNK girazu (*gyrA* ili *gyrB*) i/ili topoisomerasu (*parC* ili *parE*) (Nakaya i sar., 2003, Velhner i sar., 2014).

### **2.7.2. Prenosivost rezistencije**

Geni rezistencije se među bakterijama prenose na različite načine uključujući konjugaciju, transformaciju i transdukciju (Sefton, 2002). Vrlo važan način preko koga salmonele i druge vrste bakterija stiču gene za antimikrobnu rezistenciju je preko integrona. Integroni su mobilni genetski elementi koji se nalaze na plazmidima, transpozonima ili su integrisani u bakterijskom hromozomu (Bennett, 1999). Prenosjenje gena rezistencije udruženih sa integronima se javlja preko specifičnih rekombinacija i pokazuje tendenciju da prelazi barijeru vrste (Bennett, 1999).

### **2.7.3. Rezistencija na više antimikrobnih lekova ili multirezistentne salmonele**

Veliki broj izolata salmonela su poznati kao rezistentni na veći broj antimikrobnih lekova. *S. Typhimurium* definitivni tip 104 (DT104) izolati su često rezistentni prema ampicilinu, hloramfenikolu, streptomycinu, sulfametoksazolu i tetraciklinima (ACSSuT) (Rankin i sar., 2002) i DT193 izolati često pokazuju AKSSuT (K je kanamicin) rezistenciju (Gebreyes i Altier, 2002). Multirezistentni izolati poseduju gene na hromozomima koji kodiraju ACSSuT pentarezistenciju, ali gen koji kodira AKSSuT pentarezistenciju u DT193 je nađen na plazmidu (Gebreyes i Altier, 2002). Pored toga, DT 104 sojevi su izolovani sa rezistencijom na druge lekove uključujući cefalosporine i fluorohinolone (Daly i Fanning, 2000). DT104 izolati poseduju dva integrona, jedan što stvara rezistenciju prema streptomycinu (*aadA2*) i (*sulI*) i drugi prema ampicilinu (*bla<sub>PSE-1</sub>*) i sulfametoksazolu (*sulI*). Između ovih integrona na DT104 hromozomu

locirani su geni koji kodiraju hloramfenikol (*cmlA*) i tetraciklin (*tetR* i *tetA*) rezistenciju (White i sar., 2001).

Multirezistencija *S. Newport* je od posebnog značaja za javno zdravlje. Čest je nalaz da je *S. Newport* rezistentna prema ampicilinu, cefalotinu, hloramfenikolu, streptomycinu, sulfametoksazolu, tetraciklinu i potpuno ili intermedijerno rezistentna prema ceftriaksonu (Zansky, 2002). Povećava se procenat izolata *S. Newport* koji pokazuju rezistenciju prema najmanje 9 različitih antimikrobnih lekova uključujući amoksicilin/klavulanska kiselina, ampicilin, cefoksitin, ceftiofur, cefalotin, hloramfenikol, streptomycin, sulfametoksazol i tetraciklin (Rankin i sar., 2002).

Ispitivanje osetljivosti salmonela izolovanih od živine, goveda i svinja na antibiotike u Srbiji (Mišić i sar., 2006), su pokazala postojanje multirezistencije kod 17,15% izolata, pri čemu su svi multirezistentni izolati poticali od živine.

#### **2.7.4. Antimikrobna rezistencija salmonela izolovanih od svinja**

Nivo rezistencije na antibiotike se razlikuje između različitih serotipova. *Salmonella* Enteritidis, na primer, pokazuje samo ograničenu stečenu rezistenciju u poređenju sa drugim važnim netifoidnim serotipovima (Su i sar., 2004). Stečena antimikrobna rezistencija je češća kod *Salmonella* Typhimurium. *S. Typhimurium* sojevi koji pripadaju fagotipu DT104 su često simultano rezistentni na pet antimikrobnih lekova (ampicilin, hloramfenikol, streptomycin, sulfonamidi i tetraciklin) (Helms i sar., 2005). Fagotip DT104 se često izoluje iz svinjskog mesa (Threlfall, 2000; Gebreyes i sar., 2004). Tokom 1998. godine došlo je do širenja epidemije salmoneloze u Danskoj prouzrokovane sa *S. Typhimurium* DT104, gde oboleli ljudi nisu mogli da se izleče postojećim antibioticima zbog čega se dogodilo i nekoliko smrtnih slučajeva. Epidemiološkim ispitivanjima je utvrđeno da su rezervoar infekcije u Danskoj bile svinje, a *Salmonella* Typhimurium DT 104 se ističe kao jedan od školskih primera posledica upotrebe antibiotika kao promotora rasta u proizvodnji svinja (Mišić i sar., 2006). Drugi fagotipovi koji se često izoluju od svinja kao što su DT120 i DT193 su neizostavno rezistentni prema više antimikrobnih lekova (Gebreyes i sar., 2004). Sojevi *S. Typhimurium* rezistentni prema 10 i više antimikrobnih lekova su takođe opisani

(Poppe i sar., 2002). Zbog širenja rezistencije na konvencionalne antibiotike, prošireni spektar cefalosporina i fluorohinolona postaju lekovi izbora u terapiji salmoneloza kod ljudi (Stoycheva i Murdjeva, 2006). Fluorohinoloni se takođe često koriste u terapiji teške enterične groznice uzrokovane salmonelama kod različitih vrsta životinja (Carter i Quinn, 2000; Jones, 2004; Hall i German, 2005). Međutim, ovo je dovelo do toga, da se danas redovno izveštava o rezistenciji na ove antibiotike kod sojeva izolovanih od svinja i svinjskog mesa (Gazouli i sar., 1998; Molbak i sar., 1999; Baraniak i sar., 2002; Chiu i sar., 2002; Wang i sar., 2006; Talavera-Rojas i sar., 2007). Sojevi *S. Typhimurium* rezistentni prema više antibiotika su takođe prisutni i u populacijama „antimicrobial free swine production systems“ svinja, uprkos odsustvu selekcije među mikroorganizmima (Thakur i sar., 2007). Klinički eksperimenti sa novom generacijom antimikrobnih lekova (azitromicin i gatifloksacin) koji su efikasni protiv multirezistentnih sojeva salmonela su u toku (Boyle i sar., 2007). Ipak, povećana multipla antimikrobna rezistencija udružena sa serotipovima poreklom iz svinjskog mesa kao na primer *S. Typhimurium* i *S. Derby* mogu postati ozbiljne opasnosti po ljudsko zdravlje u bliskoj budućnosti (Hald i sar., 2003; Akiba i sar., 2006; Butaye i sar., 2006; Vo i sar., 2006; Alcaine i sar., 2007). Pored toga opisano je da *S. Choleraesuis* i *S. Typhimurium* mogu da stvaraju hibridne plazmide sastavljene od gena virulencije sa jedne strane i gena antimikrobne rezistencije sa druge strane što verovatno predstavlja još veću opasnost za javno zdravlje (Chu i Chiu, 2006). Izolovani su i sojevi salmonela koji stvaraju beta-laktamaze proširenog spektra delovanja (BLPS ili od engleskog izraza ESBL – „extended spectrum beta-lactamases). Sojevi koji stvaraju BLPS otporni su na sve beta-laktamske antibiotike izuzev karbapenema i u nekim slučajevima cefamicina. Produkcija BLPS se dokazuje dvostrukim disk difuzionim testom (ESBL testom) ili tzv. „produženim antibiogramom“ na osnovu sinergizma između amoksicilina sa klavulanskom kiselinom i nekog od cefalosporina III generacije (cefotaksim ili ceftazidim). Kada je zona inhibicije oko ceftazidima ili cefotaksima proširena na strani amoksicilina sa klavulanskom kiselinom zaključuje se da soj stvara BLPS i proglašava rezistentnim na sve peniciline i cefalosporine (Mišić i sar., 2006).

Ispitivanja u Austriji su pokazala postojanje rezistencije sojeva salmonela izolovanih iz svinjskog, junećeg i pilećeg mesa. U tom ispitivanju 42% ispitanih sojeva su bili rezistentni prema fluorohinolonima, 33% prema tetraciklinima, 27% prema

streptomycinu i 17% prema ampicilinu (Mayrhofer i sar., 2004). Slična ispitivanja u Holandiji su pokazala postojanje rezistencije kod 32,7% sojeva salmonela na fluorohinolone, 21,5% na tetracikline, 43,9% na ampicilin, 58,9% na trimetoprim, 48,6% na trimetoprim/sulfametoksazol i 0,9% na florfenikol (MARAN, 2002). U Srbiji su rezistentni sojevi *Salmonella* spp. izolovani sa 40,57% trupova živine i 25% trupova svinja. 25% izolovanih salmonela sa trupova svinja je bilo rezistentno prema amoksicilinu i 25% prema sulfametoksazolu. Međutim, autori navode alarmantnu činjenicu raširenosti rezistencije izolata *S. Typhimurium*, sa učešćem od 76,92% iz uzoraka živine i 33,33% kod uzoraka iz svinja. Izolati od obe vrste su najčešće bili rezistentni prema amoksicilinu i sulfametoksazolu (Petrović i sar., 2008).

Da bi se smanjio broj rezistentnih patogenih mikroorganizama farmeri, veterinari, prerađivači mesa, lekari kao i državni organi uprave pa sve do potrošača koji bi trebalo da budu edukovani, treba da rade zajedno da bi sprečili nepravilnu i preteranu upotrebu antimikrobnih lekova. U primarnoj proizvodnji treba primeniti principe preduslovnih programa koji podrazumevaju primenu GHP i GMP tj. dobre higijenske i dobre proizvodne prakse. Na taj način će se sprečiti ili umanjiti rizik od pojave oboljenja kod životinja, a samim tim i potreba za antimikrobnom terapijom. Ukoliko je terapija ipak neophodna mora se aplikovati samo na pravilan način i uz nadzor veterinara. U objektima za klanje i preradu mesa primenom preduslovnih programa i HACCP koncepta može biti značajno umanjena mogućnost kontaminacije mesa sadržajem digestivnog trakta odnosno rezistentnim zoonoskim patogenima (Petrović i sar., 2008).

## **2.8. Metode za identifikaciju salmonela**

Nadzor salmonela u različitim fazama lanca ishrane predstavlja važan element u istraživanju epidemija izazvanih hranom. Efikasnost laboratorijskih metoda za izolaciju i identifikaciju salmonela su od suštinskog značaja za monitoring salmonela. Tokom vremena razvijale su se metode koje su dokumentovane u naučnim literaturama, a kasnije prihvaćene od međunarodnog tela za standardizaciju koje se primenjuju u laboratorijama širom sveta. Važno je međutim napomenuti da postoje različite

procedure za izolaciju salmonela, od kojih se zahteva da imaju visoku osetljivost i specifičnost, uz istovremenu jednostavanost, brzinu i ekonomsku pristupačnost. Međutim, ni jedna metoda ne ispunjava sve navedene kriterijume i nije optimalna za sve namene. Stoga je preporučljivo da se konsultuje literatura pre izbora metode za određenu svrhu. Molekularne metode se uvode kao alternativa koja ima prednosti u pogledu bržeg dobijanja rezultata, jednostavnijeg postupka, ali imaju nedostatak u pogledu cene koštanja (WHO, 2003).

Danas se koristi međunarodni standard, horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* uključujući *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Paratyphi. Ovaj standard se primenjuje na proizvode predviđene za ishranu ljudi i životinja kao i na uzorke iz životne sredine u zoni proizvodnje hrane i rukovanja hranom.

### **2.8.1. Konvencionalna serotipizacija**

Diferenciranje izolata salmonela se može raditi na različite načine, što je vrlo važno sa epidemiološkog aspekta. Broj novih serotipova se stalno povećava, pa je tako na primer, 26 novih serotipova otkriveno 1999., 12 tokom 2000., a 22 tokom 2001. godine i dodato u Kauffmann-White šemu (Popoff i sar., 2001). Epidemiološki je vrlo važno razlikovati pojedine izolate salmonela, zbog toga što definitivna tipizacija salmonela može pomoći u utvrđivanju izvora infekcije i praćenju trenda antimikrobne rezistencije kod pojedinih serotipova. Pored konvencionalne serotipizacije na osnovu antigene strukture, koriste se i napredne tehnike za pronalažanje porekla pojedinih izolata (Yan i sar., 2003).

Serotipizacija salmonela je najčešći metod koji se koristi za razlikovanje sojeva, koji su sa epidemiološkog aspekta najmanje bakterijske jedinice čiji izolati dele iste fenotipske i genotipske odlike. Serotipizacija omogućava razlikovanje sojeva na osnovu njihovog somatskog (O), kapsularnog (Vi, ukoliko ga ima) i flagelarnog (H) antigena u različite serotipove. O antigen je po svojoj strukturi polisaharid i deo je ćelijskog površinskog lipopolisaharida, a označava se odgovarajućim brojevima. U većini kliničkih laboratorija, inicijalna serotipizacija započinje korišćenjem polivalentnog O antiseruma što omogućava grupisanje salmonela u različite O grupe označene velikim



slovima. Na primer, *S. Typhimurium* pripada grupi B, a *S. Enteritidis* grupi D. Mnoge salmonele imaju difaznu produkciju flagelarnih antigena i svaki soj može spontano i reverzibilno da se razlikuje između ove dve faze sa različitim setovima H antigena. U fazi 1 ili specifičnoj fazi, različiti antigeni su označeni malim slovima, a u fazi 2 ili grupnoj fazi, antigeni se označavaju brojevima. U jednoj bakterijskoj ćeliji obično je jedan antigen eksprimiran u određenom vremenu (Vos i sar., 1995; Dauga i sar., 1998).

Od dve vrste salmonela, *S. enterica* i *S. bongori*, preko 99% serotipova je grupisano u vrstu *S. enterica* i blizu 60% od njih pripada podvrsti *enterica* (podvrsta I). Termini serotip i serovar (oba se mogu skratiti sa „ser“) se naizmenično koriste, ali skorija preporuka je da se koristi termin serotip umesto termina serovar. Novootkriveni serotipovi podvrste *enterica* (podvrsta I) se nazivaju imenima prema geografskom području gde je serotip prvi put izolovan. Da bi se izbegla zabuna označavanje serotipova se piše romanskim slovima (bez italika), a prvo slovo se piše veliko. Na primer, serotip Enteritidis u okviru podvrste *enterica* se piše kao *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis ili jednostavnije skraćeno kao *Salmonella* Enteritidis (Brenner i sar., 1998; Brenner i sar., 2000).

Za izvođenje serotipizacije, suspenzija izolata salmonela se meša i inkubira sa panelom različitih antiseruma koji prepoznaju specifične O ili H epitope. Obimna šema serotipizacije se koristi za determinaciju pojedinih serotipova u Kauffmann-White identifikacionom sistemu. Zbog njihove široke prihvaćenosti kao metod za diferenciranje sojeva salmonela, serotipizacija je postala vrlo važna u javnom zdravlju. Iako serotipizacija daje osnovne podatke o salmonelama, ograničenja ipak postoje. Stoga, su neophodne dodatne preciznije tehnike tipizacije (Popoff i sar., 2001).

### **2.8.2. Fagotipizacija**

Fagotipizacija je vrlo korisna sa aspekta epidemiologije u diferencijaciji sojeva u okviru odgovarajućeg serotipa. Fagotipizacija koristi selektivnu sposobnost bakteriofaga da inficiraju određene sojeve salmonela omogućavajući razlikovanje pojedinačnih izolata. Različiti bakteriofagi imaju sposobnost da selektivno inficiraju izolate salmonela zahvaljujući razlikama u fagnom receptoru na površini bakterijske ćelije

(Schmieger, 1999). Kada je odgovarajući fagni receptor lociran na površini ćelije, bakteriofag će inficirati bakteriju i lizirati ćeliju. Oznake fagotipa, su dodeljene specifičnim sojevima bakterija na osnovu poretka faga koji imaju sposobnost da liziraju ćelije i formiraju plakove u bakterijskoj kulturi. Fagotipizacija se koristi da opiše pandemijske klonove salmonela, kao što su *S. enterica* serovar Typhimurium definitivni tip 104 (DT104) koji prouzrokuje teško oboljenje gastrointestinalnog sistema i, koji najčešće pokazuje multiplu rezistenciju prema antimikrobnim lekovima. Iz razloga što je fagotipizacija tehnički zahtevna tehnika i zahteva održavanje različitih biološki aktivnih zaliha faga, obično se primenjuje u referentnim laboratorijama i institucijama od značaja za javno zdravlje (Hickman-Brenner i sar., 1991).

### **2.8.3. Molekularna tipizacija**

Diferencijacija izolata salmonela i pronalaženje izvora infekcije kod pojave epidemija može biti postignuto korišćenjem molekularnih tehnika tipizacije. Ove metode tipizacije koriste digestiju enzimima restrikcionim endonukleazama, amplifikaciju nukleinskih kiselina, ili tehniku sekvencioniranja nukleotida. Svaka od ovih tehnika ima svoje prednosti i nedostatke. Posledično, izbor odgovarajuće molekularne tehnike tipizacije zavisi od različitih faktora, a pre svega veličine samog uzorka, vremena, i resursa koje imamo za tipizaciju.

#### **2.8.3.1. Tehnike bazirane na restrikcionoj digestiji**

Elektroforeza u pulsirajućem polju jednosmerne struje (Pulsed-field Gel Electrophoresis - PFGE) i analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata („restriction fragment length polymorphism analysis“ - RFLP) su bazirane na izolaciji DNK i analizi restrikcionih fragmenata. PFGE odvaja DNK pod uslovima naizmeničnog polariteta omogućujući 20 puta veću rezoluciju DNK fragmenata nego što se dobija upotrebom standardne gel elektroforeze (Schwartz i Cantor, 1984). Kada se koristi istovremeno sa “rare cutting” enzimima, PFGE profil obezbeđuje DNK fingerprint bakterijskog genoma. Pored PFGE, RFLP analiza se može koristiti

korišćenjem “frequent cutting” enzima za ograničavanje DNK. Zbog velikog broja nastalih fragmenata, elektroforeza je posle praćena „southern blot“ tehnikom korišćenjem proba za ponavljajuće elemente DNK (Bailey i sar., 2002). Česte tačke za „blotting“ uključuju ribozomalne RNK sekvence (ribotipizacija) i različite insercione elemente u bakterijskom genomu (tipizacija insercionih sekvenci - IS). PFGE se smatra superiornom u odnosu na ostale zbog toga što je to zlatni standard za druge molekularne metode subtipizacije salmonela (Bender i sar., 2001) i znatan broj *Salmonella* PFGE profila se nalazi u “PulseNet” bazi podataka Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC). „PulseNet“ je nacionalna molekularna mreža za subtipizaciju bakterija, uzročnika bolesti prenosivih hranom koju je osnovao CDC. Mreža omogućava brzo poređenje fingerprintova kroz elektronsku bazu obezbeđujući kritične podatke za rano prepoznavanje i pravovremeno istraživanje u slučaju epidemija (Yan i sar., 2003).

Elektroforeza u pulsirajućem električnom polju karakteriše bakterije u subtipove dajući odgovarajuće DNK sekvence nakon digestije bakterijske genomske DNK restrikcijom enzimima. Tokom ovog postupka, bakterijska DNK se razdvaja i kasnije iseca enzimima do DNK fragmenata (Stjepanović i sar., 2007). Ovi enzimi vrše isecanje DNK na mestima gde je prisutna kratka, specifična sekvenca. Restrikcijom enzimi daju 8 – 25 traka DNK (bandovi) koje sadrže 40 – 600 kilobaznih parova (Wiedman, 2002). Obzirom na to da se fragmenti DNK molekula ove veličine ne mogu razdvajati standardnim elektroforetskim tehnikama, koristi se posebna tehnika elektroforeze, pri čemu se menja smer električnog polja, čime se postiže razdvajanje DNK fragmenata koji se kasnije vizuelizuju bojenjem etidijum bromidom. Ovako dobijeni fragmenti upoređuju se sa već postojećom bazom podataka i na taj način se utvrđuje stepen srodnosti proučavanog bakterijskog soja. Tokom kontinualne elektroforeze, DNK fragmenti veličine 30-50 kb migriraju istom brzinom bez obzira na veličinu, što se na gelu uočava kao jedna difuzna traka. Međutim, ukoliko su fragmenti DNK primorani da menjaju smer kretanja tokom elektroforeze, fragmenti različitih veličina biće međusobno razdvojeni. Sa svakom novom preorijentacijom električnog polja, manji DNK fragmenti će početi da se kreću u novom smeru brže nego oni veće molekulske mase. Usled toga, veći DNK fragmenti zaostaju iza, obezbeđujući separaciju od manjih DNK fragmenata (Rašeta, 2014).

U jednoj genotipizaciji i epidemiološkom istraživanju *S. Enteritidis*, PFGE je dao napredniji nivo razlikovanja u poređenju sa analizom plazmida i ribotipizacijom (Ridley i sar., 1998). PFGE proizvodi ukupno 32 različita profila dok se analizom plazmida dobija samo 18 različitih profila, a ribotipizacijom tri. Glavni nedostatak PFGE je vreme, jer je za set analiza neophodno od 1 do 5 dana u zavisnosti od korišćenog protokola.

#### 2.8.3.2. *Tehnike bazirane na amplifikaciji*

Razvijene su različite tehnike za određivanje genetske varijabilnosti koje su bazirane na amplifikaciji specifičnih i nespecifičnih delova genoma. Ove metode uključuju „amplified fragment length polymorphism“ (AFLP), „random amplified polymorphic DNA PCR“ (RAPDPCR), „arbitrary primed PCR“ (AP-PCR) i „repetitive element PCR“ (Rep-PCR). AFLP vezuje restrikcionu digestionu analizu i PCR amplifikaciju za određivanje srodnosti sojeva bakterija (Vos i sar., 1995). Druge metode bazirane na PCR tipizaciji za razlikovanje bakterijskih izolata se oslanjaju na amplifikaciju profila, bez DNK restrikcije. Dve od ovih tehnika su RAPD-PCR i AP-PCR, koje su slične metodama PCR subtipizacije (Kantama i sar., 1996).

