



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU**

**Molekularna karakterizacija i antimikrobna
osetljivost *Salmonella enterica* podvrste *enterica*
izolovanih od živine sa područja Crne Gore**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Doc.dr Aleksandar Potkonjak

Kandidat:

Mr sci. Irina G Mijatović, dipl.vet.

Novi Sad, 2016.godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR
Identifikacioni broj:
IBR
Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD
Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ
Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR
Ime i prezime autora: mr Irina Mijatović
AU
Mentori: dr Potkonjak Aleksandar, docent
MN
Naslov rada: Molekularna karakterizacija i antimikrobna
NR osetljivost *Salmonella enterica* podvrste
enterica izolovanih od živine sa područja Crne
Gore
Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP
Jezik izvoda: Srpski / engleski
JI
Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP
Uže geografsko područje: Autonomna Pokrajina Vojvodina
UGP
Godina: 2016.
GO
Izdavač: Autorski reprint
IZ
Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8.
MA
Fizički opis rada: 8 poglavlja / 143 stranice / 5 slika / 12 tabela / 4
FO grafikona / 120 referenci /
Naučna oblast: Veterinarska medicina
NO
ČNaučna disciplina: Mikrobiologija
ND
Predmetna odrednica, Salmonella vrste, živina, antibiotici,
ključne reči: rezistencija, molekularna karakarakterizacija,
PO PFGE , PCR
UDK
Čuva se: U biblioteci Poljoprivrednog fakulteta,
ČU Univerziteta u Novom Sadu
21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8.
Važna napomena: Nema
VN

Salmonele su najčešći prouzrokovatori crevnih infekcija kod ljudi i životinja. Široko su rasprostranjene u prirodi a mogu kolonizovati različite domaćine. Posebno su značajne one životinje čije se meso koristi za ishranu ljudi, a koje su i glavni izvor infekcije ljudi. Inficirane životinje ne ispoljavaju simptome i terapija se sprovodi nalazom salmonela prilikom rutinske kontrole zdravstvenog stanja. Posebno, kod ljudi i životinja salmoneloze su značajne i zbog kliconoštva koje može trajati veoma dugo zavisno od starosti inficiranog organizma. Čest su uzrok alimentarnih toksiinfekcija kod ljudi. Duž celog lanca ishrane moguća je i sekundarna kontaminacija salmonelama. Pored rutinskih mikrobioloških analiza u otkrivanju izvora i puteva širenja infekcije koriste se i molekularne metode koje daju precizne podatke o klonalnom poreklu bakterija izolovanih iz obolelih ljudi, namirnica i životinja. Međunarodnom trgovinom hrane isti tipovi bakterija mogu se pojaviti na geografski udaljenim lokacijama. Molekularna karakterizacija *Salmonella* je značajna zbog određivanja raznolikosti sojeva. Potrebno je da se izolati tipiziraju ne samo do nivoa vrste i serotipa nego i preciznije. Tipizacija je bitna za utvrđivanje epidemiološke povezanosti izolata, a genotipizacija podrazumeva direktnu analizu DNK. Geni rezistencije koji se od saprofita mogu preneti na patogene vrste imaju važnu ulogu u pojavljivanju rezistentnih i multirezistentnih sojeva. Međusobni odnos gena rezistencije i upotrebe antimikrobnih sredstava određuje jednačinu rezistencije na antimikrobna sredstva.