RAPD, u kombinaciji sa PFGE i fagotipizacijom su korišćeni u analizi *Salmonella* Enteritidis izolovane u bolničkim epidemijama (Skibsted i sar., 1998) i dokazano je da je da RAPD vrlo korisna dopunska tehnika u ispitivanju epidemija (Vesalovic i sar., 1991).

#### 2.8.3.3. *Tehnike zasnovane na sekvencioniranju nukleotida*

Ove tehnike koriste polimorfizam sekvenci DNK u okviru specifičnih target sekvenci za razlikovanje sojeva. Jedna od ovih tehnika uključuje multilokusno sekvencioniranje (MLST). Kada se MLST koristi u proceni izolata salmonela, podaci ukazuju da sposobnost ove metode u razlikovanju tipiziranih izolata nudi prednosti nad serotipizacijom i PFGE (Spratt, 1999; Kotetishvili i sar., 2002).

### 3. CILJ I ZADACI RADA

Cilj ove doktorske disertacije je da se utvrdi zastupljenost salmonela u uzorcima briseva sa trupova svinja u različitim fazama proizvodnje (nakon omamljivanja, završene obrade i hlađenja) i iz sadržaja ileuma, izvrši njihova fenotipizacija, genotipizacija i utvrdi osetljivost na antimikrobne lekove.

Da bi se ostvario postavljeni cilj, utvrđeni su sledeći zadaci:

1. Formirati bazu podataka o poreklu životinja, načinu transporta, načinu ishrane i boravku u depou;
2. Izvršiti izolaciju *Salmonella* spp. iz uzoraka briseva sa trupova svinja nakon omamljivanja, završene obrade i hlađenja;
3. Izvršiti izolaciju *Salmonella* spp. iz sadržaja ileuma;
4. Odrediti broj *Enterobacteriaceae* iz uzoraka briseva sa trupova svinja nakon omamljivanja, završene obrade i hlađenja;
5. Izvršiti fenotipizaciju izolata salmonela;
6. Izvršiti ispitivanje osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom i E-testom;
7. Izvršiti genotipizaciju salmonela izolovanih sa trupova svinja i iz sadržaja ileuma;

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. Formiranje baze podataka o poreklu životinja, načinu transporta, načinu ishrane i boravku u depou**

Ispitivanje je sprovedeno na jednoj klanici srednjeg kapaciteta iz okoline Beograda. Prilikom posete klanici, vršeno je i anketiranje, odnosno prikupljanje podataka o: poreklu svinja (farma, otkup), mestu nabavke, načinu ishrane (suva, tečna, kombinovana), telesnoj masi svinja, starosti, dužini trajanja transporta, dužini boravka u stočnom depou, eventualnom mešanju svinja u stočnom depou sa svinjama drugog porekla i higijeni depoa. Anketiranje je sprovedeno jednom nedeljno tokom 10 nedelja.

Primer ankete je dat u tabeli 4.1.1.

**Tabela 4.1.1.** Anketa

Anketa br.	Br. nedelje: I – II – III – IV – V – VI – VII – VIII - IX – X
Datum:	Dan u nedelji: pon – ut – sre - čet – pet
Poreklo svinja:	1. Farma 2. Otkup Napomena: ukoliko se radi o farmi, kojeg je kapaciteta?
Mesto nabavke:	
Način ishrane:	1. Tečna 2. Čvrsta 3. Kombinovana Napomena (ukoliko je moguće navesti koje komponente hrane su korišćene):
Masa svinje:	1. 70-80 kg 2. 80-90 kg 3. 90-100 kg 4. 100-110 kg 5. Preko 110 kg
Starost svinje:	1. 3-6 meseci 2. 6-9 meseci 3. 9-12 meseci 4. 12-15 meseci 5. Preko 15 meseci Drugo:
Koliko dugo je trajao transport:	
Koliko dugo su životinje boravile u depou od momenta istovara do momenta klanja:	
Da li je došlo do mešanja životinja u depou:	1. Da 2. Ne
Higijena depoa je:	1. Dobra 2. Zadovoljavajuca 3. Loša Napomena (ukoliko je pod 2 i 3 navesti šta je razlog tome):
Napomena:	Napomena:

## 4.2. Opis linije klanja u ispitivanom objektu

Linija klanja svinja je automatizovana i transport duž linije se obavlja pomoću konvejskog sistema. Prema satnom kapacitetu na ovoj liniji se zakolje i obradi od 100 - 110 svinja po času. Svinje se iz stočnog depoa uvode preko koridora u kome se obavlja pranje svinja vodom pod pritiskom (prskanje), do automatizovanog boksa za pojedinačno omamljivanje, koje se obavlja električnom strujom, visokog napona, pomoću klješta. Prilikom omamljivanja električna klješta se postavljaju na glavu životinje, tačnije elektrode se postavljaju na obe slepoočnice iza baze ušiju. Električna struja izaziva elektrošok koji se manifestuje epileptiformnim napadom, padom životinje, gubitkom svesti i grčevima mišića.

Nakon omamljivanja, iskrvarenje svinja se vrši u horizontalnom položaju, na konvejskom stolu, sa specijalno konstruisanim odvodima za krv i mokraću. Iskrvarenje se obavlja u roku od 10s nakon omamljivanja, ubodom u vrat, presecanjem velikih krvnih sudova.

Posle iskrvarenja, trupovi svinja, se podižu na visoki kolosek, kačenjem lanca za zadnju nogu svinje. Od tog momenta, linija klanja postaje automatizovana i svinje šalje ka bazenu za šurenje. Pre šurenja svinjski trupovi se peru vodom u specijalno konstruisanim mašinama koje sadrže gumene bičeve, čija je svrha da se smanji kontaminacija bazenske vode za šurenje skidanjem ostataka nečistoća i krvi.

Bazen za šurenje svinja je zatvorenog tipa, gde trupovi prolaze u vertikalnom položaju, u periodu od 45-60s. Temperatura vode iznosi 61°C.

Posle šurenja dlaka se skida mašinski korišćenjem šel mašina (golijat ili mašina za skidanje čekinja). Linija automatski skida lance sa zadnje noge trupa svinje, i trup upada horizontalno u mašinu za skidanje dlaka. Prilikom okretanja valjaka, skidaju se čekinje i struže epidermis koagulisan prilikom šurenja.

Mašine izbacuju trupove svinjske na stolove na kojima se isecaju uši i oči, skida rožina papaka i oslobađaju tetive na metatarzalnim delovima zadnjih nogu, preko kojih se trupovi kače na raspinjače, a zatim podižu na visoki kolosek, i od tog momenta kreće ponovo automatizovani kolosek.



Potom, trup svinje ulazi u kabinet, gde rotirajući bičevi ostranjuju višak dlake, krvi i epidermisa. Nakon toga, svinjski trupovi se opaljuju u kabinetu za plinsko opaljivanje, pri visokoj temperaturi, nakon čega dobijaju zlatno žutu boju, a nagorela koža se polira u kabinetu za poliranje kombinovanom upotrebom vode i gumenih bičeva.

Na visokom koloseku se potom vrši podvezivanje rektuma specijalno napravljenim pištoljem sa rotirajućim pokretom.

Na platformi za evisceraciju, vrši se vađenje želudačno-crevnog trakta sa mezenterijumom, slezine, pankreasa, a eviscerirani organi se potom stavljaju u posude konvejskog stola, na kome se obavlja veterinarsko sanitarni pregled.

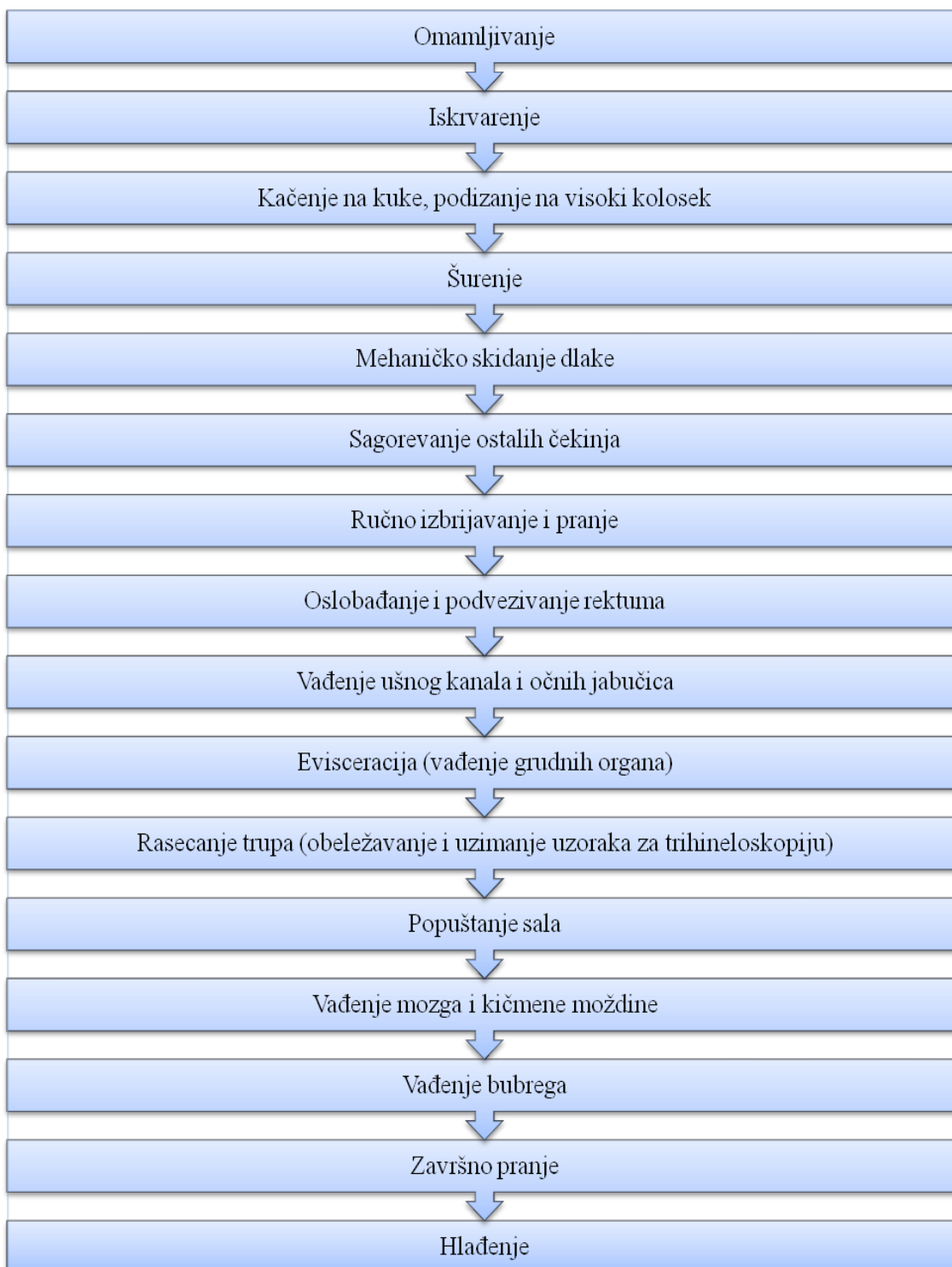
Na platformi za vađenje grudnih organa i jetre, uzima se uzorak dijafragme za utvrđivanje prisustva trihinele. Grudni organi se kače na kuke, obeležavaju, i automatizovanom linijom šalju na veterinarsko sanitarni pregled.

Trupovi svinja se potom rasecaju po medijalnoj liniji kičmenog stuba na dve polovine pomoću električne testere na platformi za rasecanje trupova. Sa svinjskih polutki, se potom u predelu buta, leđa, grebena i vrata, kao i u mamarnoj regiji popušta potkožno masno tkivo kako bi se ubrzalo hlađenje mesa. Masno tkivo grudne i trbušne regije ostaje na polutkama za vreme hlađenja. Nakon toga se vadi kičmena moždina i oba bubrega.

Na kraju obrade polutke se peru vodom pod pritiskom, čime se ostranjuju krv i opiljci kostiju, a manjim delom i mikroorganizmi. Posle veterinarsko sanitarnog pregleda polutki, i obeležavnja pečatima, trupovi se upućuju na hlađenje.

Dijagram toka linije klanja prikazan je na shemi 4.2.1.

**Shema 4.2.1.** Dijagram toka na liniji klanja



### **4.3. Uzorkovanje**

Za ispitivanje su uzorkovani brisevi sa 100 trupova svinja kao i sadržaj ileuma. Uzorkovanje je trajalo deset nedelja, svake nedelje se rotirao dan uzorkovanja, kako bi se obuhvatili svi dani u nedelji.

#### ***4.3.1. Uzimanje uzoraka briseva sa trupova zaklanih svinja***

Uzimani su brisevi sa trupova nakon omamljivanja, zatim nakon završene obrade, a pre hlađenja i 24h posle početka hlađenja. Brisevi su uzimani sa obe polovine (polutke) istog trupa, što čini 200 uzoraka briseva nakon omamljivanja, 200 nakon završene obrade i 200 briseva nakon hlađenja, odnosno ukupno 600 briseva za ispitivanje na prisustvo salmonela i određivanje broja enterobakterija.

Uzorkovanje je vršeno abrazivnim sunđerima dimenzije 3,8×7,6 cm u stomaher kesi (3M Food Safety, Nemačka), koji su specijalno namenjeni za uzorkovanje briseva sa trupova svinja. Pre uzorkovanja, sunđeri su hidratizirani sa 10 ml Maximum Recovery Dileunt (Merck, Nemačka). Prilikom uzorkovanja u klanici, sunđeri su vađeni iz stomaher kese sterilnom rukavicom i vršeno je uzorkovanje, nakon čega su sunđeri vraćani u obeležene stomaher kese koje su potom hermetički zatvarane. Transportovanje uzoraka, vršeno je pri kontrolisanom temperaturnom režimu od 1-4°C. Bakteriološko ispitivanje započeto je u roku od 1 časa od uzimanja uzoraka u skladu sa standardom SRPS EN ISO 7218:2008.

#### ***4.3.2. Uzimanje uzoraka sadržaja ileuma***

Od istih trupova zaklanih svinja (100), nakon faze evisceracije, uzorkovan je sadržaj ileuma. Ileum je prethodno u klanici isečen u dužini od 15 cm iz crevnog trakta i

prenesen u sterilnu stomaher kesu. Nakon transporta uzoraka u kontrolisanim uslovima, u laboratoriji je aseptično odvojen sadržaj ileuma i započeto bakteriološko ispitivanje.

#### **4.4. Izolacija i identifikacija *Salmonella* spp.**

##### **4.4.1. Izolacija *Salmonella* spp.**

Izolacija *Salmonella* spp. vršena je prema standardu SRPS EN ISO 6579:2008, *Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za otkrivanje Salmonella spp.*

U laboratoriji su uzorci prethodno obogaćeni neselektivnom tečnom podlogom, dodavanjem 90 ml puferisane peptonske vode (Torlak, Srbija), homogenizovani u trajanju od dva minuta i inkubisani pri  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  tokom  $18\pm 2$ h časa.

Nakon toga, prenesen je 0,1 ml kulture u epruvetu koja sadrži 10 ml Rappaport-Vasiliadis bujon (RVS bujon, Himedia, India ) dok je istovremeno 1ml prenesen u epruvetu koja sadrži 10 ml Muller–Kauffmann tetracionat/novobiocin bujon (MKTTn bujon, Himedia, India). Potom je inokulisani RVS bujon inkubisan pri  $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$  tokom  $24\pm 3$ h, a inokulisani MKTTn bujon  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  tokom  $24\pm 3$ h.

Posle inkubacije iz RVS bujona preneto je pomoću eze na površinu dve Petrijeve ploče, koje sadrže selektivnu podlogu za izolaciju Ksiloz lizin dezoksiholat agar (XLD agar, Torlak, Srbija) do iscrpljenja tako da se dobiju dobro izolovane pojedinačne kolonije. Postupak je ponovljen inokulacijom i na drugu selektivnu podlogu Brilliant Green agar (BG agar, Torlak, Srbija). Dobijena kultura na MKTTn bujonu inokuliše se na dve Petrijeve ploče sa selektivnom podlogom Ksiloz lizin dezoksiholat agar i paralelno na Brilliant Green agar (BG agar, Torlak, Srbija). Ploče se okrenu, tako da je dno gore i stave u inkubator pri temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  tokom  $24\pm 3$ h.

Nakon inkubacije, pregledane su podloge i tipične kolonije, koje na XLD agaru imaju crno središte i svetlu prozirnu zonu crvenkaste boje, a na BG agaru su karakteristično svetlo ružičaste boje presejane su na hranljivi agar.

Izolacija *Salmonella* spp. u uzorcima sadržaja ileuma vršena je prema istom standardu SRPS EN ISO 6579:2008, Annex D, *Otkrivanje Salmonella spp. u fecesu životinja i u uzorcima iz životne sredine u primarnoj fazi proizvodnje*. U laboratoriji, uzorci su prethodno obogaćeni neselektivnom tečnom podlogom, dodavanjem 90 ml puferisane peptonske vode (Torlak, Srbija), homogenizovani u trajanju od dva minuta i inkubisani pri  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  tokom  $18 \pm 2$ h. Ploče sa modifikovanim polučvrstim Rappaport-Vassiliadis agarom (MSRV, Biokar Diagnostics, Francuska) inokulisane su dobijenom kulturom, i inkubisane pri  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  tokom  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . Ako je ploča negativna posle 24 h, inkubira se tokom sledećih  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . Nakon toga sledi selektivna izolacija i identifikacija na čvrstim podlogama.

Radi potvrđivanja, uzeto je po pet kolonija sa svake selektivne podloge i presejeno na hranljivi agar (HA, Torlak, Srbija) i inkubirano pri  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  tokom  $24 \pm 3$ h.

#### **4.4.2. Identifikacija *Salmonella* spp.**

##### *4.4.2.1. Biohemijsko potvrđivanje*

Za biohemijsko i serološko potvrđivanje salmonela korišćene su čiste kulture. Za biohemijsko potvrđivanje korišćen je identifikacioni kit za *Enterobacteriaceae* i druge Gram negativne bakterije, API 20E kit (BioMérieux®, France). Na plastičnoj traci nalazi se 20 mikrotuba, koje sadrže dehidrovane podloge. Dvadesetprva reakcija oksidaze je izdvojena sa panela i radila se posebno, ali je sastavni deo u identifikaciji. Prema uputstvu proizvođača, mikrotube se inokulišu bakterijskom suspenzijom starom od 18-24h, pripremljenu u 5 ml rastvora 0,85% NaCl. Tokom inkubacije pri  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  tokom 18-24h, metabolička aktivnost bakterija dovodi do promene boje mikrotuba pre ili nakon dodavanja reagensa. Reakcija je očitana prema priloženom uputstvu, a identifikacija urađena prema identifikacionom softveru proizvođača.

#### 4.4.2.2. Serološko potvrđivanje *Salmonella* spp.

Za identifikaciju salmonela polivalentnim i monovalentnim serumima prema Kauffmann-White shemi odnosno standardu ISO/TR 6579-3:2014, korišćeni su antiserumi proizvođača Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ i Statens Serum Institute (Danska). Aglutinacija je rađena na mikroskopskoj pločici i čitana na direktnoj svetlosti i crnoj pozadini. Postupak je bio sledeći: nanese se jedna kap antiseruma (oko 10 µl) na mikroskopsku pločicu i pomeša sa ispitujućom kulturom. Pozitivna reakcija se manifestovala pojavom aglutinata (krpica), a negativna homogenom mlečnom tečnošću. Vreme očitavanja reakcije je definisano uputstvom proizvođača.

### 4.5. Određivanje broja *Enterobacteriaceae*

Uporedo sa ispitivanjem na prisustvo *Salmonella* spp. u uzorcima briseva vršeno je određivanje broja *Enterobacteriaceae*, prema standardu SRPS ISO 21528-2, *Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja Enterobacteriaceae - Deo 2: Metoda brojanja kolonija*.

Određivanje broja *Enterobacteriaceae* je vršeno pravljjenjem serije pojedinačnih decimalnih razblaženja uzorka za ispitivanje tako što je pomoću sterilne pipete preneto u svaku od dve sterilne Petrijeve ploče po 1 ml uzorka za ispitivanje. Ponavljan je opisani postupak sa daljim razblaženjima, korišćenjem nove sterilne pipete za svako razblaženje. U svaku Petrijevu ploču naliveno je približno 10 ml ljubičastocrvenog žučnog agara sa glukozom (VRBG, Himedia, India) koji je posle pripreme ohlađen u vodenom kupatilu na 44°C i 47°C. Vreme koje protekne između inokulacije Petrijevih ploča i trenutka kada se podloga naliva u ploče ne sme da pređe 15 minuta.

Inokulat se pažljivo izmeša sa podlogom, horizontalnim pokretima, i podloga se ostavi da očvrsne u Petrijevim pločama koje se postavljaju na hladnu površinu. Posle potpunog očvršćavanja smeše, doda se pokrivni sloj od približno 15 ml ljubičastocrvenog žučnog agara sa glukozom da bi se sprečio sliveni rast i postigli

poluanaerobni uslovi. Nakon očvršćivanja, okrenu se pripremljene ploče i inkubiraju u inkubatoru podešenom na 37 °C tokom 24 h ± 2 h.

Karakteristične kolonije su ružičaste do crvene ili purpurne boje (sa oreolima taloga ili bez njih). Potom su izbrojane ploče koje sadrže manje od 150 karakterističnih kolonija, i slučajnim izborom izabrano je pet kolonija koje su biohemijskim testovima potvrđivane. Na ploče sa hranljivim agarom brazdanjem se zaseje svaka od kolonija izabranih za potvrđivanje. Ove ploče su inkubisane pri 37 °C tokom 24 h ± 2 h. Od testova za biohemijsko potvrđivanje korišćena je reakcija oksidaze i test fermentacije glukoze. Preračunavanje je vršeno prema standardu ISO 7218:2007.

## **4.6. Određivanje antimikrobne osetljivosti *Salmonella* spp.**

### **4.6.1. Disk difuzionna metoda**

Za ispitivanje antimikrobne osetljivosti disk difuzionom metodom izabrano je tri do pet ispitujućih kolonija koje nisu bile starije od 24h, i prenete u 4-5 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0,9% NaCl), i snažno promešane na vorteks mešalici. Suspenzija bakterija 0,5 McFarland skale, što iznosi približno  $1-2 \times 10^8$  bakterija/ml je korišćeno za dalji rad. Izabrane kolonije inkubisane su tokom noći na neselektivnoj podlozi (hranljivi agar, Torlak, Srbija). U roku od 15 minuta, sterilan bris je potapan u pripremljeni inokulum i rotiran je nekoliko puta uz gornji unutrašnji zid epruvete da bi se izbacio višak tečnosti. Nakon toga je izbrazdana čitava površina Petri ploča sa Muller Hinton agarom (BD, Becton, Dickinson and Company, USA) tri puta, okrećući pri tome ploče za 60 stepeni između brazdi kako bi se postiglo jednako raspoređivanje inokuluma. Ploče su potom ostavljene 15 minuta kako bi površinska vlaga bila upijena pre nanošenja diskova natopljenih odgovarajućim antibiotikom. Izabrani su odgovarajući diskovi i preneti pomoću pincete u aseptičnim uslovima na površinu agara. Diskovi su lagano pritisnuti kako bi došli u kontakt sa agarom. Pripremljene ploče sa agarom stranom okrenute su na gore i prenesene u inkubator na temperaturu od  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  tokom 16 do 18 sati u aerobnim uslovima.

Nakon inkubacije, očitavanje je vršeno sa donje strane Petrijeve ploče, tako što je ploča usmeravana ka izvoru svetlosti i očitavana vrednost pomoću plastičnog lenjira u milimetrima, pri čemu je vrednost zaokruživana na nablizi ceo broj. Prilikom očitavanja, podrazumevalo se da je zona inhibicije rasta zona oko diska antibiotika u kojem nema nikakvog rasta. Zone su imale izgled kruga. Ukoliko je soj rezistentan na određeni antibiotik, tada nije bilo nikakve zone inhibicije, već je soj rastao i ispod samog diska. Vrednost – zona na osnovu koje je procenjivano da li je osetljiv ili rezistentan je preuzeta od EUCAST (European Commission on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2015).

Za disk difuzionu metodu korišćeni su sledeći diskovi: NA-30 Nalidiksinska kiselina, CAZ 30 Ceftazidim, CIP-5 Ciprofloksacin, SXT- Sulfametoksazol-Trimetoprim, AM-10 Ampicilin, C- 30 Hloramfenikol, MEM-10 Meropenem, GM-10 Gentamicin i TE-30 Tetraciklin.

#### **4.6.2. E TEST**

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije korišćen je E test. E test je difuzioni test za određivanje MIC tj. minimalne inhibitorne koncentracije datog antibiotika, izražene u  $\mu\text{g/ml}$ , koje će inhibirati rast određene bakterije pod definisanim eksperimentalnim uslovima.

E test je tanka, inertna i neporozna plastična traka. Jedna strana (A) trake na sebi ima skalu za čitanje vrednosti MIC u  $\mu\text{g/mL}$  i šifru od dva ili tri slova na dršci - identifikacionu oznaku antibiotika.

Kao referentna podloga za E test je korišćen Muller Hinton agar kao i u disk difuzionoj metodi. Inokulum je pripreman identično kao i u disk difuzionoj metodi. Najpre je emulgovano nekoliko dobro izolovanih kolonija sa ploče hranljivog agara inkubiranih preko noći u odgovarajućem medijumu za suspenziju kako bi se postiglo potrebno zamućenje prema McFarland standardu. Potom je potopljen sterilan štapić za uzimanje brisa u suspenziju inokuluma i odstranjena je suvišna tečnost pritiskom štapića o unutrašnji zid epruvete za testiranje. Pažljivo je zasejana čitava površina agara tri puta, svaki put uz okretanje ploče za oko 60 stepeni kako bi se inokulum ravnomerno



rasporedio. Ploče su potom ostavljene da se suvišna vlaga apsorbuje oko 15 do 20 minuta tako da površina bude potpuno suva pre postavljanja E test traka sa gradijentom.

E test trake sa gradijentom su postavljene tako da strana na kojoj se nalazi MIC skala bude okrenuta nagore (ka poklopcu ploče) i da maksimalna koncentracija bude najbliža ivici ploče vodeći računa da čitava traka u potpunosti bude u dodiru sa površinom agara. Kada su ispod trake uočeni vazdušni džepovi, rađeno je odstranjivanje blagim pritiskanjem trake (bez pomeranja trake) vrhom pincete, počev od strane sa najnižom koncentracijom ka suprotnoj strani. Kada je postavljena, traka više nije pomerana.

Nakon završene inkubacije, oko E test traka javljala se zona inhibicije oblika elipse. Očitavanje se vršilo uzimanjem onog broja gde se porasle kolonije dodiruju sa E test trakom, i ta vrednost predstavlja MIC antibiotika. U ispitivanju su korišćene sledeće E test trake: Nalidiksinska kiselina - NA 0.016-256 mg/l, Ceftazidim - TZ 0.016-256 µg/ml, Ciprofloksacin - CI 0.002-32 µg/ml, Trimetoprim - TR 0.002-32 µg/ml, Ampicilin - AM 0.016-256 µg/ml, Hloramfenikol - CL 0.016-256µg/ml, Meropenem - MP 0.002-32µg/ml, Gentamicin - GM 0.016-256 µg/ml i Tetraciklin - TC 0.016-256 µg/ml.

#### **4.7. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)**

PFGE metoda se obavljala po protokolu U.S. CDC PulseNet protocol (One-Day 24-28h, Standardized Laboratory Protocol for molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)) (Ribot i sar., 2006).

Za ispitivanje genotipske pripadnosti metodom PFGE izolati salmonela su presejani na tripton soja agar (TSA, Merck, Nemačka) i inkubisani u vremenu od 18-20 h pri temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije, kolonije salmonela su prenešene u sterilne epruvete sa puferom za suspenziju ćelija do optičke gustine od 1,3 do 1,4 na spektrofotometru talasne dužine 610 nm. Od tako pripremljenih suspenzija po 200 µl je prenešeno u sterilne Eppendorf epruvete, a zatim dodato po 10 µL (20 mg/ml) proteinaze K (Invitrogen, USA). Uloga proteinaze K je da oslobodi DNK materijal iz bakterijske ćelije. Upotreba rukavica tokom ove faze je bila obavezna, jer se DNK-aze i

RNK-aze mogu nalaziti na rukama ljudi. Korišćene su plave nitrilne rukavice bez talka (Unigloves, Germany). Ova suspenzija je zatim mešana sa 200 µl otopljene i na temperaturi od 50°C SeaKem Gold agaroze (Lonza, USA) i prenešena u kalupe za razlivanje i pripremu plagova. Nakon hlađenja stvrdnuti plagovi su istiskivani iz kalupa u epruvete sa puferom za lizu ćelija. Liziranje sa proteinazom K je obavljano u termo šejkeru (Bio San, Letonija) na temperaturi od 54°C u trajanju od 16 sati. Kako bi DNK lanac u celosti bio dostupan restriktivnim enzimima, proteinaza K i sastojci pufera za liziranje, dovode do razaranja ćelijskog zida bakterije bez lomljenja i kidanja DNK, što je i cilj ovog postupka. Nakon liziranja, plagovi su ispirani u dejonizovanoj vodi dva puta i u Tris-EDTA puferu četiri puta na temperaturi od 50°C u laminarnoj komori pomoću pipeta. Ovim postupkom su uklonjeni produkti liziranja kao što su ostaci proteinaze i nepoželjne partikule, kako bi se dobio što čistiji genom salmonele. Plagovi su nakon liziranja podvrgnuti digestiji restriktivnim enzimom XBal (Fermentas, Litvanija) na temperaturi od 37°C u termostatu u trajanju od 16 sati. Nakon digestije restriktivnim enzimom plagovi su podvrgavani elektroforezi u 1% SeaKem Gold agarozu. Elektroforeza je vršena na CHEF DRIII sistemu (Bio-Rad), a njeni parametri su bili početno vreme 2,2 sekunde, završno vreme 63,8 sekundi pri naponu struje od 200 volti. Dužina trajanja elektroforeze je iznosila 18 sati, a temperatura pufera 14°C. Vizuelizacija fragmenata DNK je vršena bojenjem etidijum bromidom (Bio-Rad, USA), a zatim izlaganjem UV zracima. Snimanje je vršeno GelDoc XR sistemom, a primarna analiza gela je vršena GelDoc softverom, dok je analiza fragmenata vršena FPQuest softverom (Bio-Rad, USA).

#### **4.8. Statistička analiza**

U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta kao osnovne statističke metode koristili smo deskriptivne statističke pokazatelje. Ovi pokazatelji su omogućili opisivanje dobijenih eksperimentalnih rezultata i njihovo tumačenje. Od deskriptivnih statističkih pokazatelja koristili smo: meru centralne tendencije, standardnu devijaciju, standardnu grešku, aritmetičke sredine, interval varijacije i

koeficijent varijacije. Dalja statistička analiza odvija se u zavisnosti da li su analizirani podaci normalno distribuirani ili ne. Testiranje na normalnost izvedeno je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. U slučaju normalne distribucije podataka za poređenje signifikantnih razlika između eksperimentalnih grupa koristili smo parametarsku analizu varijanse („one way analysis of variances“). U slučaju kada distribucija podataka nije normalna upotrebljavana je ne-parametarska Kruskal - Vallisova analiza varijanse („Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks“). U slučaju da postoje statistički signifikantne razlike između grupa, parovi grupa bili su poređeni između sebe na osnovu parametarskog Tukievog testa, odnosno ne-parametarskog „Dunn's Multiple Comparison“ testa i Hi-kvadrat testa. Signifikantnost razlika ustanovljavana je na nivoima značajnosti od 5 i 1 %. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza izvedenog eksperimenta urađena je u GraphPad Prism verzija 6.00 za Windows, (GraphPad Software, San Diego, California USA), [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) i MS Excel-u.

## **5. REZULTATI**

### **5.1. Rezultati obrade podataka o poreklu životinja, načinu transporta, načinu ishrane i boravku u depou**

Anketom je utvrđeno da su svinje u osam ispitivanih nedelja poticale sa farme, dok su u prvoj i devetoj nedelji bile iz otkupa, odnosno poticale su od individualnih proizvođača. U dve ispitivane nedelje, svinje su poticale iz Surčina (1. i 9. nedelja), u drugoj ispitivanoj nedelji iz Vršca, iz Vrbasa tokom šest nedelja (3., 5., 6., 7., 8. i 10. nedelja), a iz Obrenovca u četvrtoj nedelji ispitivanja. Najzastupljeniji način ishrane je bio kombinovani, dok je u tri slučaja bila zastupljena čvrsta hrana (2., 3., i 4. nedelja). Masa svinja je u sedam ispitujućih nedelja bila u opsegu od 90-100 kg, dok je u tri nedelje bila u opsegu 100-110 kg (1., 2., i 3. nedelja). Svinje mase preko 110 kg bile su zastupljene u devetoj nedelji ispitivanja. Starost svinja se tokom devet ispitujućih nedelja kretala u opsegu od 6-9 meseci, dok su tokom devete nedelje svinje bile starosti od 9-12 meseci. Transport svinja do klanice trajao je od jedan do četiri sata. Svinje su u četvrtoj nedelji transportovane u toku jednog sata, dok su svinje u prvoj i devetoj nedelji transportovane tokom dva sata. Tokom tri sata svinje su transportovane u drugoj, šestoj i osmoj nedelji ispitivanja. Transport svinja u trećoj, petoj, sedmoj i desetoj nedelji trajao je četiri sata. Prema rezultatima ankete svinje su boravile u stočnom depou od jedan do četrnaest časova. Tokom jednog sata u desetoj nedelji, tokom dva sata u trećoj i sedmoj nedelji, tokom tri sata u osmoj i devetoj nedelji, tokom pet sati u prvoj, drugoj i petoj nedelji, tokom dvanaest sati u šestoj nedelji i tokom četrnaest sati u četvrtoj nedelji.

Tokom svih deset nedelja nije došlo do mešanja svinja u stočnom depou sa svinjama drugog porekla, a higijena je bila na zadovoljavajućem nivou.

## 5.2. Nalaz *Salmonella* spp. u brisevima uzetim sa trupova

### 5.2.1. Rezultati izolacije *Salmonella* spp. iz uzoraka briseva sa trupova svinja nakon omamljivanja, nakon završene obrade i nakon hlađenja

Od ukupno ispitanih 100 trupova svinja tokom deset nedelja u 41% je dokazano prisustvo *Salmonella* spp. nakon omamljivanja, dok je nakon završene obrade potvrđeno u 2% ispitanih trupova. Prevalencija *Salmonella* spp. u brisevima sa trupova svinja po ispitujućim nedeljama data je u tabeli 5.2.1.1.

**Tabela 5.2.1.1.** Prevalencija *Salmonella* spp. u brisevima sa trupova svinja po ispitujućim nedeljama

Nedelja	Broj trupova	Nakon omamljivanja		Nakon završene obrade		Nakon hlađenja	
		Broj	(%)	Broj	(%)	Broj	(%)
1.	10	8	80	0	0	0	0
2.	10	6	60	0	0	0	0
3.	10	9	90	2	20	0	0
4.	10	6	60	0	0	0	0
5.	10	4	40	0	0	0	0
6.	10	5	50	0	0	0	0
7.	10	1	10	0	0	0	0
8.	10	2	20	0	0	0	0
9.	10	0	0	0	0	0	0
10.	10	0	0	0	0	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>	<b>41</b>	<b>41</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Nalaz salmonela, tokom deset nedelja uzorkovanja, nakon omamljivanja kretao se u opsegu od 0 do 90 %. Nakon završene obrade, salmonele su izolovane samo sa dva trupa u trećoj nedelji ispitivanja.

Da bi se dobili podaci o što potpunijoj distribuciji salmonela na trupovima, uzimani su brisevi sa obe polovine trupa. Jedino u brisevima uzetim sa obe polovine trupa nakon omamljivanja utvrđen je nalaz salmonela. Rezultati tih ispitivanja prikazani su u tabeli 5.2.1.2.

**Tabela 5.2.1.2.** Prevalencija *Salmonella* spp. u brisevima uzetim nakon omamljivanja sa obe polovine trupa

Nedelja	Broj trupova	Nalaz <i>Salmonella</i> spp. nakon omamljivanja sa obe polovine trupa			
		Jednostrano		Obostrano	
		Broj	(%)	Broj	(%)
1.	10	8	80	0	0
2.	10	6	60	0	0
3.	10	9	90	3	30
4.	10	6	60	1	10
5.	10	4	40	1	10
6.	10	5	50	1	10
7.	10	1	10	0	0
8.	10	2	20	0	0
9.	10	0	0	0	0
10.	10	0	0	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>	<b>41</b>	<b>41</b>	<b>6</b>	<b>6</b>

Iz tabele 5.2.1.2. se može videti da je u trećoj nedelji *Salmonella* spp. izolovana obostrano sa tri trupa svinja, dok je u četvrtoj, petoj i šestoj nedelji izolovana sa po jednog trupa.

Salmonele su češće izolovane iz briseva uzetih sa jedne polovine u odnosu na nalaz u brisevima uzetim sa obe polovine ispitanih trupova ( $p < 0,01$ ).

### 5.2.2. Rezultati izolacije *Salmonella* spp. iz sadržaja ileuma

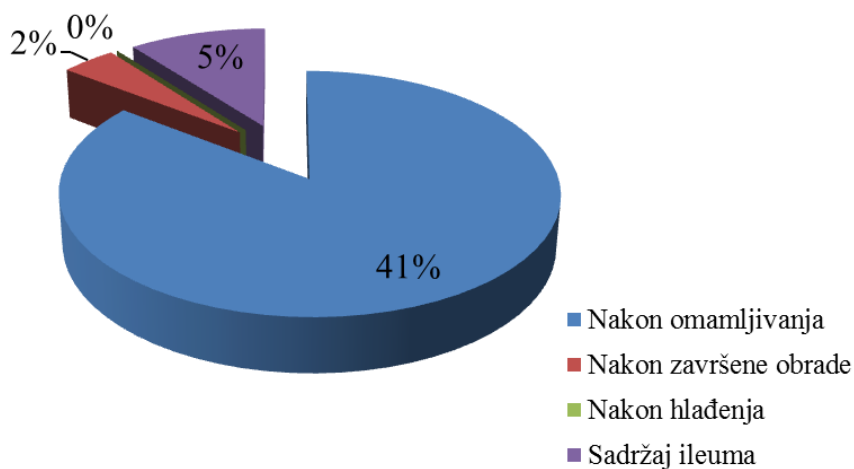
Od ukupno ispitanih 100 uzoraka sadržaja ileuma zaklanih svinja tokom deset nedelja u 5% uzoraka dokazano je prisustvo *Salmonella* spp. Rezultati nalaza *Salmonella* spp. u sadržaju ileuma po nedeljama ispitivanja dati su u tabeli 5.2.2.1.

**Tabela 5.2.2.1.** Prevalencija *Salmonella* spp. u uzorcima sdržaja ileuma zaklanih svinja po nedeljama ispitivanja

Nedelja	Broj zaklanih svinja	Sadržaj ileuma	
		Broj	(%)
1.	10	0	0
2.	10	0	0
3.	10	1	1
4.	10	0	0
5.	10	0	0
6.	10	0	0
7.	10	1	1
8.	10	0	0
9.	10	2	2
10.	10	1	1
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

### 5.2.3. Struktura prevalencije *Salmonella* spp. na trupovima svinja i sadržaju ileuma

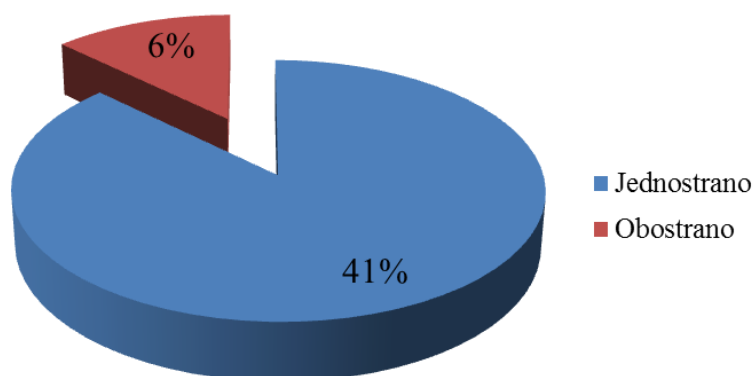
Dobijeni rezultati strukture prevalencije *Salmonella* spp. na trupovima svinja po fazama obrade i u sadržaju ileuma prikazani su grafički na grafikonu 5.2.3.1.



**Grafikon 5.2.3.1.** Struktura prevalencije *Salmonella* spp. na trupovima svinja po fazama obrade i sadržaju ileuma

Analizirajući prevalenciju *Salmonella* spp. na trupovima svinja ustanovljena je veća prevalencija u brisevima uzetim sa trupova nakon omamljivanja nego u brisevima uzetim nakon obrade i hlađenja ( $p < 0,01$ ). Nalaz salmonela u brisevima trupa nakon omamljivanja, u odnosu na nalaz u sadržaju ileuma je bio značajno veći ( $p < 0,01$ ), a značajna razlika je utvrđena i u nalazu salmonela u brisevima trupova nakon hlađenja u odnosu na nalaz u sadržaju ileuma ( $p < 0,05$ ). Međutim, nije utvrđena značajna razlika u nalazu salmonela u brisevima trupova nakon obrade i sadržaju ileuma ( $p > 0,05$ ).

Dobijeni rezultati strukture prevalencije *Salmonella* spp. na trupovima svinja nakon omamljivanja, na jednoj odnosno drugoj polovini trupa, prikazani su na grafikonu 5.2.3.2.



**Grafikon 5.2.3.2.** Struktura prevalencije *Salmonella* spp. na trupovima svinja nakon omamljivanja na jednoj i obe polovine trupa

### **5.3. Rezultati određivanja broja *Enterobacteriaceae* iz uzoraka briseva sa trupova svinja nakon omamljivanja, nakon završene obrade i nakon hlađenja**

U cilju ocene higijene u procesu proizvodnje trupova svinja, pored ispitivanja prisustva salmonela, urađeno je i određivanje broja enterobakterija. Rezultati tih ispitivanja sa deskriptivnim statističkim parametrima prikazani su u tabeli 5.3.1. Broj *Enterobacteriaceae* ( $\log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>) u brisevima sa trupova svinja tokom deset nedelja ispitivanja prikazan je u prilogu u tabeli 9.1.