Rezistencija predstavlja problem iako je salmoneloza samolimitirajuća infekcija zbog čega se terapija antibioticima primenjuje samo kod dece, starijih ljudi i u slučajevima sistemskih infekcija. Navedena problematika je aktuelna i u Crnoj Gori jer ne postoji stalan monitoring primene antimikrobnih sredstava kod domaćih životinja. Iz navedenih razloga cilj ove doktorske disertacije bilo je utvrđivanje prisustva *Salmonella* vrsta na farmama živine sa tri lokaliteta u Crnoj Gori, izolacija i identifikacija primenom standardnih mikrobioloških metoda, serotipizacija pomoću aglutinacije na predmetnom staklu (*slide agglutination*) uz primenu anti-O i anti-H seruma (Staten Serum Institute, Danska). Primenom standardnih mikrobioloških metoda utvrđeno je prisustvo serovarijeteta *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Tiphymurium. Serovarijeteti *Salmonella* Gallinarum biotip Gallinarum i *Salmonella* Gallinarum biotip Pullorum nisu bile serološki tipizirane. Identifikacija navedenih serovarijeteta je potvrđena metodom multipleks PCR detekcijom amplifikovanih DNK fragmenata u agaroznom gelu. Nakon digestije 50 izolata *Salmonella enterica* podvrste *enterica* odabranih prema lokalitetima i zastupljenosti pomoću *SpeI* restriktionog enzima i njihovom analizom primenom PFGE utvrđeno je 5 različitih *SpeI* pulsotipova. Kod 10% ispitivanih sojeva ustanovljena je rezistencija na tetraciklin i streptomycin. Svi ispitivani serovarijeteti salmonela bili su osetljivi na amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, enrofloksacin, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim,

cefuroksim, ceftriakson i norfloksacin. Vrednosti MIK (minimalnih inhibitornih koncentracija) određenih antibiotika za odabrane sojeve serovarijeteta *Salmonella* Enteritidis primenom aparata VITEK 2 iznosile su za: piperacilin $\leq 4 - 64 \mu\text{g/ml}$ (S - R) , cefuroksim $4 - 32 \mu\text{g/ml}$ (S - R), cefuroksim aksetil $4 - 32 \mu\text{g/ml}$ (S- R), cefiksim $\leq 0,25 - 2 \mu\text{g/ml}$ (S - I), ceftriakson $\leq 1 - 2 \mu\text{g/ml}$ (S - I) i minociklin $\leq 1 - 4 \mu\text{g/ml}$ (S), tetraciklin $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ (S), tigeciklin $\leq 0,5 - 1 \mu\text{g/ml}$ (S), hloramfenikol $\leq 2 - 8 \mu\text{g/ml}$ (S), kolistin $\leq 0,5 - 1 \mu\text{g/ml}$ (S) i sulfametoksazol/trimetoprim $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (S).

Datum prihvatanja teme od strane NNV: 18.05.2016.

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:
(ime i prezime / titula/ zvanje / naziv
organizacije/ status)
KO

Predsednik

Dr Dragica Stojanović, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Mentor:

Dr Aleksandar Potkonjak, docent
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Član:

Dr Maja Velhner, naučni savetnik,
Institut za veterinarstvo „Novi Sad“
Novi Sad

Član:

Dr Dušan Mišić, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet
u Beogradu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monograph documentation
DT
Type of record: Textual printed material
TR
Contents code: Ph.D. Thesis
CC
Author: mr Irina Mijatović
AU
Mentor: Aleksandar Potkonjak, Ph.D. Assistant
MN Professor
Title: Molecular characterization and antimicrobial
TI susceptibility of
Salmonella enterica subspecies *enterica*
isolated from poultry from Montenegro
Serbian
Language of text:
LT
Language of abstract: Serbian / English
LA
Country of publication: Republic of Serbia
CP
Locality of publication: Autonomous Province of Vojvodina
LP
Publication year: 2016
PY
Publisher: Author reprint
PU
Publication place: Republic of Serbia, Novi Sad, Trg Dositeja
PP Obradovića 8.
Physical description: 8 chapters /137 pages / 20 tables / 52 figures
PD / 4 charts / 127 literature quotation /
Scientific field: Veterinary medicine
SF
Scientific discipline: Microbiology
SD
Subject, Key words: Salmonella,poultry, antibiotics, resistance,
SKW molecular characterisation, PFGE,PCR
UDC
Note: None
N