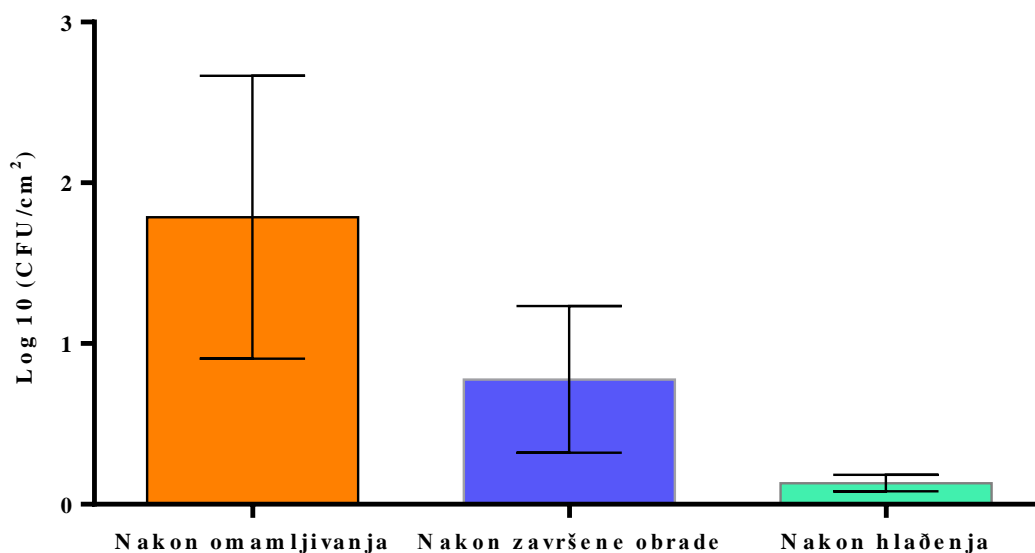


**Tabela 5.3.1.** Rezultati određivanja broja *Enterobacteriaceae* ( $\log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>) u brisevima sa trupova svinja i deskriptivni statistički parametri

	n	$\bar{x}$	SD	SE	CV (%)	X max	X min
Nakon omamljivanja	100	1,79ab	0,82	0,0823	46,11	3,85	0,45
Nakon završene obrade	100	0,78ac	0,40	0,0400	51,48	2,20	0,15
Nakon hlađenja	33	0,13bc	0,05	0,0080	34,66	0,20	0,10

Statistička signifikantnost prikazana je istim slovima: a, b, c -  $p < 0,01$

Statističkom analizom ustanovljeno je da je prosečan broj *Enterobacteriaceae* bio najmanji nakon hlađenja ( $0,13 \pm 0,05 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>), što je značajno manje ( $p < 0,01$ ) od prosečne vrednosti nakon omamljivanja ( $1,79 \pm 0,88 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>) i prosečne vrednosti nakon obrade ( $0,78 \pm 0,46 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>). Najveći koeficijent varijacije zabeležen je nakon obrade (51,48%), a najniži nakon hlađenja (34,66%). Prosečne vrednosti broja *Enterobacteriaceae* u različitim fazama prikazane su na grafikonu 5.3.1.



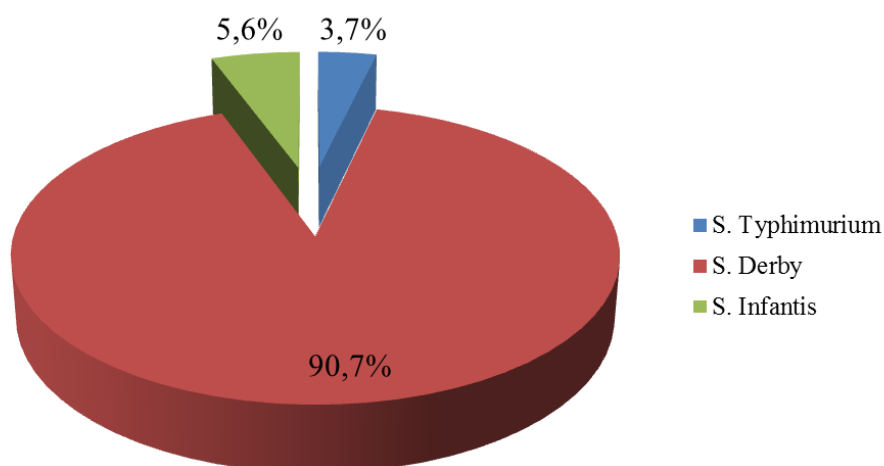
**Grafikon 5.3.1.** Prosečne vrednosti broja *Enterobacteriaceae* u različitim fazama

## 5.4. Rezultati fenotipizacije izolata salmonela

Incidencija izolovanih serotipova salmonela iz ispitivanih uzoraka prikazana je u tabeli 5.4.1. Utvrđena su tri serotipa. Najčešće je izolovan serotip *S. Derby* (90,74%), potom *S. Infantis* (5,56%) i *S. Typhimurium* (3,7%) (Grafikon 5.4.1). *S. Derby* je izolovana iz briseva nakon omamljivanja, nakon obrade i iz sadržaja ileuma, dok je *S. Infantis* bila utvrđena samo u uzorcima briseva nakon omamljivanja. *S. Typhimurium* je bila izolovana samo iz sadržaja ileuma kod dve svinje (3,7%).

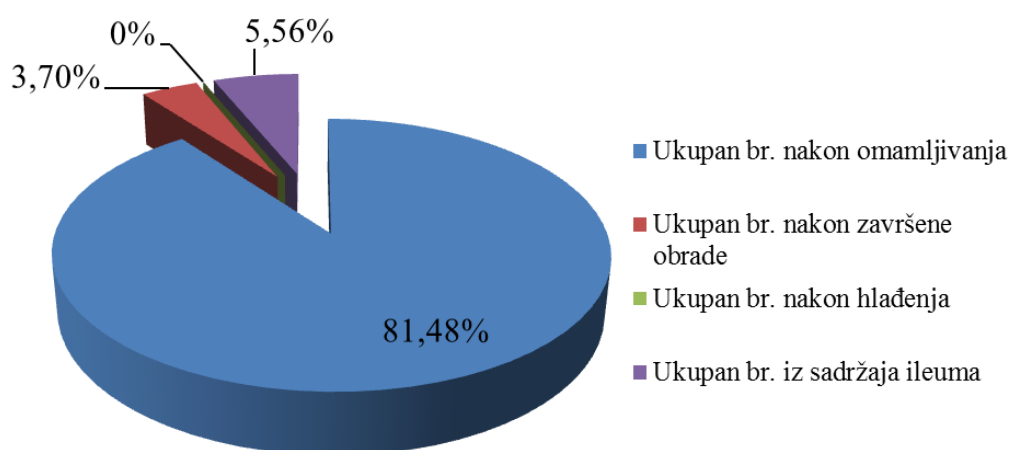
**Tabela 5.4.1.** Incidencija serotipova *Salmonella* izolovanih iz briseva sa trupova svinja i sadržaja ileuma

Serotip	Nalaz izolovanih serotipova		Nalaz izolovanih serotipova nakon omamljivanja		Nalaz izolovanih serotipova nakon završene obrade		Nalaz izolovanih serotipova nakon hladenja		Nalaz izolovanih serotipova iz sadržaja ileuma	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>S. Derby</i>	49	90,74	44	93,62	2	100	0	0	3	60
<i>S. Infantis</i>	3	5,56	3	6,38	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhimurium</i>	2	3,70	0	0	0	0	0	0	2	40
<b>Ukupno</b>	<b>54</b>	<b>100</b>	<b>47</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>100</b>



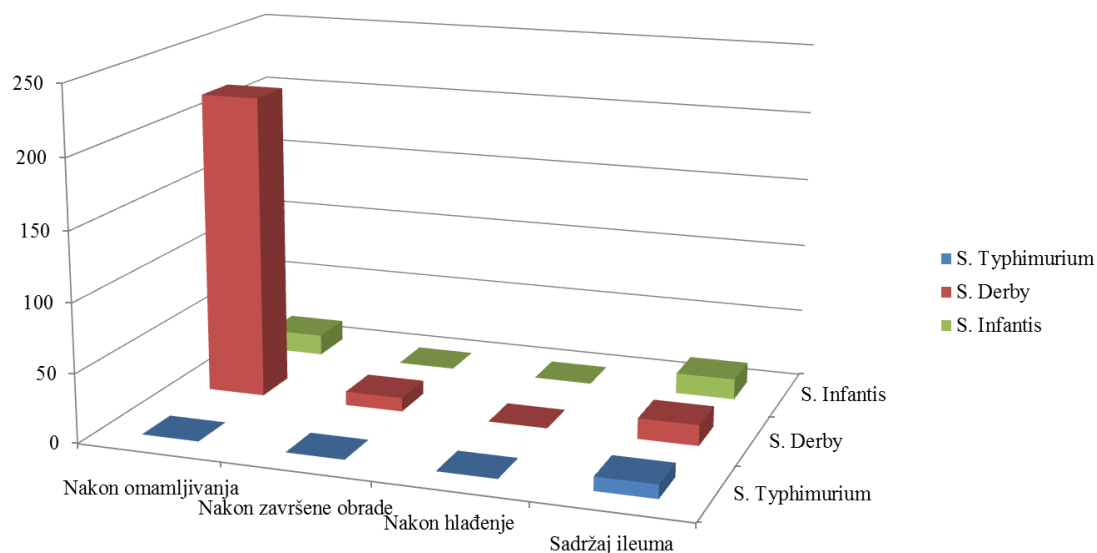
**Grafikon 5.4.1.** Struktura distribucije serotipova salmonela izolovanih sa trupova svinja i sadržaja ileuma

Rezultati serotipizacije izolata *Salmonella* spp. pokazuju da je iz uzoraka briseva uzetih nakon omamljivanja najčešće izolovana *S. Derby* (93,62%) ( $p < 0,01$ ). Utvrđen je signifikantno veći broj ovog serotipa u odnosu na *S. Infantis* izolovanu sa trupova nakon završene obrade ( $p < 0,01$ ). Grafički prikaz strukture izolovanih serotipova *S. Derby* dat je na grafikonu 5.4.2.



**Grafikon 5.4.2.** Grafički prikaz strukture izolovanih serotipova *S. Derby* sa trupova svinja i sadržaja ileuma

*S. Typhimurium* je izolovana jedino iz uzoraka sadržaja ileuma. Grafički prikaz distribucije sojeva salmonela izolovanih iz briseva uzetih sa trupova u različitim fazama ispitivanja i u sadržaju ileuma dat je na grafikonu 5.4.3.



**Grafikon 5.4.3.** Grafički prikaz distribucije serotipova salmonela po fazama ispitivanja i u sadržaju ileuma

Analizom prisustva *Salmonella* spp. po serotipovima bez obzira na fazu uzorkovanja, ustanovljen je najčešći nalaz serotipa *S. Derby* u odnosu na *S. Infantis* i *S. Typhimurium*.

## 5.5. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove

Osetljivost izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove ispitivana je disk-difuzionom metodom i E-testom.

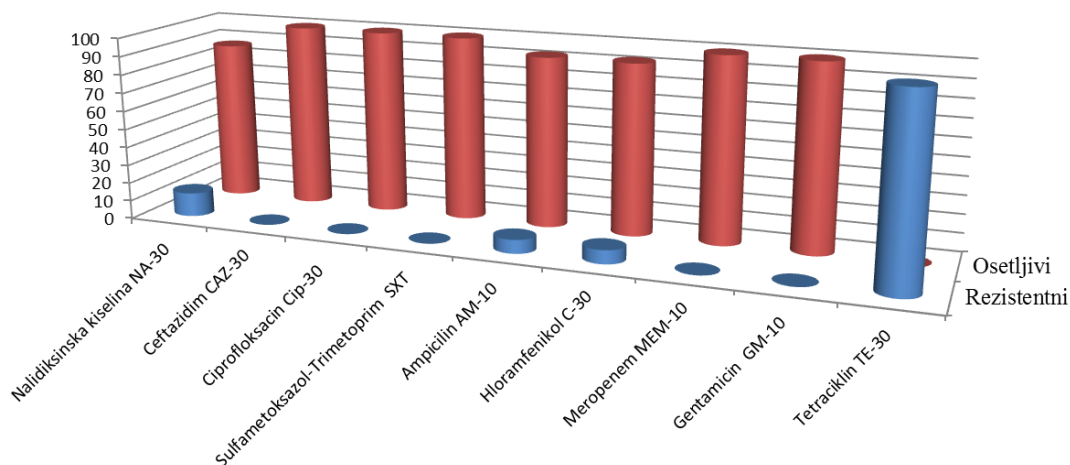
### 5.5.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antimikrobne lekove disk-difuzionom metodom

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove dobijeni disk difuzionom metodom prikazani su u tabeli 5.5.1.1.

**Tabela 5.5.1.1.** Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove dobijeni disk difuzionom metodom

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Osetljivi izolati		Rezistentni izolati	
		Broj	(%)	Broj	(%)
Nalidiksinska kiselina NA-30	270	235	87,04	35	12,96
Ceftazidim CAZ-30	270	270	100	0	0
Cip-30	270	270	100	0	0
Sulfametoksazol-trimetoprim SXT	270	270	100	0	0
Ampicilin AM-10	270	250	92,60	20	7,41
Hloramfenikol C-30	270	250	92,60	20	7,41
Meropenem MEM-10	270	270	100	0	0
Gentamicin GM-10	270	270	100	0	0
TetraciklinTE-30	270	0	0	270	100

Svi ispitivani izolati salmonela su bili osetljiv na pet antimikrobnih lekova (ceftazidim, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim, meropenem i gentamicin), a rezistentni na tetraciklin. Kod svih ostalih ispitanih antimikrobnih lekova ustanovljena je visoka osetljivost ispitivanih izolata salmonela. Rezistencija se kretala od 7,41% za ampicilin i hloramfenikol, do 12,96% za nalidiksinsku kiselinu. Na grafikonu 5.5.1.1. dat je grafički prikaz osetljivosti salmonela na antimikrobne lekove.



**Grafikon 5.5.1.1.** Grafički prikaz osetljivosti salmonela na antimikrobne lekove

Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Derby*, *S. Infantis* i *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove dobijeni disk difuzionom metodom prikazani su u tabelama 5.5.1.2 – 5.5.1.4.

**Tabela 5.5.1.2.** Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Derby* na antimikrobne lekove dobijeni disk difuzionom metodom

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Osetljivi izolati		Rezistentni izolati	
		Broj	(%)	Broj	(%)
Nalidiksinska kiselina NA-30	245	245	100	0	0
Ceftazidim CAZ-30	245	245	100	0	0
Ciprofloksacin Cip-30	245	245	100	0	0
Sulfametoksazol-trimetoprim SXT	245	245	100	0	0
Ampicilin AM-10	245	240	97,96	5	2,04
Hloramfenikol C-30	245	240	97,96	5	2,04
Meropenem MEM-10	245	245	100	0	0
Gentamicin GM-10	245	245	100	0	0
Tetraciklin TE-30	245	0	0	245	100

Svi izolati *S. Derby* su bili osetljivi na 6 antimikrobnih lekova (nalidiksinska kiselina, ceftazidim, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim, meropenem i gentamicin).

**Tabela 5.5.1.3.** Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Infantis* na antimikrobne lekove dobijeni disk difuzionom metodom

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Osetljivi izolati		Rezistentni izolati	
		Broj	(%)	Broj	(%)
Nalidiksinska kiselina NA-30	15	0	0	15	100
Ceftazidim CAZ-30	15	15	100	0	0
Ciprofloksacin Cip-30	15	15	100	0	0
Sulfametoksazol-trimetoprim SXT	15	15	100	0	0
Ampicilin AM-10	15	15	100	0	0
Hloramfenikol C-30	15	15	100	0	0
Meropenem MEM-10	15	15	100	0	0
Gentamicin GM-10	15	15	100	0	0
Tetraciklin TE-30	15	0	0	15	100

Svi ispitani izolati *S. Infantis* su bili osetljivi na 7 antimikrobnih lekova (ceftazidim, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim, ampicilin, hloramfenikol, meropenem i gentamicin), a rezistentni na dva antimikrobna leka (nalidiksinska kiselina i tetraciklin).

**Tabela 5.5.1.4.** Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove dobijeni disk difuzionom metodom

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Osetljivi izolati		Rezistentni izolati	
		Broj	(%)	Broj	(%)
Nalidiksinska kiselina NA-30	10	0	0	10	100
Ceftazidim CAZ-30	10	10	100	0	0
Ciprofloksacin Cip-30	10	10	100	0	0
Sulfametoksazol-trimetoprim SXT	10	10	100	0	0
Ampicilin AM-10	10	10	0	10	100
Hloramfenikol C-30	10	0	0	10	100
Meropenem MEM-10	10	10	100	0	0
Gentamicin GM-10	10	10	100	0	0
Tetraciklin TE-30	10	0	0	10	100

Svi ispitivani izolati *S. Typhimurium* su bili osetljivi na 5 antimikrobnih lekova (ceftazidim, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim, meropenem i gentamicin), a rezistentni na četiri antimikrobna leka (ampicilin, hloramfenikol, nalidiksinska kiselina i tetraciklin).

### 5.5.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove dobijene E-testom

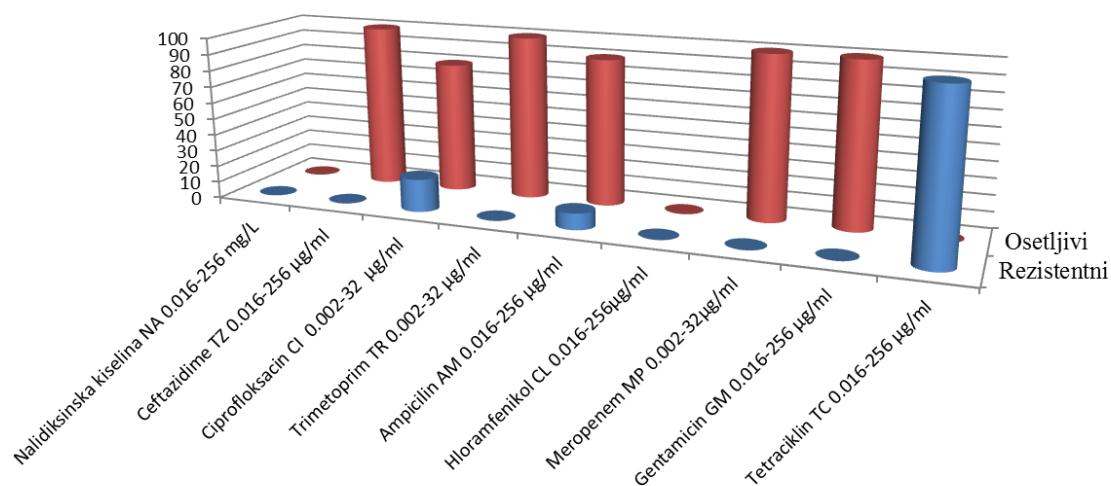
Ispitivanjem osetljivosti izolovanih salmonela na antimikrobne lekove E-testom obuhvaćeno je 30 izolata *Salmonella* spp., od čega 23 izolata *S. Derby*, 3 izolata *S. Infantis* i 4 izolata *S. Typhimurium*. U tabeli 5.5.2.1. dati su rezultati ispitivanja osetljivosti salmonela na antimikrobne lekove dobijeni E-testom.

**Tabela 5.5.2.1.** Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove dobijeni E-testom

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Osetljivi izolati		Rezistentni izolati	
		Broj	(%)	Broj	(%)
Nalidiksinska kiselina NA 0.016-256 mg/L	30	23	76,7	7	23,3
Ceftazidim TZ 0.016-256 µg/ml	30	30	100	0	0
Ciprofloksacin CI 0.002-32 µg/ml	30	24	80	6	20
Trimetoprim TR 0.002-32 µg/ml	30	30	100	0	0
Ampicilin AM 0.016-256 µg/ml	30	27	90	3	10
Hloramfenikol CL 0.016-256µg/ml	30	26	86,6	4	14,4
Meropenem MP 0.002-32µg/ml	30	30	100	0	0
Gentamicin GM 0.016-256 µg/ml	30	30	100	0	0
Tetraciklin TC 0.016-256 µg/ml	30	0	0	30	100

Svi ispitani izolati salmonela su osetljivi na četiri antimikrobna leka (ceftazidim, trimetoprim, meropenem i gentamicin), a rezistentni na tetraciklin. Kod svih ostalih ispitanih antimikrobnih lekova ustanovljena je visoka osetljivost izolata salmonela. Rezistencija se kretala od 10% za ampicilin, 14,4% za hloramfenikol, 20% za ciprofloksacin i do 23,3 % za nalidiksinsku kiselinu. Na grafikonu 5.5.2.1. dat je grafički prikaz osetljivosti salmonela na antimikrobne lekove.





**Grafikon 5.5.2.1.** Grafički prikaz osetljivosti *Salmonella* spp. na ispitivane antimikrobne lekove dobijene E-testom

Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Derby*, *S. Infantis* i *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom prikazani su u tabelama 5.5.2.2. - 5.5.2.4.

**Tabela 5.5.2.2.** Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Derby* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Osetljivi izolati		Rezistentni izolati	
		Broj	(%)	Broj	(%)
Nalidiksinska kiselina NA 0.016-256 mg/L	23	23	100	0	0
Ceftazidim TZ 0.016-256 µg/ml	23	23	100	0	0
Ciprofloksacin CI 0.002-32 µg/ml	23	23	100	0	0
Trimetoprim TR 0.002-32 µg/ml	23	23	100	0	0
Ampicilin AM 0.016-256 µg/ml	23	23	100	0	0
Hloramfenikol CL 0.016-256 µg/ml	23	23	100	0	0
Meropenem MP 0.002-32 µg/ml	23	23	100	0	0
Gentamicin GM 0.016-256 µg/ml	23	23	100	0	0
Tetraciklin TC 0.016-256 µg/ml	23	0	0	23	100

Svi izolati *S. Derby* su bili osetljivi na osam antimikrobnih lekova (nalidiksinska kiselina, ceftazidim, ciprofloksacin, trimetoprim, ampicilin, hloramfenikol, meropenem i gentamicin), a rezistentni na tetraciklin.

**Tabela 5.5.2.3.** Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Infantis* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Osetljivi izolati		Rezistentni izolati	
		Broj	(%)	Broj	(%)
Nalidiksinska kiselina NA 0.016-256 mg/L	3	0	0	3	100
Ceftazidim TZ 0.016-256 µg/ml	3	3	100	0	0
Ciprofloksacin CI 0.002-32 µg/ml	3	3	100	0	0
Trimetoprim TR 0.002-32 µg/ml	3	3	100	0	0
Ampicilin AM 0.016-256 µg/ml	3	3	100	0	0
Hloramfenikol CL 0.016-256µg/ml	3	3	100	0	0
Meropenem MP 0.002-32µg/ml	3	3	100	0	0
Gentamicin GM 0.016-256 µg/ml	3	3	100	0	0
Tetraciklin TC 0.016-256 µg/ml	3	0	0	3	100

Svi izolati *S. Infantis* su bili osetljivi na sedam antimikrobnih lekova (ceftazidim, ciprofloksacin, trimetoprim, ampicilin, hloramfenikol, meropenem i gentamicin), a rezistetni na tetraciklin i nalidiksinsku kiselinu.

**Tabela 5.5.2.4.** Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Osetljivi izolati		Rezistentni izolati	
		Broj	(%)	Broj	(%)
Nalidiksinska kiselina NA 0.016-256 mg/L	4	0	0	4	100
Ceftazidim TZ 0.016-256 µg/ml	4	4	100	0	0
Ciprofloksacin CI 0.002-32 µg/ml	4	4	100	0	0
Trimetoprim TR 0.002-32 µg/ml	4	4	100	0	0
Ampicilin AM 0.016-256 µg/ml	4	1	25	3	75
Hloramfenikol CL 0.016-256µg/ml	4	0	0	4	100
Meropenem MP 0.002-32µg/ml	4	4	100	0	0
Gentamicin GM 0.016-256 µg/ml	4	4	100	0	0
Tetraciklin TC 0.016-256 µg/ml	4	0	0	4	100

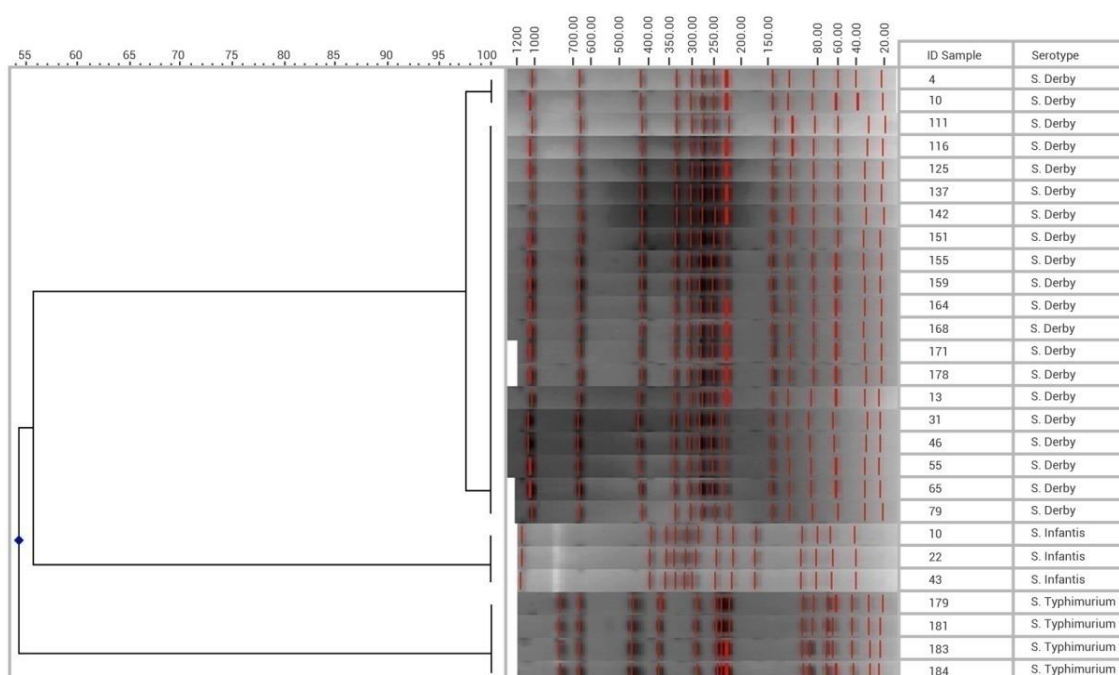
Svi izolati *S. Typhimurium* su bili osetljivi na pet antimikrobnih lekova (ceftazidim, ciprofloksacin, trimetoprim, meropenem i gentamicin), a rezistentni na nalidiksinsku kiselinu, hloramfenikol i tetraciklin. Rezistencija na ampicilin utvrđena je kod 75% ispitanih izolata.

## **5.6. Rezultati genotipizacije salmonela izolovanih sa trupova svinja i sadržaja ileuma**

Genotipizacijom je bilo obuhvaćeno 20 izolata *S. Derby*, tri izolata *S. Infantis* i četiri izolata *S. Typhimurium*. Analizom podataka pomoću FPQest softvera dobijeni su PFGE profili ili genotipovi. Profilima su dodeljeni kodovi koji su se sastojali od prvog slova vrste bakterije, tri slova serovara, dva slova korišćenog restriktivnog enzima i četvorocifrenog broja počev od 0001. Kod *S. Derby* su utvrđena dva PFGE profila

međusobne sličnosti od 98%. Prvi profil SDERXB0001, kome su pripadali izolati 13, 31, 46, 55, 65, 79, 111, 116, 125, 137, 142, 151, 155, 159, 164, 168, 171, 178, i drugi profil SDERXB0002 kome su pripadali izolati 4 i 10. Izolati unutar ova dva profila su imali 100% međusobne sličnosti (Slika 5.5.1.).

Kod *S. Infantis* utvrđen je jedan profil, SINFXB0001 kome su pripadala sva tri izolata (10, 22, 43). Kod *S. Typhimurium* je utvrđen takođe samo jedan profil STYPXB0001 kome su pripadala sva četiri izolata.



**Slika 5.6.1.** Dendrogram elektroforetske sheme dobijen sa enzimom XbaI - genom DNK izolata *S. Derby*, *S. Infantis* i *S. Typhimurium* iz FPQuest programa koji pokazuje koeficijent sličnosti između ispitivanih izolata

## 6. DISKUSIJA

Infekcije prouzrokovane *Salmonella* spp. predstavljaju globalni problem, iz razloga što dovode do značajnog morbiditeta i mortaliteta kako u populaciji ljudi tako i životinja, i posledično značajnih ekonomskih šteta. Između ljudi i životinja salmonela se šire orofekalnim putem obično konzumiranjem kontaminirane hrane i vode. Iz tih razloga blagovremena detekcija *Salmonella* spp. u hrani obezbeđuje mogućnost prevencije ulaska kontaminirane hrane u lanac ishrane. Izvori kontaminacije trupova tokom klanja uključuju inficirane svinje kao i izvore kontaminacije koji su povezani sa okolinom. Postoje različiti indikator mikroorganizmi koji se mogu koristiti u proizvodnji hrane za procenu higijene kao i bezbednosti proizvodnje hrane. Prisustvo pojedinih indikator mikroorganizama može biti posmatrano kao rezultat direktne ili indirektna kontaminacije hrane fekalnim materijama. Prisustvo bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* se često koristi kao indikator higijene procesa proizvodnje, s obzirom da se nalaze kako u okruženju tako i u digestivnom sistemu toplokrvnih životinja. Imajući u vidu navedeno, upravo su ovo i bili razlozi praćenja salmonela i *Enterobacteriaceae* duž linije klanja svinja.

Iz literature je poznato (Karabsil i sar., 2008) da se prevalencija salmonela kod svinja povećava nakon transporta i klanja u poređenju sa nalazom na samoj farmi. Uzrok ovome može biti duži transport svinja kao i produženi boravak u stočnom depou. Svinje se mogu inficirati direktno preko kontaminirane hrane i vode, kontaktom sa drugim životinjama ili indirektno putem kontaminiranih površina. U jednom ispitivanju tokom transporta prevalencija salmonela se povećala za jednu trećinu što ukazuje da se radi o unakrsnoj kontaminaciji. Kasnije je bakteriološkom analizom utvrđeno da je pet od šest pregledanih briseva bilo je pozitivno, dok su uzorci limfnih čvorova i ceklani

sadržaj bili negativni na prisustvo salmonela. Ovaj podatak ide u prilog činjenici da unakrsna kontaminacija predstavlja značajan problem sa aspekta bezbednosti hrane (Alban i Stark, 2002; Kranker i sar., 2001). U našem ispitivanju, dužina transporta svinja do klanice se kretala od jedan do četiri časa. Tako na primer, u petoj i sedmoj nedelji našeg ispitivanja transport je trajao četiri časa sa prevalencijom salmonela nakon omamljivanja od 40% u petoj i 10% u sedmoj nedelji. U trećoj nedelji transport je trajao tri časa sa prevalencijom salmonela od 90% nakon omamljivanja. Iz navedenih podataka se ne može zaključiti da je dužina transporta bila u direktnoj povezanosti sa nalazom salmonela na trupovima svinja na klanici.

Prema rezultatima ankete svinje su boravile u stočnom depou klanice od jedan do četrnaest časova. U trećoj, osmoj i devetoj nedelji ispitivanja, boravak svinja u stočnom depou je trajao tri časa sa prevalencijom salmonela od 90% u trećoj nedelji, 20% u osmoj nedelji, a u devetoj nedelji nalaz je bio negativan. Primera radi, u četvrtoj nedelji ispitivanja boravak životinja u stočnom depou bio je najduži, a prevalencija salmonela je bila 60%. U poređnom analizom vremena boravka i nalaza salmonela kod zaklanih svinja na klanici ne može se sa tačnosću reći da postoji korelacija, odnosno veza između dužine boravka svinja u stočnom depou i nalaza salmonela na trupovima.

Kako bi smo dobili tačnije i pouzdanije rezultate ispitivanja nalaza salmonela i *Enterobacteriaceae*, uzorkovanje je obuhvatilo obe polutke trupa. Prema literaturnim podacima (EFSA, 2011) uzorkovanje briseva nakon omamljivanja i njihovo dalje mikrobiološko ispitivanje na prisustvo salmonela nam daje sliku o uticaju transporta i boravka životinja u stočnom depou na potencijalnu kontaminaciju trupova. Uzorkovanje nakon završene obrade vezano je za kontrolu higijene procesa proizvodnje, dok je uzorkovanje nakon hlađenja vezano za status trupa nakon celokupnog procesa proizvodnje, jer kao takav ulazi u lanac ishrane. Uzimanje uzoraka ilealnog sadržaja daje nam sliku nalaza sojeva salmonela koji potiču sa farme, ali nam daje i mogućnost poređenja ovih sojeva salmonela sa sojevima izolovanim u klanici.

U našem ispitivanju *Salmonella* je izolovana sa 41 trupa od 100 ispitanih (41%) nakon omamljivanja. Sa obe strane trupa salmonela je izolovana sa 6 trupova, što čini da je 47 od 200 pregledanih briseva sa trupova svinja posle omamljivanja bilo pozitivno. Ovakav nalaz je sličan nalazu koji je ustanovljen od strane Karabasil i sar. (2012b), gde je 46,7% ispitanih trupova svinja bilo pozitivno na prisustvo *Salmonella*

posle omamljivanja. Svakako, opšte je poznato da prisustvo salmonela na trupu može u velikoj meri zavisiti od njenog prisustva u gastrointestinalnom traktu. Pored toga, uticaj može imati i način obrade kao i opšte higijenske mere koje se primenjuju prilikom proizvodnog procesa. Kontaminacija u fazi omamljivanja je ograničena na već prisutnu bakterijsku mikrofloru na samom trupu životinje kao i na mikrofloru koja se može preneti sa površina sa kojima trup dolazi u kontakt. U drugom ispitivanju u Srbiji (Petrović i sar., 2008) ustanovljena je niža prevalencija *Salmonella* u poređenju sa našim rezultatima: na klanici A 1,85%, na klanici B 6,06%, na klanici C 3,7% i na klanici D 1,85%. Viša prevalencija ustanovljena u našem ispitivanju sugerise mogućnost da se veći broj svinja unakrsno kontaminira prilikom procesa klanja. Loša higijenska praksa i neadekvatno rukovanje hranom može rezultovati unakrsnom kontaminacijom u objektima za proizvodnju i preradu mesa (Perez-Rodrigues i sar., 2010). Kada se kontaminirani trupovi obrađuju u klanici, glavni faktori rizika su ne pridržavanje higijenskih mera i principa dezinfekcije (Janković i sar., 2012). Iz tih razloga, higijenske mere moraju biti striktno poštovane. Svakako je da higijena stočnog depoa ima presudni značaj, jer se mikroflora stočnog depoa, preko kože svinje može preneti u samu klanicu. Iz tih razloga vrlo je bitno redovno sprovoditi mehaničko čišćenje, sanitarno pranje i dezinfekciju stočnog depoa. Pored toga na klanje se mogu upućivati samo svinje koje su čiste, odnosno, neophodno je omogućiti pranje svinja pre ulaska u prostor klanice. Na klanici na kojoj je rađeno ovo ispitivanje, pranje svinja je obavljano na koridoru od depoa do samog ulaska u klanicu, što je sigurno imalo uticaja na smanjenje kontaminacije ispitivanih trupova nakon omamljivanja. Međutim, i pored preduzetih mera, kontaminacija trupova salmonelom posle omamljivanja je i dalje bila na značajnom nivou. Na primer, dokazano je da je prisustvo *Salmonella* sedam puta veće kod svinja iz stočnog depoa nego kod istih svinja na farmi (Hurd i sar., 2001a). U eksperimentalnim uslovima svinje mogu biti inficirane *S. Typhimurium* za relativno kratko vreme tokom boravka u kontaminiranim boksevima i ovaj serotip se može izolovati iz fecesa i cecalnog sadržaja 30 do 60 minuta posle izlaganja infektivnom agensu (Hurd i sar., 2001a, 2001b).

Značajno manji broj pozitivnih trupova, ustanovljen posle obrade (2%), a pre hlađenja ukazuje na to da se procedure na liniji klanja posle omamljivanja striktno poštuju. Pojava *Salmonella* na trupovima svinja posle obrade je različita u zavisnosti od

zemlje, te je tako u Italiji 6% (Bonardi i sar., 2003), 0,2% u Švajcarskoj (Sauli i sar., 2003), 5,3% u Velikoj Britaniji (Davis i sar., 2000) i 4,7% u Nemačkoj (Kāshborer i sar., 2000). Naši rezultati ukazuju na značaj primene dobre higijenske i proizvođačke prakse u klanici. Na liniji klanja kritičnu tačku predstavlja postupak evisceracije. Treba imati u vidu činjenicu da se kontaminacija može desiti iako ne postoji vidljiva kontaminacija fecesom. Iz tih razloga, posebna pažnja mora biti posvećena ovoj proceduri. Prilikom evisceracije osim spoljašnje površine trupa, može se desiti kontaminacija unutrašnje strane trupa. Zakonska regulativa EU ne predviđa kontrolu briseva sa unutrašnje strane trupa, ali bi svakako trebalo i to imati na umu tim pre što je u našem ispitivanju uzorkovanje ilealnog sadržaja rezultovalo nalazom 5% pozitivnih uzoraka na prisustvo *Salmonella*. U ovim slučajevima inaparentni nosioci mogu da kontaminiraju površine u stočnom depou i tako da postanu izvor infekcije odnosno kontaminacije za druge životinje. Ovaj rizik se posebno povećava produženim boravkom svinja u stočnom depou (De Busser i sar., 2011).

U postupku evisceracije, naročitu pažnju treba posvetiti odvajanju anusa od samog trupa, jer se pri tom postupku preko noža vrlo lako mogu kontaminirati trupovi prisutnom mikroflorom. Iz tih razloga ovaj posao bi trebalo da bude poveren dobro obučanim radnicima. Pored toga, postoji mogućnost upotrebe i plastičnih kesa koje zatvaraju analni otvor i na taj način se smanjuje rizik od potencijalne kontaminacije. Iako na ispitivanoj klanici nisu korišćene plastične kese za zatvaranje anusa, može se zaključiti da se postupak evisceracije obavljao po principima dobre proizvodne prakse, pa je i procenat kontaminacije trupova bio na relativno niskom nivou. Ustanovljena kontaminacija je najverovatnije poticala iz prethodnih faza proizvodnje, mada je poznato da i šurenje i uklanjanje dlake redukuju broj salmonela čak do 97% (Karabasil i sar., 2008). Poznato je da su salmonele osetljive prema temperaturi višoj od 60°C (Li i sar., 2016). Na klanici gde je sprovedeno ovo ispitivanje temperatura šurenja je bila između 60 i 62 °C, pa se može pretpostaviti da je to imalo velikog značaja u smanjenju kontaminacije trupova. Međutim, ova operacija ne mora uvek da bude efikasna, jer usled oštećenja epitela prilikom šurenja, a potom prilikom uklanjanja dlake u narednoj fazi, može doći do potiskivanja mikroorganizama u subepitelijalno tkivo (Karabasil i sar., 2008). Iako je poznato da su salmonele osetljive prema višim temperaturama, ipak treba imati u vidu da se u tankovima za šurenje salmonele mogu naći u organskom



materijalu (npr. feces) i preživeti proces šurenja (Arguello i sar., 2012). Iz tih razloga ovaj proces može predstavljati kritičnu kontrolnu tačku. Uklanjanje dlake i poliranje trupova nakon šurenja mogu prouzrokovati unakrsnu kontaminaciju pre svega zbog mogućeg izlaska fecesa iz anusa usled povećanog pritiska na sam trup (Smid i sar., 2012). Prilikom sagorevanja zaostalih čekinja mogu preživeti mikroorganizmi koji kasnije prilikom poliranja u mašini za poliranje mogu biti razneseni po celom trupu (Pearce i sar., 2004). Imajući u vidu činjenicu da je opremu vrlo često nemoguće oprati i dezinfikovati do sterilnog stanja, opisani su slučajevi perzistentne kontaminacije opreme za poliranje (Hald i sar., 2003). Ipak neki autori sam proces poliranja ne smatraju značajnom kritičnom tačkom u smislu rekontaminacije (Pearce i sar., 2004).

Ponekad se može desiti da se nakon šurenja sa trupova ne izoluju salmonеле, ali da se izoluju na kraju linije obrade (Gerats, 1990). Ovo ukazuje da postupci evisceracije, rasecanja i druge operacije svakako imaju udela u krajnjoj kontaminaciji trupa. Bakterijska rekontaminacija trupova se smanjuje upotrebom vruće vode (preko 60°C) za pranje opreme na klanicama. Tokom radnog vremena kontaminacija i unakrsna-kontaminacija se ne mogu izbeći (Berends i sar., 1995). Analizom naših rezultata utvrđeno je prisustvo salmonela nakon omamljivanja i nakon završene obrade kod dva trupa u trećoj nedelji ispitivanja, koja se može pripisati gore navedenim uzrocima. Pri unakrsnoj kontaminaciji dolazi do prenosa mikroorganizama sa kontaminiranih površina trupova na one koje nisu kontaminirane prilikom direktnog kontakta, putem vazduha, vode ili površina opreme. Najčešće do unakrsne kontaminacije dolazi usled loše higijene opreme sa kojom trupovi dolaze u kontakt. Međutim, u literaturi nema podataka o uticaju konvejskog sistema na kontaminaciju samih trupova svinja. Pretpostavlja se da su radnici važniji izvor kontaminacije nego oprema koja se koristi za klanje i obradu trupa svinja pošto su ruke, noževi i kanije za noževe mnogo češće i više kontaminirani salmonelama (Gerats, 1990; Berends i sar., 1995). Što se tiče pregleda mesa i zasecanja na trupu, sam čin pregleda bi trebalo da podrazumeva vizuelni pregled, jer patološke promene koje se u današnje vreme sreću na mesu svinja u Evropi praktično nemaju uticaj na zdravlje ljudi već na sam kvalitet mesa (Berends i sar., 1993). Neposredno pre hlađenja trupovi se peru hladnom vodom, što može imati dvojake efekte. Sa jedne strane, uklanja se jedan deo površinske mikroflora. Sa druge strane, postoji mogućnost da se mikroorganizmi prenesu sa jednog mesta na drugo.

Prema istraživanju Mackey i Roberts (1993) pranje trupova vodom nije imalo efekta na smanjenje površinske kontaminacije. Po završenoj obradi na trupu svinja se nalazi oko  $10^2$  do  $10^4$  mezofila. Enterobakterije, koliformi i *E. coli* su česti kontaminanti trupova svinja (Mackey i Roberts, 1993). Ukoliko se na kraju procesa obrade na trupu nalaze salmonele, a nadalje se ne poštuje temperaturni režim hlađenja ispod 7 °C, tada broj salmonela može značajno da poraste (Karabasil i sar., 2008).

U našem ispitivanju posle 24 časa hlađenja salomonele nisu ustanovljene na trupovima. Ovakav nalaz se može objasniti smanjenjem broja salmonela do nedetektabilnog nivoa usled delovanja niske temperature, kao i usled opadanja aktivnosti vode usled strujanja vazduha u komorama za hlađenje. Opseg temperature na kojima je moguć rast *Salmonella* spp. se kreće između 5,2 i 46,2°C, a optimalna temperatura za rast je 35 do 43°C (ICMSF, 1996). *Salmonella* može da preživi na niskim temperaturama, kao i proces zamrzavanja (Jay i sar., 2003). Svakako, održavanje hladnog lanca tokom proizvodnje može da smanji prisustvo *Salmonella* u hrani. Ukoliko temperatura skladištenja nije ispod 7°C, *Salmonella* može da se replikuje u hrani. Za razliku od usitnjenog mesa koje sadrži masti koje mogu da zaštite salmonele od niskih temperatura, koža trupova se vrlo brzo suši, što nadalje nije pogodna sredina za salmonele (Karabasil i sar., 2013). Negativan nalaz na prisustvo salmonela na trupovima je veoma značajan sa aspekta bezbednosti hrane životinjskog porekla i zaštite zdravlja ljudi, a u ovom slučaju ukazuje na to da je temperaturni režim od 0 do 4 °C koji se koristio, uz strujanje vazduha bio odgovarajući i praktično onemogućio izolaciju salmonela nakon hlađenja.