Abstract:
AB

Salmonella is the most common cause of alimentary toxic infections among humans. They have been adapted to a number of warm-blooded animals. The infected animals do not exhibit symptoms and the treatment performs by finding of salmonella in routine health check. The secondary contamination by salmonella is possible in during entire food chain. Apart from the routine microbiological analysis in detection of sources and pathways of spreading the infection, there are also used the molecular methods that provide accurate information about the clonal origin of bacteria isolated from diseased humans, food and animals. During international trade of food, the same types of bacteria can occur in geographically remote locations. Molecular characterization of salmonella is important in determination of diversity of strains. It is necessary isolates to be typified not only to the level of species and serotypes but also more precisely. Typification is essential to determine the epidemiological connection of isolates. Genotyping includes a direct analysis of DNA. The resistance genes that can be transferred from saprophytes to pathogenic microorganisms play an important role in the emergence of resistant and multiresistant strains. The above mentioned is also a current issue in our country because there is a constant monitoring of using of antimicrobials drugs to farm animals. For these reasons, the aim of this dissertation is to examine the serovars of *salmonella* in Montenegro, their molecular characterization using biomolecular methods based on isolation of DNA and subsequent amplification of serovar-specific genes.(multiplex PCR method and FGE), and testing sensitivity, or resistance to antimicrobial drugs used in clinic vet practice.

Accepted
on Scientific Board on:
AS
Defended:
DE
Thesis Defence Board:
DB

15th Mey 2016

President:

Dragica Stojanović, Ph.D. *full professor*
Faculty of Agriculture, Novi Sad

Mentor:

Aleksandar Potkonjak, Ph.D
Assistant Professor
Faculty of Agriculture, Novi Sad,

Member:

Maja Velhner, Ph.D. *principal research fellow* Scientific Veterinary
Institute "Novi Sad"-Novi Sad

Member:

Dušan Mišić Ph.D. *associate professor*
Faculty of Veterinary Medicine
University of Belgrade

ZAHVALNOST

Na ovaj način želela bih da izrazim svoju najiskreniju zahvalnost svima koji su mi pomogli da svoju disertaciju dovedem do kraja.

Zahvalnost prvenstveno dugujem mentoru doc.dr Potkonjak Aleksandru, na vođenju i savetima pri izradi ovog rada, bez čije pomoći, sigurana sam, ovo delo ne bi ugledalo svetlost dana. Najiskrenije se zahvaljujem prof. dr Dragici Stojanović koja mi je pomogla i korisnim savetima uputila me u pravom smeru. Takođe, zahvalnost dugujem dr Maji Velhner, naučnom savetniku i prof. Dr Dušanu Mišiću koji mi je pomagao i davao korisne savete, kao i svim kolegama i saradnicima koji su mi pomogli u analizi i obradi materijala sakupljenog sa terena. Najlepše se zahvaljujem Dr Milanu Kojiću na sugestijama i uloženom vremenu okoizvođenja i tumačenja rezultata dobijenih molekularnim metodama. Iskrenu zahvalnost dugujem mojim kolegama i prijateljima, koji su mi pomagali u sređivanju prikupljenih rezultata tokom istraživanja.

Konačno, posebnu zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima na podršci.

Podgorica jun 2016

Mr Irina Mijatović

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	7
2.1. Istorijat	7
2.2. Morfološke, kulturelne i fiziološke osobine bakterija	8
2.3. Raširenost	9
2.4. Epizootiologija	10
2.5. Patogeneza i patogenost	13
2.6. Ekologija i epidemiologija	14
2.7. Salmonele kod ljudi	15
2.8. Salmonele kod životinja i njihova osetljivost na antibiotike	15
2.9. Salmonele kod ljudi, životinja i iz hrane	17
2.10. Molekularne metode za karakterizaciju Salmonela	29
2.11. Metode za ispitivanje osetljivosti <i>Salmonella</i> vrsta na antibiotike	37
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA	83
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	84
4.1. Materijal	85
4.1.2. Hranljive podloge i reagensi	85
4.2. Metode istraživanja	85
4.2.1. Izolacija, identifikacija i serotipizacija <i>Salmonella</i>	87
4.2.3. Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva	89
4.2.4. Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove izolovanih serovarijeteta <i>Salmonella enterica</i> primenom automatskog sistema VITEK 2 Compact	91