Jedan od glavnih zahteva regulative EU 2073/2005 (Regulativa 2073/2005) jeste da kontaminacija trupova svinja salmonelama mora biti kontrolisana odnosno proverena pre procesa hlađenja. Monitoring može biti sproveden na dva različita koraka u klanici. Najpre, trupovi mogu biti uzorkovani pre hlađenja radi procene higijene procesa tokom klanja u skladu sa ovom regulativom. Potom uzorkovanje može biti sprovedeno posle hlađenja, ali pre rasecanja radi procene ulaska potencijalno kontaminirane hrane u lanac ishrane (EFSA, 2011). Postoji nekoliko istraživanja u kojima je praćeno prisustvo *Salmonella* na trupovima posle hlađenja, i u svim je dokazano značajno smanjenje kontaminiranih trupova (De Busser i sar., 2011; Arguello i sar., 2012). Značajno smanjenje kontaminacije se objašnjava direktnim uticajem niskih temperatura na

bakterijske ćelije, kao i sušenjem površine trupova usled strujanja hladnog vazduha (Arguello i sar., 2012). Međutim, istraživanja Vanantwerpen i sar. (2016) su pokazala da hlađenje ne redukuje broj salmonela pozitivnih trupova, odnosno da hlađenje ne eliminiše prisutne salmonele na trupovima. Ovi autori su poredili metod brisa i metod destrukcije kao načine uzorkovanja sa trupova posle hlađenja, i ustanovili veći broj pozitivnih nalaza metodom destrukcije. Iako se ovim metodom oštećuju trupovi, ovi autori sugerišu upotrebu ovog metoda jer se klasičnim uzorkovanjem briseva, nalazi manji broj salmonela pozitivnih uzoraka u poređenju sa metodom destrukcije. Iz tih razloga su zahtevi Regulative EU 2073/2005 takvi, da se uzorkovanje vrši isključivo pre hlađenja. Vanantwerpen i sar. (2016) objašnjavaju da prilikom hlađenja salmonele i dalje ostaju žive, međutim, usled promene temperature, pH i osmolariteta dolazi najverovatnije do nastanka vrlo čvrste adherencije bakterijskih ćelija i kože koja onemogućava izolaciju salmonela iz klasično uzorkovanih briseva.

Iz izloženog se može videti da kontaminacija svinjskog mesa može nastati u različitim fazama, počev od same farme pa potom u klanici tokom proizvodnje. Svi činiooci u proizvodnji bi trebalo da koriste dobru proizvodnu praksu kako bi se smanjio potencijalni rizik za potrošače. Ukoliko se fokus interesovanja usmeri samo ka klanicama i liniji proizvodnje može se desiti da interventne mere koje se tu preduzimaju ne budu dovoljne za prevazilaženje kontaminacije salmonelom. Isto tako, nepoštovanje dobre proizvodne prakse može rezultirati povećanom kontaminacijom, iako su na farmi preduzimane sve preventivne mere i dobra proizvodna praksa. Iz tih razloga se celokupan proces proizvodnje mora posmatrati kao jedan jedinstveni sistem čiji je cilj dobijanje kvalitetnog i zdravstveno bezbednog mesa sa najnižim mogućim hazardom za potrošača.

Dokazana je povezanost između izolovanih salmonela i broja *Enterobacteriaceae* na trupovima svinja pre hlađenja (Corbellini i sar., 2016). Jedno od najvažnijih mesta za kontaminaciju kože svinja enterobakterijama na liniji klanja je boks za omamljivanje (Avery i sar., 2002). Tehnološka operacija skidanja kože, koja se primenjuje ponekad pri klanju krmača, takođe nosi visok rizik kontaminacije mesa enterobakterijama (Aslam i sar., 2003).

U ovom ispitivanju je ustanovljeno da je prosečan broj *Enterobacteriaceae* bio najmanji nakon hlađenja ( $0,13 \pm 0,05 \log_{10} \text{ CFU/cm}^2$ ), što je statistički signifikantno

manje ( $p < 0,01$ ) od prosečne vrednosti nakon omamljivanja ( $1,79 \pm 0,88 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ) i prosečne vrednosti nakon obrade ( $0,78 \pm 0,46 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ). U ispitivanju Pinto Arrunda i sar. (2004) kod polutki svinja nakon evisceracije i rasecanja utvrđen je prosečno manji broj *Enterobacteriaceae* na trupovima svinja ( $0,55 \pm 1,01 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ), u odnosu na  $0,78 \pm 0,46 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$  u našem ispitivanju. Nešto veće prisustvo enterobakterija ( $1,05 \pm 0,78 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ) je ustanovljeno u ispitivanju Rašeta i sar. (2015) na jednoj klanici u Srbiji.

U jednom ispitivanju u Irskoj broj *Enterobacteriaceae* se kretao od 1,7 do 6,3  $\log_{10} \text{CFU/cm}^2$  tokom uzorkovanja u različitim fazama obrade trupova. Nakon šurenja i opaljivanja uočeno je značajno smanjenje broja *Enterobacteriaceae*, dok je posle poliranja i evisceracije uočeno značajno povećanje. U istom ispitivanju autori naglašavaju da se nakon omamljivanja, iskrvarenja i evisceracije povećava broj enterobakterija usled fekalne unakrsne kontaminacije (Wheatley i sar., 2014). Isti autori su nakon omamljivanja ustanovili 4,1, 3,81 i 3,25  $\log_{10} \text{CFU/cm}^2$  enterobakterija u predelu buta, vilica i stomaka što je značajno više u poređenju sa našim nalazima. Niže vrednosti dobijene u našem ispitivanju, mogu se objasniti boljom higijenom stočnog depoa u kome borave svinje pre klanja, ali i postupkom tuširanja svinja pre samog omamljivanja.

Značajno smanjenje broja enterobakterija nakon hlađenja ustanovljeno je kako u našem ispitivanju tako i u ispitivanju Wheatley i sar., (2014). Međutim apsolutne vrednosti broja enterobakterija bile su veće na trupovima posle hlađenja u ispitivanju Wheatley i sar. (2014) u poređenju sa našim ispitivanjem – na vilicama, stomaku i butu 2,42, 2,68 i 2,04  $\log_{10} \text{CFU/cm}^2$ . Imajući u vidu mikrobiološke kriterijume iz regulative EU Br. 2073/2005, gde se broj enterobakterija manji od 2  $\log_{10} \text{CFU/cm}^2$  smatra prihvatljivim, može se zaključiti da je u našem ispitivanju nakon hlađenja kontaminacija trupova enterobakterijama bila na prihvatljivom nivou (Regulativa EU 2073/2005). Prosečna vrednost enterobakterija posle obrade iznosila je  $0,78 \pm 0,46 \log \text{CFU/cm}^2$  što se prema Vodiču za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu (2011) može smatrati zadovoljavajućim. Ovakvi podaci ukazuju da su u klanici ispoštovani principi dobre higijenske i proizvodne prakse.

U ovom ispitivanju je utvrđeno tri serotipa: *S. Derby*, *S. Infantis* i *S. Typhimurium*. Najčešće je bila izolovana *S. Derby* (90,74 % izolata), potom *S. Infantis* (5,56 % izolata)

i na kraju *S. Typhimurium* (3,7 % izolata). Skoriya istraživanja sprovedena u Srbiji (Karabasil i sar., 2012b) su pokazala prisustvo *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Senftenberg*, *S. Menston* i *S. Bredeney* na trupovima svinja nakon omamljivanja. U zemljama Evropske unije najčešće izolovani serotipovi sa trupova svinja su *S. Typhimurium* (57%), potom *S. Derby* (10,4%), *S. Bovismorbificans* (3,2%), *S. Infantis* (2,9%) i *S. Branderburg* (2%) (Anonymous, 2002). Najčešće izolovani serotipovi *Salmonella* iz svinjskog mesa su: *S. Typhimurium* (37%), *S. Derby* (18%), *S. Infantis* (4%), *S. Enteritidis* (1%) and *S. Anatum* (1%). Poznato je da infekcija sa *S. Typhimurium* može rezultovati dugotrajnim kliconoštvom (Wood i sar., 1991). Ponekad nije moguće ustanoviti kliconoše standardnim bakteriološkim i serološkim metodama dijagnostike, i iz tih razloga latentno inficirane životinje predstavljaju veliki rizik za javno zdravlje. Izolovani serotipovi u ovom ispitivanju pripadaju grupi specijes nespecifičnih serotipova koji mogu kolonizovati digestivni trakt različitih vrsta životinja i ljudi (Fedorka-Cray i sar., 2000). U našem istraživanju, *S. Typhimurim* je izolovana samo iz ilealnog sadržaja, što nas navodi na zaključak da potiče sa farne odakle su svinje dopremljene. U devetoj nedelji ispitivanja *S. Derby* je izolovana iz ilealnog sadržaja, dok je nalaz sa briseva trupa nakon omamljivanja, nakon završene obrade i nakon hlađenja bio negativan. Istraživanja u Kini su pokazala da je najčešći serotip izolovan od svinja na klanici kao i klaničnog okruženja bila *S. Derby* i činila je 52,8% svih izolata. Drugi po učestalosti izolat je bila *S. Meleagridis* (13,4%) a treći *S. Typhimurium* (9,3%). *S. Infantis* je u ovom istraživanju bila ustanovljena u 1,6% ispitanih uzoraka (Li i sar., 2016). U našem ispitivanju *S. Derby* je takođe bila najčešće izolovan serotip. Može se pretpostaviti da ovaj serotip opstaje u uslovima sredine u samoj klanici predstavljajući tako deo rezidentne mikroflore koja može predstavljati rizik za posledičnu kontaminaciju kako svinja pre klanja, tako i zaklanih svinja na liniji klanja. Prema istraživanju Foley i sar., (2008) serotipovi *Derby* i *Typhimurium* predstavljaju najčešće serotipove izolovane od svinja kako iz kliničkih uzoraka tako i sa trupova prilikom kontrole na klanicama. Pored toga, *S. Derby* se često izoluje i od obolelih ljudi od salmoneloze u različitim zemljama (Li i sar., 2016). Prema istraživanju Pires i sar. (2016) najzastupljeniji serotipovi u SAD su *S. Derby*, *S. Agona* i *S. Johannesburg*. Navedeni podaci kao i rezultati našeg istraživanja, ukazuju da se serotip *Derby* sve češće izoluje iz uzoraka poreklom od svinja, pa se tako i u budućnosti može

očekivati porast prevalencije ovog serotipa. Imajući u vidu da se na klanicama u Srbiji vrlo često dovoze svinje iz različitih delova zemlje, a ponekad i svinje iz drugih zemalja prilikom uvoza, može se pretpostaviti da se u samim klanicama i stočnim depoima može stvoriti vrlo raznovrsna populacija kako različitih serotipova salmonela tako i genotipova pojedinog serotipa, koji dalje izazivajući kontaminaciju predstavljaju značajnu opasnost po ljudsko zdravlje.

Različiti antibiotici koji su otkriveni do danas, se koriste kako u humanoj tako i u veterinarskoj medicini. Primeri takvih antibiotika su gentamicin, ampicilin i amoksisicilin. Neki antimikrobni lekovi, kao što su enrofloksacin i flumekvin su razvijeni samo za upotrebu u veterinarskoj medicini. Korišćenje antibiotika kao promotora rasta u intenzivnoj farmskoj proizvodnji svinja i živine imalo je uticaja na razvoj rezistencije kod nekih bakterija. Iz tih razloga je korišćenje promotora rasta zabranjeno u EU od 2006. godine. U našem istraživanju rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih serotipova salmonela na antimikrobne lekove dobijeni E-testom pokazali su rezistenciju prema tetraciklinu. Rezistencija je ustanovljena i prema nalidiksinskoj kiselini (23,3%), ciprofloksacinu (20%), ampicilinu (10%) i hloramfenikolu (14,4%). U drugom ispitivanju sprovedenom u Srbiji, salmonele izolovane sa trupova svinja su pokazale rezistenciju prema amoksisicilinu i sulfametoksazolu (Petrović i sar. 2008). Takođe, postoje podaci o klonalnom širenju *S. Infantis* u Srbiji gde su mutacije na genima za topoizomerazu *gyrA* i *parC* dovele do povećane rezistencije na fluorohinolone (Velhner i sar., 2014). Ispitivanja u Austriji su pokazala rezistenciju različitih serotipova *Salmonella* poreklom iz hrane prema fluorohinolonima u 42%, tetraciklinima 33%, streptomycinu 27% i ampicilinu u 17% uzoraka (Mayrhofer i sar., 2004). Istraživanja u Kini o antimikrobnoj osetljivosti izolata *Salmonella* izolovanih od svinja sa klanice su pokazala rezistenciju prema tetraciklinu kao najučestaliju kod 55,7% izolata, trimetoprim-sulfametoksazolu (22,8%), ampicilinu (20,3%) i nalidiksinskoj kiselini (12,7%) (Li i sar., 2016). Gebreyes i sar. (2002) su otkrili dva najčešća pentarezistentna fenotipa. Prvi je bio rezistentan prema ampicilinu, hloramfenikolu, streptomycinu, sulfametoksazolu i tetraciklinu (AmCmStSuTe fenotip) dominantno pripadnika DT104 fagotipa. Drugi je bio rezistentan prema ampicilinu, kanamicinu, streptomycinu, sulfametoksazolu i tetraciklinu (AmKmStSuTe fenotip) najčešće pripadnika DT193 fagotipa. Postoji takođe trend razvoja multiple rezistencije prema ampicilinu,

hloramfenikolu ili kanamicinu, streptomycinu, sulfonamidima i tetraciklinima kod nekih serotipova u poslednje vreme (Gebreyes et al., 2002), što je delimično potvrđeno i u ovom ispitivanju. Prisustvo patogena koji pokazuju rezistenciju prema određenom antibiotiku u hrani omogućava njihovo širenje preko lanca ishrane na ljude prouzrokujući infekcije. Ustanovljena stopa rezistencije je u skladu sa nalazima i drugih autora (Botteldoorn i sar., 2004). Od ispitanih antimikrobnih lekova u veterinarskoj kliničkoj praksi se naročito često koriste tetraciklini i ampicilin, dok se ciprofloksacin koristi vrlo često u humanoj medicini, a drugi lek iz grupe fluorohinolona, enrofloksacin razvijen je posebno za upotrebu u veterinarskoj medicini. Ovo je posebno značajno, jer je poznato da rezistencija prema jednom antibiotiku iz grupe ponekad može predstavljati i rezistenciju prema čitavoj grupi antibiotika.

Pod dejstvom selektivnog pritiska nametnutog masovnom upotrebom antibiotika u odgoju životinja salmonela razvijaju ili stiču veliki broj gena, kompleksa gena ili mutacija koje izazivaju rezistenciju na antibiotike. Posebnu opasnost predstavljaju multirezistentni sojevi salmonela koji mogu preneti gene rezistencije na antibiotike i na druge vrste mikroorganizama (Vidanović i sar., 2008).

U našem istraživanju *S. Derby* je bila najčešće izolovana, a ustanovljena su dva PFGE profila međusobne sličnosti 98%. Izolati unutar ova dva profila su imali 100% međusobne sličnosti. PFGE se danas smatra važnim metodom molekularne tipizacije salmonela i vrlo značajnim metodom u epidemiološkim ispitivanjima gde praktično predstavlja "zlatni standard" (Villalon i sar., 2011). Kod *S. Infantis* i *S. Typhimurium* utvrđen je jedan profil, kome su pripadala sva tri odnosno četiri izolata. Ovi rezultati ukazuju da izolati imaju vrlo visoku genetsku sličnost sugerišući da su stočni depo kao i vozila za transport svinja primarni izvor kontaminacije salmonelama svinja za klanje. Međutim, neke svinje su bile inficirane najverovatnije još na farmi, s obzirom da je kod pet svinja ustanovljeno prisustvo salmonela u sadržaju ileuma. Pored toga, treba imati u vidu i ispitivanja Hurd i sar. (2001a,b) koja ukazuju da se kod eksperimentalno inficiranih svinja salmonela mogu ustanoviti u digestivnom traktu već 30 do 60 minuta nakon ekspozicije uzročniku.

U pojedinim geografskim regionima obično samo nekoliko serotipova salmonela ima epidemiološki i epizootiološki značaj. Dominantni serovarijete se menjaju tokom vremena i razlikuju se u zavisnosti od zemlje i regije. Zbog toga je izuzetno važna

identifikacija i karakterizacija dominantnih serovara salmonela kod životinja i ljudi, posebno onih koji nose gene rezistencije na određene antibiotike. Zbog dominacije nekih serovarijeteta i fagotipova, kada je potrebno dodatno razdvajanje unutar serovara i fagotipa, koristi se DNK genotipizacija. U slučaju kada je potrebno da se uporede izolati koji su prouzrokovali trovanja ljudi sa izolatima iz hrane ili od životinja, koristi se metoda visoke mogućnosti razdvajanja, kao što je elektroforeza u pulsirajućem polju. Zahvaljujući visokom stepenu razdvajanja, rezultati PFGE omogućavaju da se sa visokim stepenom pouzdanosti donose odluke u sprovođenju epizootioloških i epidemioloških programa rada (Vidanović i sar., 2008).

Poznato je da je *S. Derby* jedan od najčešćih serotipova kod svinja u Evropi i SAD, ubrajajući se u deset najčešćih serotipova izolovanih od obolelih ljudi. *S. Derby* se često izoluje kod svinja i ljudi u Nemačkoj, a kontaminirano svinjsko meso je identifikovano kao mogući izvor prenošenja sa svinja na ljude (Hauser et al., 2011). Za preveniranje ulaska ovog serotipa u lanac ishrane primarne mere uključuju primenu dobre proizvođačke prakse kako na farmi tako i u samoj klanici. Zbog rastuće opasnosti od pojave rezistencije prema antimikrobnim lekovima koja je jednim delom nastala i zbog sve šire upotrebe antibiotika u stočarskoj proizvodnji, kontrola salmoneloznih infekcija u primarnoj proizvodnji i efikasni epidemiološki nadzor moraju biti implementirani radi određivanja potencijalnih puteva širenja infekcije (Valdezate i sar., 2005).



## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. U poređnom analizom vremena boravka svinja u depou i nalaza salmonela na trupovima svinja nije utvrđena korelacija, odnosno veza između dužine boravka svinja u depou i nalaza salmonela na trupovima.
2. Prisustvo *Salmonella* spp. je dokazano na 41% ispitanih trupova svinja nakon omamljivanja, 2% nakon završene obrade, dok nakon hlađenja salmonele nisu dokazane, a u sadržaju ileuma salmonele su dokazane u 5% uzoraka.
3. Najmanji prosečan broj *Enterobacteriaceae*, na trupovima svinja, utvrđen je nakon hlađenja ( $0,13 \pm 0,05 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>), i značajno je manji ( $p < 0,01$ ) od prosečnog broja nakon omamljivanja ( $1,79 \pm 0,88 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>) i nakon završene obrade ( $0,78 \pm 0,46 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>).
4. Tipizacijom izolovanih *Salmonella* spp. najčešće je identifikovan serotip *S. Derby* (90,74%), potom *S. Infantis* (5,56%) i *S. Typhimurium* (3,7%).
5. Profil rezistencije salmonela na antimikrobne lekove poreklom sa briseva trupova i sadržaja ileuma dobijen disk difuzionom metodom pokazao je da su svi ispitivani izolati salmonela bili osetljivi na pet antimikrobnih lekova (ceftazidim, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim, meropenem i gentamicin), a rezistentni na tetraciklin. Kod ostalih antimikrobnih lekova rezistencija se kretala od 7,41% za ampicilin i hloramfenikol, do 12,96% za nalidiksinsku kiselinu.
6. Ispitivanjem osetljivosti izolovanih salmonela na antimikrobne lekove pomoću E-test-a utvrđena je osetljivost na četiri antimikrobna leka (ceftazidim, trimetoprim, meropenem i gentamicin), a rezistencija na tetraciklin. Kod ostalih

antimikrobnih lekova rezistencija se kretala od 10% za ampicilin, 14,4% za hloramfenikol, 20% za ciprofloksacin i 23,3% za nalidiksinsku kiselinu.

7. Genotipizacijom izolata salmonela dobijena su četiri genetska profila. Kod *S. Derby* su utvrđena dva PFGE profila međusobne sličnosti od 98%. Izolati unutar ova dva profila su imali 100% međusobne sličnosti. Kod *S. Infantis* utvrđen je jedan profil, kome su pripadala sva tri izolata, a kod *S. Typhimurium* je utvrđen takođe samo jedan profil kome su pripadala sva četiri izolata.

## 8. SPISAK LITERATURE

1. Ackman DM, Drabkin P, Birkhead G, Cieslak P. Reptile-associated salmonellosis in New York State. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:955–9.
2. AitMhand R, Soukri A, Moustou N, Amarouch H, El Mdaghri N, Sirot D, Benbachir M. Plasmid mediated TEM-3 extended-spectrum beta-lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:169–72.
3. Akiba, M., Nakamura, K., Shinoda, D., Yoshii, N., Ito, H., Uchida, I., Nakazawa, M., 2006. Detection and characterization of variant *Salmonella* genomic island 1s from *Salmonella* Derby isolates. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59, 341–345.
4. Alban, L., and K. Stärk. 2002. Simulating *Salmonella* prevalence from the growing pig to the slaughtered carcass: where should the effort be put to increase food safety?, p. 98–110. In *Proceedings of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine*, Cambridge, United Kingdom.
5. Alcaine, S.D., Warnick, L.D., Wiedmann, M., 2007. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *J. Food Prot.* 70, 780–790.
6. Allen KJ, Poppe C. Phenotypic and genotypic characterization of food animal isolates of *Salmonella* with reduced sensitivity to ciprofloxacin. *Microb Drug Resist* 2002;8:375–83.
7. Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P., Isaacson, R.E., 2003. Type fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infect. Immun.* 71, 6446–6452.
8. Anonymous (2002). Trends and Sources of Zoonotic Agents in Animals, Feedstuffs, Food and Man in the European Union and Norway to the European Commission in accordance with Article 5 of the Directive 92/117/EEC, prepared by the Community Reference Laboratory on the epidemiology of Zoonoses, BgVV, Berlin, Working document SANCO/927/2002, Part 1: 45-122.
9. Arguello, H., A. Carvajal, J.A. Collazos, C. García-Feliz, and P. Rubio. 2012. Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Res. Int.* 45:905-912.
10. Asai, T., Esaki, H., Kojima, A., Ishihara, K., Tamura, Y., Takahashi, T., 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from apparently healthy food-producing animal from 2000 to 2003: the first stage of Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring (JVARM). *J. Vet. Med. Sci.* 68, 881–884.