4.2.5. Ispitivanje prisustva beta laktamaza proširenog spektra delovanja primenom ESBL testa.....	92
4.2.6. Ispitivanje izolata <i>Salmonella enterica</i> podvrste <i>enterica</i> molekularnom metodom multipleks PCR	94
4.2.7. Ispitivanje izolata <i>Salmonella enterica</i> podvrste <i>enterica</i> elektroforezom u pulsnom polju (PFGE).....	98
5. REZULTATI ISPITIVANJA	100
5.1. Rezultati izolacije i identifikacije bakterija iz roda <i>Salmonella</i>	
5.2. REZULTATI ISPITIVANJA OSETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE SEROVARIJETETA <i>SALMONELLA</i> IZOLOVANIH OD ŽIVINE PRIMENOM DISK DIFUZIONI METODE.....	109
5.3. Rezultati osetljivosti <i>Salmonella</i> enom Vitek apaprimrata.....	112
5.4. Rezultati ispitivanja prisustva β laktamaza proširenog spektra delovanja kod <i>Salmonella</i> izolovanih od živine.....	112
5.5. Rezultati molekularne karakterizacije <i>Salmonella enterica</i> podvrste <i>enterica</i> dobijeni primenom metode multipleks PCR.....	113
5.6. Rezultati analize izolata <i>Salmonella enterica</i> podvrste <i>enterica</i> dobijeni primenom agar gel elektroforeze u polju jednosmerne struje (PFGE).....	121
6. DISKUSIJA	127
7. ZAKLJUČCI	142
8. SPISAK LITERATURE	144

1. UVOD

Salmonela vrsta ima više od 2600, pripadaju rodu *Salmonella* i familiji *Enterobacteriaceae*. Široko su rasprostranjene u prirodi, sposobne su da kolonizuju brojne domaćine a nalaze se u digestivnom sistemu ptica, reptila i sisara. Na ljude se prenose preko različitih namirnica životinjskog porekla, direktnim kontaktom sa inficiranim životinjama, prljavim rukama, a poslednjih godina i namirnice biljnog porekla (prvenstveno povrće) bile su prenosioci salmonela. Sirovo meso svinja, živine i goveda je obično kontaminirano vrstama salmonela. Incidencija infekcija salmonelama varira i zavisi od vrste životinja (najveća je kod živine a zatim kod svinja), od poljoprivredne prakse i higijenskih standarda tokom klanja i daljeg tretiranja mesa. Infekcije salmonelama se retko javljaju nakon konzumiranja svežeg mesa, a ako do infekcije i dođe to je najčešće zbog upotrebe u ishrani tartar bifteka ili, ređe, sirove kobasice. U većini epidemija izazvanih salmonelama, meso nije dovoljno termički obrađeno ili je kontaminirano nakon kuvanja. Otapanje smrznutog živinskog mesa sa stvaranjem velike količine otopljene tečnosti je posebno opasno. Kuvano meso može biti kontaminirano rukama ljudi koji rukuju hranom, pripremanjem na kontaminiranim površinama i dodavanjem određenih sastojaka nakon kuvanja (želatin koji se dodaje u pite od svinjskog mesa i kao glazura za paštete). Poznato je da salmonele preživljavaju proces fermentacije pa je i fermentisano sirovo meso od koga se prave razni proizvodi, kao što su salame, čest uzrok salmoneloznih epidemija. Tako je u Velikoj Britaniji tokom 1988. godine zabeležena epidemija zbog konzumacije štapića od salame, čiji je uzročnik bila *S.Typhimurium* DT 124. Sirovo mleko takođe može biti kontaminirano salmonelama, zbog toga je u Kaliforniji komercijalna distribucija sirovog mleka