11. Asai, T., Fujii, S., Osumi, T., Otagiri, Y., Namimatsu, T., Sato, S., 2002. Isolation and serological survey of *Salmonella* in pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1011–1015.
12. Aslam M. F., Nattress G., Greer C., Yost C., McMullen L. G., 2003. Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 2794–2799.
13. Audia, J.P., Webb, C.C., Foster, J.W., 2001. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 97–106.
14. Avery S. M., Small A., Reid C. A., Buncic S., 2002. Pulsed Field-Gel Electrophoresis Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 from hides of Cattle at Slaughter, *Journal of Food Protection*, 63, 1080–1086.
15. Bailey JS, Fedorka-Cray PJ, Stern NJ, Craven SE, Cox NA, Cosby DE. Serotyping and ribotyping of *Salmonella* using restriction enzyme PvuII. *J Food Prot* 2002;65:1005–7.
16. Baraniak, A., Sadowy, E., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., 2002. Two different extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in one of the first ESBL-producing *Salmonella* isolates in Poland. *J.Clin. Microbiol.* 40, 1095–1097.
17. Bell C, Kyriakides A (2002) *Salmonella*: A practical approach to the organism and its control in foods. Blackwell Science, Oxford
18. Bem Z., Adamič J.: Mikrobiologija mesa i proizvoda od mesa, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 1991.
19. Bender JB, Hedberg CW, Boxrud DJ, Besser JM, Wicklund JH, Smith KE, Osterholm MT. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *N Engl J Med* 2001;344:189–95.
20. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:1–4.
21. Berends BR, Burt SA, Snijders JMA. Critical control points in relation to breaking *Salmonella* and *Listeria* cycles in pork production. In: Burt SA and Bauer F (editors), *New Challenges in meat Hygiene: Specific Problems in Cleaning and Disinfecting*. ECCEAMST. Utrecht, The Netherlands 1995: 11-17.
22. Berends BR, Snijders JMA, Van Logtestijn JG. Efficacy of current EC meat inspection procedures and some proposed revisions with respect to microbiology safety: a critical review. *Vet Rec* 1993; 133: 411-5.
23. Berends BR, van Knapen F, Snijders JMA, Mossel DAA (1997) Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella spp.* on pork carcasses. *Int J Food Microbiol* 36: 199–206.
24. Berends, B.R., Van Knapen, F., Mossel, D.A.A., Burt, S.A., Snijders, J.M.A., 1998. Impact on human health of *Salmonella spp.* On pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 219–229.
25. Blaser MJ, Newman LS. A review of human salmonellosis, I. Infective dose. *Rev Infect Dis* 1982; 4: 1096-106.
26. Bollaerts, K., Aerts, M., Ribbens, S., Van Der Stede, Y., Boone, I., Mintiens, K., 2007. Identification of *Salmonella* high risk pig farms in Belgium using semi-parametric quantile regression. In: *Proceedings of the Seventh International Safepork Symposium on the Epidemiology & Control of Foodborne Pathogens in Pork*, May 9–11, Verona, Italy, pp. 31–34.

27. Bonardi S, Brindani F, Piyyin G, Lucidi L, Incau MD, Liebana Morabito S. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and Verocytotoxin Escherichia coli O 157 in pigs at slaughter in Italy. *Int J Food Microbiol* 2003; 85: 101-10.
28. Borch, E., Nesbakken, T., Christensen, H., 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 9–25.
29. Botteldoorn, N., Herman, L., Rijpens, N., et al. (2004) Phenotypic and Molecular Typing of *Salmonella* Strains Reveal Different Contamination Source in Two Commercial Pig Slaughterhouses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5305-5314.
30. Boughton, C., Egan, J., Kelly, G., Markey, B., Leonard, N., 2007. Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella typhimurium*. *Foodborne Pathog. Dis.* 4, 33–40.
31. Boyen, F., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Donne´, E., Morgan, E., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2008. Porcine in vitro and in vivo models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for pigs. *Lab. Anim.*, in press.
32. Boyle, E.C., Bishop, J.L., Grassl, G.A., Finlay, B.B., 2007. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. *J. Bacteriol.* 189, 1489–1495.
33. Brenner FW, McWhorter-Murlin AC. Identification and serotyping of *Salmonella*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1998.
34. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 2000;38:2465–7.
35. Brumme, S., Arnold, T., Sigmarsson, H., Lehmann, J., Scholz, H.C., Hardt, W.D., Hensel, A., Truyen, U., Roesler, U., 2007. Impact of *Salmonella* Typhimurium DT104 virulence factors *invC* and *sseD* on the onset, clinical course, colonization patterns and immune response of porcine salmonellosis. *Vet. Microbiol.* 124, 274–285.
36. Butaye, P., Michael, G.B., Schwarz, S., Barrett, T.J., Brisabois, A., White, D.G., 2006. The clonal spread of multidrug-resistant nontyphi *Salmonella* serotypes. *Microbes Infect.* 8, 1891–1897.
37. Carattoli A, Tosini F, Giles WP, Rupp ME, Hinrichs SH, Angulo FJ, Barrett TJ, Fey PD. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1269–72.
38. Carter, M.E., Quinn, P.J., 2000. *Salmonella* infections in dogs and cats. In: Wray, C., Wray, A. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. CAB International, Wallingford, p. 240.
39. CDC 2012: National Center For Health Statistics. Health, United States, 2012: With Special Feature On Emergency Care. Hyattsville, MD. 2013.
40. Chen, T.H., Wang, Y.C., Chen, Y.T., Yang, C.H., Yeh, K.S., 2006. Serotype occurrence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates recovered from pork carcasses in Taiwan (2000 through 2003). *J. Food Prot.* 69, 674–678.
41. Chiu, C.H., Lin, T.Y., Ou, J.T., 1999. Predictors for extraintestinal infections of non-typhoidal *Salmonella* in patients without AIDS. *Int. J. Clin. Pract.* 53, 161–164.
42. Chiu, C.H., Wu, T.L., Su, L.H., Chu, C., Chia, J.H., Kuo, A.J., Chien, M.S., Lin, T.Y., 2002. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *N. Engl. J. Med.* 346, 413–419.

43. Christensen J, Baggesen D.L., Nielsen B., Stryhn H.: Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish Salmonella Control Program with reference to a pre-implementation study, *Veterinary Microbiology* Volume 88, Issue 2, 25 August 2002, Pages 175–188
44. Chu, C., Chiu, C.H., 2006. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. *Microbes Infect.* 8, 1931–1936.
45. Corbellini Luís Gustavo, Júnior Alfredo Bianco, Costa Eduardo de Freitas, Duarte Ana Sofia Ribeiro, Albuquerque Elenita Ruttscheidt, Kich Jalusa Deon, Cardoso Marisa, Nauta Maarten, 2016. Effect of slaughterhouse and day of sample on the probability of a pig carcass being *Salmonella*-positive according to the Enterobacteriaceae count in the largest Brazilian pork production region, *International Journal of Food Microbiology* 228 (2016) 58–66
46. Daly M, Fanning S. Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4842–8.
47. Daniels NA, MacKinnon L, Rowe SM, Bean NH, Griffin PM, Mead PS. Foodborne disease outbreaks in United States schools. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:623–8.
48. D'Aoust J-Y, Warburton DW, Sewell AM. *Salmonella* Typhimurium phage-type 10 from cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreaks. *J Food Protection* 1985; 48: 1062-6
49. Dauga C, Zabrovskaja A, Grimont PA. Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2835–43.
50. Davies PR, Morrow WE, Jones FT, Deen J, Fedorka-Cray PJ, Harris IT. Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Epidemiol Infect* 1997;119:237–44.
51. Davies, P.R., Scott Hurd, H., Funk, J.A., Fedorka-Cray, P.J., Jones, F.T., 2004. The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enterica* in pork production. *Foodborne Pathog. Dis.* 1, 202–215.
52. Davis R, Paiba G, Evans S, Dalziel B (2000) Surveys for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain. *Vet Rec* 147: 695.
53. De Busser EV, Maes D, Houf K, Dewulf J, Imberechts H, Bertrand S, De Zutter L (2011) Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* 145: 279-286.
54. Dlabac, V., Trebichavsky, I., Rehakova, Z., Hofmanova, B., Splichal, I., Cukrowska, B., 1997. Pathogenicity and protective effect of rough mutants of *Salmonella* species in germ-free piglets. *Infect. Immun.* 65, 5238–5243.
55. Duraković S., Delaš F., Duraković L.: Moderna mikrobiologija namirnica – knjiga prva, Kugler, Zagreb, 2002
56. EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Update of the technical specifications for harmonised reporting of food-borne outbreaks through the European Union reporting system in accordance with Directive 2003/99/EC. *EFSA Journal* 2014;12(3):3598, 25 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3598

57. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013;11(4):3129, 250 pp.
58. EFSA, 2006a. The Second Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2005. [http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring\\_zoonoses/reports/zoonoses\\_report\\_2005.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/zoonoses_report_2005.html).
59. EFSA, 2006b. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to ‘‘Risk assessment and mitigation options of Salmonella in pig production’’. *EFSA J.* 341, 1–131.
60. EFSA, 2008: European Food Safety Authority. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European Commission on a quantitative microbiological risk assessment on Salmonella in meat: source attribution for human salmonellosis from meat. *The EFSA Journal* 2008b; 625: 1-32.
61. EFSA, 2011. Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008-2011. *The EFSA Journal*, 9, 2329.
62. EFSA, 2015: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014, *EFSA Journal* 13: 4329.
63. EUCAST (2015) European Commission on Antimicrobial Susceptibility Testing Standards Institute (Version 5.0).
64. Fedorka-Cray PJ, Gray JT and Wray C (2000) *Salmonella* infections in pigs. In: Wray C, WrayA, editors. *Salmonella* in Domestic Animals. Wallingford: CAB International, 191–207.
65. Fedorka-Cray, P.J., Kelley, L.C., Stabel, T.J., Gray, J.T., Laufer, J.A., 1995. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of Salmonella Typhimurium in swine. *Infect. Immun.* 63, 2658–2664.
66. Foley, S. L., Lynne, A. M., & Nayak, R. (2008). Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*, 86(14 Suppl), E149eE162.
67. Foster, N., Lovell, M.A., Marston, K.L., Hulme, S.D., Frost, A.J., Bland, P., Barrow, P., 2003. Rapid protection of gnotobiotic pigs against experimental salmonellosis following induction of polymorphonuclear leukocytes by avirulent Salmonella enterica. *Infect. Immun.* 71, 2182–2191.
68. Garcia-del Portillo F. Salmonella intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes Infect* 2001;3:1305–11.
69. Gazouli, M., Tzelepi, E., Markogiannakis, A., Legakis, N.J., Tzouveleki, L.S., 1998. Two novel plasmid-mediated cefotaximehydrolyzing beta-lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from Salmonella Typhimurium. *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 289–293.
70. Gebreyes WA, Altier C (2002) Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* 40: 2813–2822.
71. Gebreyes WA, Davies PR, Morrow WE, Funk JA, Altier C. Antimicrobial resistance of Salmonella isolates from swine. *J Clin Microbiol* 2000;38:4633–6.

72. Gebreyes, W.A., Thakur, S., Davies, P.R., Funk, J.A., Altier, C., 2004. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs 1997–2000. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 997–1003.
73. Gerats GEC. Working towards quality, Aspects of quality control and hygiene in the meat industry, Thesis, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands 1990.
74. Gillespie, I., Elson, R., 2005. Successful reduction of human *Salmonella* Enteritidis infection in England and Wales. *Eurosurveillance* 10 (11), In: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/051117.asp#2>.
75. Grimont, P.A.D., Weill, F.H. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur., Paris, France.
76. Groisman EA, Mouslim C. Molecular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis* 2000;13:519–22.
77. Hald, T., Wingstrand, A., Swanenburg, M., von Altrock, A., Thorberg, B.M., 2003. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. *Epidemiol. Infect.* 131, 1187–1203.
78. Hall, E.J., German, A.J., 2005. Diseases of the small intestine. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat*. sixth ed. Elsevier Saunders, St. Louis, p. 1356.
79. Hamilton, D.R., Smith, P., Pointon, A., 2007. National *Salmonella* and *E. coli* monitoring (ESAM) data from Australian pig carcasses from 2000 to 2006. In: *Proceedings of the 7th International Safepork Symposium on the Epidemiology & Control of Foodborne Pathogens in Pork*, May 9–11 Verona, Italy, pp. 129–132.
80. Hanssen, E.J., Swanenburg, M., Maassen, C.B.M., 2007. The dutch *Salmonella* monitoring programme for pigs and some recommendations for control plans in the future. In: *Proceedings of the 7th International Safepork Symposium on the Epidemiology & Control of Foodborne Pathogens in Pork*, May 9–11 Verona, Italy, pp. s169–s172.
81. Hauser E, Hebner F, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Prager R, Schroeter A, Rabsch W, Fruth A, Malorny B (2011) Diversity of *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pig, pork and humans in Germany. *Int J Food Microbiol*, 151: 141-149.
82. Hayward RD, Koronakiss V. Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. *Trends Cell Biol* 2002;12:15–20.
83. Helms, M., et al., 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections 1992–2001. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 859–867.
84. Hickman-Brenner FW, Stubbs AD, Farmer JJ 3rd. Phage typing of *Salmonella* enteritidis in the United States. *J Clin Microbiol* 1991;29:2817–23.
85. Hill, A., England, T., Snary, E., Cook, A., Kelly, L., Evans, S., Wouldridge, M., 2003. A “farm-to-consumption” Risk Assessment for *Salmonella* Typhimurium in Pigs. Department of Risk Research, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge. Ho“ller, H., 1970. Studies on the secretion of the cardiac zone in the pig stomach. *Zentralbl. Veterina`rmed. A* 17, 857–873.
86. Hsu, R.B., Lin, F.Y., Chen, R.J., Hsueh, P.R., Wang, S.S., 2005. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*-infected aortic aneurysms. *Ann. Thorac. Surg.* 80, 530–536.
87. Hueffer, K., Galan, J.E., 2004. *Salmonella*-induced macrophage death: multiple mechanisms, different outcomes. *Cell. Microbiol.* 6, 1019–1025.



88. Hurd HS, Gailey JK, Mc Kean JD, Rostagno MH (2001a) Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment. Berl Muench Tieraerztl Wochenschr 114: 382-384.
89. Hurd HS, Gailey JK, McKean JD, Rostagno MH (2001b) Rapid infection in market – weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium contaminated environment. Am J Vet Res 62: 1194-1197.
90. Hurd HS, McKean JD, Wesley IV, Karriker LA. The effect of lairage on Salmonella isolation from market swine. J Food Protection 2001, 64, 1155-8.
91. ICMSF (1996) Salmonellae. Ch 14 In: Microorganisms in food 5: Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic and Professional, London, p. 217–264
92. Institut za javno zdravlje Srbije (2012) Izveštaj o zaraznim bolestima u 2012. godini na teritoriji Republike Srbije, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, Centar za prevenciju i kontrolu bolesti, Beograd, Maj 2013.
93. Institut za javno zdravlje Srbije, (2015): Zdravstveno statistički godišnjak R. Srbije 2015, Beograd, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut.
94. Isaacs S., Aramini J., Ciebin B., Farrar J.A., Ahmed R., Middleton D., Chandran A.U., Harris L.J., Howes M., Chan E., Pichette A.S., Campbell K., Gupta A., Lior L.Y., Pearce M., Clark C., Rodgers F., Jamieson F., Brophy I., Ellis A., 2005: An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella enteritidis*. J Food Prot., 68(1):191-8
95. Isaacson, R.E., Firkins, L.D., Weigel, R.M., Zuckermann, F.A., DiPietro, J.A., 1999. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella* Typhimurium among experimentally infected pigs. Am. J. Vet. Res. 60, 1155–1158.
96. Janković LJ, Radenković Damjanović B, Karabasil N, Mirilović M, Marić S (2012) Investigations of influence of disinfection procedures on hygiene in private slaughterhouse. Vet glasnik 66: 219-231.
97. Jay LS, Davos D, Dundas M, Frankish E, Lightfoot D (2003) *Salmonella*. In: Hocking AD, editor. Foodborne microorganisms of public health significance. 6th ed, Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch). 207–266
98. Jezdimirović M. 2010. Veterinarska Farmakologija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
99. Jones, S.L., 2004. Inflammatory diseases of the gastrointestinal tract causing diarrhea. In: Reed, S.M., Warwick, M.B., Sellon, D.C. (Eds.), Equine Internal Medicine. second ed. Elsevier Saunders, St. Louis, p. 904.
100. Kantama L, Jayanetra P. *Salmonella enteritidis* outbreak in Thailand: study by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1996; 27:119–25.
101. Karabasil N, Dimitrijević M, Kilibarda N, Galić N, Petrović J (2012a) *Salmonella* serotype prevalence in two pig slaughterhouses. Proceedings of the International Conference: Biological Food safety & Quality, BFSQ 2012, Belgrade, Serbia, 4-5 October 2012, 64-67.
102. Karabasil N, Kilibarda N, Baltić M, Dimitrijević M, Teodorović V. Nalaz salmonela u stočnom depou klanica za svinje. Zbornik kratkih sadržaja. Međunarodno 54. savetovanje industrije mesa, Vrnjačka Banja, 18-20. juni, 2007: 49.

103. Karabasil N, Pavličević N., Galić N, Dimitrijević M, Lončina J, Ivanović J, Baltić M (2012b) *Salmonella* on pig carcasses during slaughter and processing. *Vet glasnik* 66: 377-386.
104. Karabasil N, Teodorović V, Dimitrijević M, Pavličević N, Kureljušić J, Đurić S, Sočo I, Savić Radovanović R (2013) Behavior of *Salmonella* Typhimurium in pork minced meat and pork skin at different storage temperatures. *Acta Vet* 63: 655-663.
105. Karabasil N., Dimitrijević M., Kilibarda N., Teodorović V., Baltić M. Ž. 2008: Značaj salmonela u proizvodnj mesa svinja, *Vet. Glasnik* 62 (5-6): 259-274
106. Karabasil N., Dimitrijević M., Pavličević N., Teodorović V., Lončina J., Nedeljković Trailović J., Baltić M., 2012c, Nalaz salmonela na površinama u stočnom depou i boksu za omamljivanje svinja, *Veterinarski glasnik* 66(3-4): 233-242
107. Kähshbohrer A, Protz D, Helmuth R, Nöckler K, Blaha T, Conraths FJ, Geue L (2000) *Salmonella* in slaughtered pigs of German origin: an epidemiological study. *Eur J Epidemiol* 16: 141-146.
108. Korsak N, Jacob B, Groven B, Etienne G, China B, Ghafir Y, Daube G. *Salmonella* Contamination of Pigs and Pork in an Integrated Pig Production Systems. *J Food Protection* 2003; 66(7): 1126-33.
109. Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental salmonella strains. *J Clin Microbiol* 2002;40:1626–35.
110. Kranker, S., J. Dahl, and A. Wingstrand. 2001. Bacteriological and serological examination and risk factor analysis of *Salmonella* occurrence in sow herds, including risk factors for high *Salmonella* seroprevalence in receiver finisher herds. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.* 114:335–338.
111. Kühnel, K., Blaha, Th., 2004. Investigations on targeted intervention measures for minimizing *Salmonella* cross-contamination during slaughter. In: *Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany*, p. 651.
112. Larsen, S., Sundberg, P., Wagstrom, E., Niekamp, S., Risa, E., 2007. Pork Quality Assurance Plus™ Program. In: *Proceedings of the Seventh International Safepork Symposium on the Epidemiology & Control of Foodborne Pathogens in Pork*, May 9–11 Verona, Italy, pp. 137–139.
113. Larsen, S.T., McKean, J.D., Hurd, H.S., Rostagno, M.H., Griffith, R.W., Wesley, I.V., 2003. Impact of commercial preharvest transportation and holding on the prevalence of *Salmonella enterica* in cull sows. *J. Food Prot.* 66, 1134–1138.
114. Le Minor, L., 1994. The genus *Salmonella*. In: Balloxs, A., Truiper, H.G., Dworkin, M., Harber, W., Scheiffer, H.K. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, New York, pp. 2760–2774.
115. Lehmacher A, Bockemuhl J, Aleksis S. A nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. *J Infect Dis* 1995; 115: 501-11.
116. Lesser CF, Miller SI. *Salmonellosis*. vol. 2003, New York: McGraw-Hill; 2003.
117. Letellier, A., Messier, S., Pare, J., Menard, J., Quessy, S., 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. *Vet. Microbiol.* 67, 299–306.
118. Li Y., Cai Y., Tao J., Kang X., Jiao Y., Guo R., Wang G., Pan Z., Jiao X., 2016: *Salmonella* isolated from the slaughterhouses and correlation with pork contamination in free market, *Food Control*, 59: 591-600