dovela do niza epidemija izazvanih *S. Dublin*, a u Škotskoj, gde su posebno registrovane česte infekcije salmonelama iz mleka, problem rešen uvođenjem obavezne pasterizacije. Opisano je i nekoliko epidemija zbog upotrebe pasterizovanog mleka u ishrani. Najveća epidemija ove vrste je zabeležena 1985. godine u Čikagu, SAD, kada je prijavljeno da je obolelo 16.284 osobe, ali se navodi da je ukupan broj obolelih dostigao 250.000. Ova epidemija se smatra najvećom epidemijom izazvanom salmonelama koja je ikada zabeležena. Kada su u pitanju sirevi u kojima se mogu naći salmonele, najčešće su to sirevi od sirovog mleka. Sladoled, posebno domaći, kao i kolači sa pavlakom su često uzrok epidemija izazvanih ovom bakterijom. Takođe, jaja su često identifikovana kao namirnica kontaminirana ovim mikroorganizmom, bilo da su konzumirana sirova, ili da su upotrebljavana za pripremanje domaćeg majoneza, sladoleda i drugih dezertata. Školjke kontaminirane salmonelama su u nekim zemljama bile veliki problem, zato što su rasle u otpadnim vodama. Ostale namirnice koje su bile izvor epidemija zbog prisustva ove bakterije u njima su: čokolada, pasta, salate i druge. Bolest koju izazivaju *Salmonella* vrste se naziva salmoneloza i kod ljudi se najčešće manifestuje kao gastroenterokolitis, odnosno alimentarne toksiinfekcije, izuzimajući *S. Typhi* koja izaziva tifus i *S. Paratyphi* koja izaziva paratifus.

Ovaj mikroorganizam predstavlja stalan problem kod sirovog živinskog mesa i utvrđen je u čak 70% leševa brojlera. Kao kontaminant penetrira u jaje preko veoma uskih pukotina na ljusci i putem fekalnog zagađenja ljuske, kao i preko infekcije ovarijuma kod kokošaka.

Salmoneloza se klinički manifestuje temperaturom, dijarejom i abdominalnim grčevima. Kod osoba koje boluju od nekih hroničnih bolesti, kao i kod imunokompromitovanih, može dospeti u krv, diseminovati se krvotokom po celom organizmu i izazvati infekciju koja ugrožava život. Salmoneloza je značajna zoonoza koja se može manifestovati i kao teško kliničko oboljenje. Najnovija taksonomska podela salmonela značajna je i zbog toga što su nekada dva

odvojena serovarijeteta Gallinarum i Pullorum, koji su visoko adaptirani na ptice i ne izazivaju bolest kod ljudi, sada preklasifikovani u jedan serovarijetet Gallinarum koji ima dva biotipa: biotip Gallinarum i biotip Pullorum. Biotip Gallinarum je invazivna vrsta, uzročnik tifusa živine, a biotip Pullorum, takođe invazivna vrsta, uzročnik belog proliva pilića. Ova oboljenja imaju izrazito veliki ekonomski značaj u živinarskoj proizvodnji, ali su u većini država iskorenjena zahvaljujući primeni zoohigijenskih mera. Ipak, posmatrano sa aspekta međusobnih asocijacija mikroorganizama, nestanak bipotipa Gallinarum iz mnogih ekoloških niša doveo je do paradoksalnog prodora drugih serovarijeteta, naročito Enteritids, Hadar, Infantis i Senftenberg, koji su danas prisutni u značajno većem procentu kod živine nego pre 30 i više godina.