119. Loynachan, A.T., Harris, D.L., 2005. Dose determination for acute Salmonella infection in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2753–2755.
120. Loynachan, A.T., Nugent, J.M., Erdman, M.M., Harris, D.L., 2004. Acute infection of swine by various Salmonella serovars. *J. Food Prot.* 67, 1484–1488.
121. MacDonald KL, Cohen ML, Hargrett-Bean NT, Wells JG, Puhf ND, Collin SF, Blake PA. Changes in antimicrobial resistance of Salmonella isolated from humans in the United States. *JAMA* 1987;258:1496–9.
122. Mackey BM, Roberts TA. Improving slaughter hygiene using HACCP and monitoring. *Fleischwirtschaft International* 1993; 2: 40-5.
123. Mann, J.E., Smith, L., Brashears, M.M., 2004. Validation of time and temperature values as critical limits for Salmonella and background flora growth during the production of fresh ground and boneless pork products. *J. Food Prot.* 67, 1389–1393.
124. MARAN. 2002. Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2002. [www.vwa.nl](http://www.vwa.nl)
125. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2000;2:145–56.
126. Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders F, Hilbert F (2004): Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *Int J of Food Microbiol* 97: 23-29.
127. Merle, R., Schneider, B., Franz, B., Portscht, U., May, T., Blaha, T., Kreienbrock, L., 2007. The serological Salmonella monitoring in German pork production: the structure of the central database and preliminary results of a basic epidemiological report. In: *Proceedings of the 7th International Safepork Symposium on the Epidemiology & Control of Foodborne Pathogens in Pork*, May 9–11 Verona, Italy, pp. 140–144.
128. Miller SI, Pegues DA. Salmonella species, including Salmonella typhi. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 2344–62.
129. Miller, G.Y., Liu, X., McNamara, P.E., Barber, D.A., 2005. Influence of Salmonella in pigs preharvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. *J. Food. Prot.* 68, 1788–1798.
130. Mišić D., Stošić Z., Kiškarolj F., Adamov V., Ašanin R. (2006): Ispitivanje multirezistencije E. coli i Salmonella koje potiču od domaćih životinja na antibiotike i hemioterapeutike, *Vet. Glasnik* 60(1-2): 21-31.
131. Molbak, K., Baggesen, D.L., Aarestrup, F.M., Ebbesen, J.M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A.M., Wegener, H.C., 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium DT104. *N. Engl. J. Med.* 341, 1420–1425.
132. Mossel, D.A.A., Morris, G.P., Struijk, C.B., Cowden, J.M., Browning, L.M., 2003. Providing an adequate supply of microbiologically safe and palatable food and drinking water: contribution of a European vertically integrated approach to educating professionals and consumers-part I. *Food Prot. Trends* 23, 14–23.
133. Mossong, J., Even, J., Huberty-Krau, P., Schneider, F., 2006. Substantial reduction of human Salmonella Enteritidis infections in Luxembourg in 2005. *Eurosurveillance* 11 (1), In: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060119.asp#0>.
134. Nakaya H, Yasuhara A, Yoshimura K, Oshihoi Y, Izumiya H, Watanabe H. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant Salmonella enterica

- typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC*. *Emerg Infect Dis* 2003;9:255–7.
135. Nielsen, B., Alban, L., Stege, H., Sorensen, L.L., Mogelmoose, V., Bagger, J., Dahl, J., Baggesen, D.L., 2001. A new *Salmonella* surveillance and control programme in Danish pig herds and slaughterhouses. *Berl. Munch. Tierarztl.Wochenschr.* 114, 323-326.
  136. NRSS, National Reference Centre for *Salmonella* and *Shigella*. Annual report on *Salmonella* and *Shigella* in Belgium in 2008, Institute of Public Health. Online: <http://www.iph.fgov.be/bacterio/iframes/rapports/2008>.
  137. Oliveira, C.J., Carvalho, L.F., Garcia, T.B., 2006. Experimental airborne transmission of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiol. Infect.* 134, 199–209.
  138. Oliveira, C.J., Garcia, T.B., Carvalho, L.F., Givisiez, P.E., 2007. Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. *Vet. Microbiol.* 125, 355–361.
  139. Padungtod, P., Kaneene, J.B., 2006. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 346–354.
  140. Paulin, S.M., Jagannathan, A., Campbell, J., Wallis, T.S., Stevens, M.P., 2007. Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis in porcine intestinal mucosa and nodes is associated with their differential virulence. *Infect. Immun.* 75, 3950–3960.
  141. Pearce, R.A., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., Harrington, D., 2004. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 331–339.
  142. Pérez-Rodriguez F, Castro R, Posada Izquierdo GD, Valero A, Carrasco E, Garcia Gimeno RM, Zurera G (2010) Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. *Meat Sci* 86: 479-485.
  143. Petrović J, Milanov D, Ratajac R (2008) Contemporary food safety trends: antimicrobial resistance in zoonotic pathogens. *Vet glasnik* 62: 373-382.
  144. Pinto Arrunda C. M., 2004. Swine carcass microbiological evaluation and hazard analysis and critical control points (HACCP) in a slaughterhouse in Minas Gerais, Brazil. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, Caracas*, 24, 1–2, 83–88.
  145. Pires AF., Funk JA., Habing GG., Bolin C., 2016: Phenotypic and genotypic diversity of *Salmonella* in finishing swine, *Foodborne. Pathog. Dis.* 13(4): 182-9
  146. Podolak R, Enache E, Stone W, Black DG, Elliott PH (2010) Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection* 73(10):1919–1936
  147. Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW, Gheesling LL. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 2001;152:907–9.
  148. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 2003;154:173–4.
  149. Poppe, C., Ziebell, K., Martin, L., Allen, K., 2002. Diversity in antimicrobial resistance and other characteristics among *Salmonella* Typhimurium DT104 isolates. *Microb. Drug Resist.* 8, 107–122.

150. Proux, K., Cariolet, R., Fravallo, P., Houdayer, C., Keranflech, A., Madec, F., 2001. Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. *Vet. Res.* 32, 591–600.
151. Public Health England. (2015). Identification of Enterobacteriaceae. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 16 Issue 4. <https://www.gov.uk/uk-standards-formicrobiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>
152. Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschape H, Adams LG, Baumler AJ. *Salmonella* enteric serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun* 2002;70:2249–55.
153. Rahman, H., Reissbrodt, R., Tschape, H., 2000. Effect of norepinephrine on growth of *Salmonella* and its enterotoxin production. *Indian J. Exp. Biol.* 38, 285–286.
154. Rajic, A., Waddell, L.A., Sargeant, J.M., Read, S., Farber, J., Firth, M.J., Chambers, A., 2007. An overview of microbial food safety programs in beef, pork, and poultry from farm to processing in Canada. *J. Food Prot.* 70, 1286–1294.
155. Randall LP, Woodward MJ. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci* 2002;72:87–93.
156. Rankin SC, Aceto H, Cassidy J, Holt J, Young S, Love B, Tewari D, Munro DS, Benson CE. Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella* enterica serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. *J Clin Microbiol* 2002;40:4679–84.
157. Rašeta M., 2014. Učestalost nalaza *Salmonella* spp. na trupovima brojlera i njihov značaj za bezbednost hrane. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd
158. Rašeta Mladen, Teodorović Vlado, Jovanović Jelena, Lakićević Brankica, Branković Lazić Ivana, Vidanović Dejan: Higijena procesa klanja i obrade svinja tokom godinu dana na jednoj klanici u Severnobanatskom okrugu u Srbiji, *Tehnologija mesa* 56 (2015) 1, 26–33
159. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council on additives for use in animal nutrition. *Official Journal L* 268, 18 October 2003, 29–43.
160. Regulativa EC 2160/2003: REGULATION (EC) No 2160/2003 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 November 2003 on the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents
161. Regulativa EU 2073/2005 - Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance)
162. Riber, U., Lind, P., 1999. Interaction between *Salmonella* Typhimurium and phagocytic cells in pigs. Phagocytosis, oxidative burst and killing in polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 259–270.
163. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3: 59–67.
164. Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B. Genotypic characterization of *Salmonella* enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2314–21.

165. Salmon, D.E., Smith, T., 1886. The bacterium of swine plague. Am. Mongr. Microbiol. J. 7, 204.
166. Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ. Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. Microbes Infect 2001;3:1335–44.
167. Sarwari AR, Magder LS, Levine P, McNamara AM, Knowler S, Armstrong GL, Etzel R, Hollingsworth J, Morris JG Jr. Serotype distribution of Salmonella isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. J Infect Dis 2001;183:1295–9.
168. Sauli I, Danuser J, Wenk C, Stärk KD (2003) Evaluation of the Safety Assurance Level for *Salmonella* spp. throughout the Food production Chain in Switzerland. J Food Prot 66: 1139-1145.
169. Scharek, L., Tedin, K., 2007. The porcine immune system—differences compared to man and mouse and possible consequences for infections by Salmonella serovars. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 120, 347–354.
170. Schausser, K., Olsen, J.E., Larsson, L.I., 2004. Immunocytochemical studies of Salmonella Typhimurium invasion of porcine jejuna epithelial cells. J. Med. Microbiol. 53, 691–695.
171. Schausser, K., Olsen, J.E., Larsson, L.I., 2005. Salmonella Typhimurium infection in the porcine intestine: evidence for caspase- 3-dependent and -independent programmed cell death. Histochem. Cell. Biol. 123, 43–50.
172. Schmieger H. Molecular survey of the Salmonella phage typing system of Anderson. J Bacteriol 1999;181: 1630–5.
173. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 1984;37:67–75.
174. Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. Drugs 2002;62:557–66.
175. Selander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Helmuth, R., Rubin, F.A., Kopecko, D.J., Ferris, K., Tall, B.D., Cravioto, A., Musser, J.M., 1990. Evolutionary genetic relationships of clones of Salmonella serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. Infect. Immun. 58, 2262–2275.
176. Shachar D, Yaron S (2006) Heat tolerance of *Salmonella enterica* serovars Agona, Enteritidis, and Typhimurium in peanut butter. Journal of Food Protection 69(11):2687–2691
177. Skibsted U, Baggesen DL, Dessau R, Lisby G. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and phage-typing in the analysis of a hospital outbreak of Salmonella enteritidis. J Hosp Infect 1998;38:207–16.
178. Škrinjar, M. (2001). Mikrobiološka kontrola životnih namirnica, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
179. Smid, J.H., Heres, L., Havelaar, A.H., Pielaat, A., 2012. A biotracing model of Salmonella in the pork production chain. J. Food Prot. 75, 270–280.
180. Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. Curr Opin Microbiol 1999;2:312–6.

181. St Louis ME, Morse DL, Potter ME, DeMelfi TM, Guzewich JJ, Tauxe RV, Blake PA. The emergence of grade A eggs as a major source of Salmonella enteritidis infections. New implications for the control of salmonellosis. JAMA 1988;259:2103–7.
182. Stabel, T.J., Fedorka-Cray, P.J., Gray, J.T., 2002. Neutrophil phagocytosis following inoculation of Salmonella Choleraesuis into swine. Vet. Res. Commun. 26, 103–109.
183. Stjepanović A., Marković B., Vesković Moračanin S., 2007. Molekularno – biološke metode u mikrobiološkoj kontroli mesa i proizvoda od mesa, Tehnologija mesa Vo. 48, No. 1-2, 123-130
184. Stoycheva, M.V., Murdjeva, M.A., 2006. Antimicrobial therapy of salmonellosis—current state and perspectives. Folia Med. (Plovdiv) 48, 5–10.
185. Strawn LK, Danyluk MD (2010) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. International Journal of Food Microbiology 138:78–84
186. Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT (2004) Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* serotypes: A global challenge. Clin Infect Dis 39:546–551.
187. Talavera-Rojas, M., Vazquez-Chagoyan, J.C., Flores-Bello, R., Robles-Gonzalez, F., Lagunas-Bernabe, S., Alonso-Fresan, M.U., 2007. GyrA gene mutations and fluoroquinolone resistance in Salmonella isolates from pigs in central Mexico. Vet.Rec. 160, 630–632.
188. Thakur, S., Tadesse, D.A., Morrow, M., Gebreyes, W.A., 2007. Occurrence of multidrug resistant Salmonella in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. Vet. Microbiol.[Epub ahead of print].
189. Threlfall EJ, Skinner JA, Ward LR. Detection of decreased in vitro susceptibility to ciprofloxacin in Salmonella enterica serotypes Typhi and Paratyphi A. J Antimicrob Chemother 2001;48:740–1.
190. Threlfall, E.J., 2000. Epidemic Salmonella Typhimurium DT 104—a truly international multiresistant clone. J. Antimicrob. Chemother. 46, 7–10.
191. Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., Barlough, J.E., 1988. Hagan and Bruner’s microbiology and infectious diseases of domestic animals. Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY.
192. Tükel, C., Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Akcelik, M., Baumler, A.J., 2006. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver’s seat? FEMS Immunol. Med. Microbiol. 46, 320–329.
193. Turk JR, Fales WH, Maddox C, Miller M, Pace L, Fischer J, Kreeger J, Johnson G, Turnquist S, Ramos JA. Pneumonia associated with Salmonella choleraesuis infection in swine: 99 cases (1987-1990). J Am Vet Med Assoc 1992;201:1615–6.
194. Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D.J., Olsen, J.E., 2000. Host adapted serotypes of Salmonella enterica. Epidemiol. Infect. 125, 229–255.
195. Valdezate S, Vidal A, Herrera-León S, Pozo J, Rubio P, Usera MA, Carvajal A, Echeita MA (2005) *Salmonella* Derby clonal spread from pork. Emerg Infect Dis 11: 694-698.
196. Vanantwerpen G., De Zutter L., Berkvens D., Houf K.: Impact of the sampling method and chilling on the *Salmonella* recovery from pig carcasses International Journal of Food Microbiology Volume 232, 2 September, 2016, Pages 22–25

197. Velhner M, Kozoderović G, Grego E, Galić N, Stojanov I, Jelesić Z, Kehrenberg C (2014) Clonal spread of *Salmonella enterica* serovar Infantis in Serbia: Acquisition of mutations in the topoisomerase Genes *gyrA* and *parC* leads to increased resistance to fluoroquinolones. *Zoonoses Public Health* 61: 364-370.
198. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991;19:6823–31.
199. Vidanović D., Sabo Z, Kilibarda N., Živadinović M., Žarković A., Matović K., 2008: Rezistencija na antibiotike i genotipske karakteristike *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Mbandaka izolovanih od živine, *Vet. glasnik* 62 (5-6) 351 – 358
200. Villalon, P., Valdezate, S., Medina-Pascual, M. J., Rubio, V., Vindel, A., & Saez-Nieto, J. A. (2011). Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 875e882
201. Vo, A.T., van Duijkeren, E., Fluit, A.C., Wannet, W.J., Verbruggen, A.J., Maas, H.M., Gaastra, W., 2006. Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands. *Int. J. Antimicrob. Agents* 28, 172–179.
202. Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede, prvo izdanje, Beograd jun 2011. godine.
203. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4407–14.
204. Wahlström, H., Eriksson, E., Noll, B., Plym Forsell, L., Wierup, M., Wollin, R., 2000. The Swedish control of pig and pork production during 1999. In: 16th IPVS Congress, September 17–21, Melbourne, Australia, p. 215.
205. Wang, Y.C., Yeh, K.S., Chang, C.C., Hsuan, S.L., Chen, T.H., 2006. Fluoroquinolone-resistant *Salmonella* sp. in carcasses. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 351–352.
206. Wheatley P., Giotis S.E., McKeivitt I.A., 2014. Effects of slaughtering operations on carcass contamination in an Irish pork production plant. *Irish Veterinary Journal*, 67, 1–6.
207. White DG, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Chen S, McDermott PF, McDermott S, Wagner DD, Meng J. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. *N Engl J Med* 2001;345:1147–54.
208. WHO, 2003. World Health Organization. The World health report: 2003: shaping the future.
209. Wiedmann M., 2002. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal AOAC International*, Vol. 85, 524-531
210. Wilcock, B.P., Schwartz, K., 1992. Salmonellosis. In: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.E., D’Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Iowa, pp. 570–583.
211. Winn Jr. W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G: *Konemanns Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology*, sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2006.



212. Wood RL, Rose R, Coe NE, Ferris KE (1991) Experimental establishment of persistent infection in swine with a zoonotic strain of *Salmonella* Newport. *Am J Vet Res* 52: 813–819.
213. Wood, R.L., Pospischil, A., Rose, R., 1989. Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1015–1021.
214. Wray, C., and A. Wray., 2000 *Salmonella in Domestic Animals* Wallingford. Oxon. UK:CABI.
215. Yan SS, Pendrak ML, Abela-Ridder B, Punderson JW, Fedorko DP, Foley SL. An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2003; 4: 189-204
216. Zansky S, Wallace B, Schoonmaker-Bopp D, Smith P, Ramsey F, Painter J, Gupta A, Kalluri P, Noviello S. From the Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of multi-drug resistant *Salmonella* Newport–United States, January–April 2002. *JAMA* 2002;288:951–3.
217. Zhao S, White DG, McDermott PF, Friedman S, English L, Ayers S, Meng J, Maurer JJ, Holland R, Walker RD. Identification and expression of cephamycinase bla(CMY) genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3647–50.
218. Zimmerman J. , Karriker L., Ramirez A., Schwartz K., Stevenson G. 2012. *Diseases of Swine* 10<sup>th</sup> edition. Wiley-Blackwell. 680-697; 720-750; 811-821; 821-834.

## 8. PRILOG

### PRILOG A

**Tabela 9.1.** Broj *Enterobacteriaceae* ( $\log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>) u brisevima sa trupova svinja tokom deset nedelja ispitivanja.

Oznaka trupa	Nakon omamljivanja	Nakon završene obrade	Nakon hlađenja
1.	2,65	1,00	0
2.	2,00	1,15	0
3.	2,95	1,05	0,10
4.	3,30	1,15	0
5.	3,00	1,05	0
6.	3,40	1,15	0,20
7.	2,90	1,05	0,10
8.	2,80	1,20	0,10
9.	2,40	1,10	0,10
10.	2,50	1,15	0,15
11.	2,40	0,70	0
12.	2,00	0,60	0
13.	2,90	0,80	0
14.	2,45	0,30	0
15.	2,25	0,75	0
16.	2,75	0,95	0
17.	2,85	1,00	0
18.	2,75	1,15	0,15
19.	2,00	0,60	0
20.	2,25	0,95	0

Oznaka trupa	Nakon omamljivanja	Nakon završene obrade	Nakon hlađenja
21.	2,80	1,35	0,20
22.	2,05	1,05	0,10
23.	3,05	1,20	0,20
24.	2,15	1,05	0,10
25.	2,80	1,25	0,20
26.	3,00	1,60	0,10
27.	3,25	1,90	0,10
28.	3,85	2,20	0,10
29.	3,15	1,80	0,10
30.	3,55	2,15	0,20
31.	2,40	0,85	0
32.	2,15	0,80	0
33.	2,50	1,00	0,10
34.	2,15	0,60	0
35.	2,45	0,85	0
36.	1,95	0,65	0
37.	2,15	0,70	0,10
38.	1,60	0,65	0
39.	2,35	0,95	0
40.	1,65	0,65	0
41.	1,95	0,95	0,10
42.	1,55	0,65	0
43.	1,75	0,75	0
44.	1,20	0,40	0
45.	2,15	0,80	0,10
46.	2,05	0,80	0
47.	1,95	0,70	0
48.	1,60	0,90	0,10
49.	1,85	0,70	0
50.	1,55	0,90	0
51.	1,55	0,70	0
52.	1,55	0,80	0,20
53.	1,80	0,65	0
54.	1,75	0,90	0
55.	1,80	0,50	0
56.	1,20	0,55	0
57.	1,25	0,65	0

Oznaka trupa	Nakon omamljivanja	Nakon završene obrade	Nakon hlađenja
58.	0,95	0,50	0
59.	1,50	0,75	0,20
60.	1,40	0,65	0
61.	0,85	0,20	0
62.	1,25	1,10	0,10
63.	1,40	0,75	0,10
64.	1,15	0,55	0
65.	1,20	0,80	0,20
66.	0,95	0,50	0
67.	0,60	0,30	0
68.	0,95	0,20	0
69.	1,45	0,70	0,10
70.	1,45	0,90	0,10
71.	1,25	0,40	0
72.	1,10	0,15	0
73.	1,15	0,30	0
74.	1,30	0,70	0,20
75.	1,00	0,35	0
76.	1,95	0,90	0,10
77.	2,20	1,05	0,10
78.	2,20	0,85	0,20
79.	2,10	1,10	0
80.	1,75	0,75	0
81.	0,75	0,30	0
82.	0,60	0,25	0
83.	0,70	0,45	0
84.	0,45	0,15	0
85.	0,80	0,30	0
86.	0,90	0,40	0
87.	0,75	0,35	0
88.	0,85	0,35	0
89.	0,80	0,30	0
90.	1,15	0,35	0
91.	0,75	0,30	0
92.	0,60	0,75	0
93.	0,70	0,70	0
94.	0,45	0,55	0

<b>Oznaka trupa</b>	<b>Nakon omamljivanja</b>	<b>Nakon završene obrade</b>	<b>Nakon hlađenja</b>
95.	0,80	0,25	0
96.	0,90	0,20	0
97.	0,75	0,35	0
98.	0,85	0,75	0
99.	0,80	1,15	0
100.	1,15	0,60	0

## **PRILOG B**

### ***Biografija***

Jasna Kureljušić je rođena 11.11.1981. godine u Jelsi na Hvaru. Osnovnu školu, a potom i srednju medicinsku školu završila je u Beogradu. Školske 2000/2001 upisala je prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Tokom studija bila je stipendista Univerzitetske fondacije „Dragoljub Marinković“. Decembra 2008. godine, diplomirala je sa prosečnom ocenom 8,48. Tokom 2009. godine volontirala je na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Školske 2010/2011 upisala je doktorske akademske studije na istom fakultetu. Položila je sve ispite u prediviđenom roku sa prosečnom ocenom 9,27. Od 01. septembra 2010. godine počela je da obavlja pripravnički staž u Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije i marta 2011. godine položila stručni ispit za diplomirane veterinare. Od novembra 2011. godine zaposlena je kao saradnik na odeljenju za ispitivanje namirnica životinjskog porekla u Zavodu za kontrolu hrane i lekova Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije. Učesnik je na projektu evidencionog broja 46009 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“. Redovni je učesnik međunarodnih radionica za salmonelu, *Campylobacter* spp. i *E. coli*. Juna 2016. godine završava užu specijalizaciju iz oblasti mikrobiologija namirnica. Do sada ima objavljena 23 rada od toga 3 sa SCI liste.

## PRILOG 1

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Јасна Курељушић

Број индекса: 15/8

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Фенотипизација, генотипизација и осетљивост на антимикробне лекове

*Salmonella* spp. изолованих са трупова закланих свиња

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## PRILOG 2

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Јасна Курељушић  
Број индекса: 15/8  
Студијски програм: Докторске академске студије  
Наслов рада: Фенотипизација, генотипизација и осетљивост на  
антимикробне лекове *Salmonella* spp. изолованих са  
трупова закраних свиња  
Ментор: Проф. др. Неђељко Карабасил

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## PRILOG 3

### Изјава о коришћењу

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

Фенотипизација, генотипизација и осетљивост на антимикуробне лекове *Salmonella* spp. изолованих са трупова закланих свиња која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_