Dijagnostičko ispitivanje vrši se iz uzorka fecesa i krvi, a od uginulih životinja uzimaju se parenhimatozni organi, brisevi (kloakalni i rektalni) kao i brisevi podova, zidova, pojilica, hranilica, vode, prostirke, kao i delovi pobačenih plodova. Ispitivanje se vrši na osnovu morfoloških, kulturnih i češće fiziološko-biohemijskih osobina. Antigenske karakteristike zasnivaju se na ispitivanju O somatskog antigena izvođenjem testa brze aglutinacije na pločici uz primenu polivalentnih i monovalentnih seruma koji sadrže antitela protiv O, H i Vi antigena. Ono što poslednjih godina predstavlja problem jeste sve veća pojava rezistencije bakterija na antibiotike i danas je na vrhuncu aktuelnosti. Nekada su salmonele smatrane antibiotik predvidivim bakterijama i sve do 1960 godine skoro svi sojvi bili su osetljivi u uslovima *in vitro* na gotovo sve antimikrobne lekove. Već od 1962 godine počinju da se javljaju rezistentni sojevi salmonela kod životinja kojima su antibiotici davani kao faktori rasta, a zatim se javljaju i kod ljudi. Danas je veliki broj serovarijeteta salmonela ne samo rezistentan već i multirezistentan na veći broj antibakterijskih lekova. Multirezistentni sojevi bakterija koji su rezistentni na 5 ili više, čak i sve postojeće antibiotike svakodnevno se umnožavaju i šire dovodeći kod ljudi i životinja do opasnih infekcija koje se ne mogu lečiti antibioticima i najčešće imaju fatalan ishod. Sa druge strane, farmaceutska industrija u poslednjih 20 godina nije proizvela ni jedan novi antibiotik širokog spektra delovanja koji bi bio namenjen za upotrebu,

kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini. Svakako najopasniji oblici rezistencije bakterija na antibiotike pojavili su se u gotovo 100% slučajeva najpre kod pacijenata u bolnicama, kao specifičnim ekološkim nišama u kojima su patogene (i nepatogene) bakterije stalno izložene delovanju velikog broja antibiotika u visokim dozama. Ono što je manje poznato, a duži niz godina stručnjaci upozoravaju na to, jeste činjenica da su farme u veterinarskoj medicini isto što i bolnice u humanoj medicini. Zapravo, na farmama za intenzivan uzgoj životinja se antibiotici upotrebljavaju u mnogo većem obimu nego u bolnicama. Naime, kod ljudi (pa tako i u bolnicama) antibiotici se upotrebljavaju najčešće radi sprovođenja terapije, što podrazumeva davanje antibiotika pojedinačno pacijentima do kliničkog ozdravljenja, a vrlo retko ljudima se antibiotici daju i u profilaktičke svrhe kao jednokratna aplikacija antibiotika. Kada su u pitanju životinje, njima se antibiotici daju zbog nekoliko razloga: Profilaktički (preventivno) i to samo životinjama iz intenzivnog načina uzgoja (na farmama). Kako su životinje iz intenzivnog uzgoja veoma osetljive na stres, a postoji i stalna opasnost od širenja infekcije među životinjama (zoonoze), kada se svim životinjama antibiotici svakodnevno dodaju u hranu i vodu u subterapijskim dozama tokom celog života. Svakako, razlog ovakvom pristupu je i ekonomska računica - u slučaju pojave infekcija na velikim farmama mogu nastati ogromne štete koje se mogu sprečiti svakodnevnom primenom antibiotika. Lečenje infekcija antibioticima se zasniva na principu primene antibiotika na koje su uzročnici osetljivi. Ovo je moguće na osnovu procene najverovatnijih uzročnika i njihove osetljivosti na antibiotike (empirijski) ili, što je još bolje, na osnovu izolacije uzročnika i utvrđivanja njegove *in vitro* osetljivosti na antibiotike (antibiogram). Uobičajeno je da se primenjuje terapija (enrofloksacin, ili bilo koji drugi antibiotik širokog spektra) i vitaminiziranje pilića (kompleks AD₃E vitamina) na samom prijemu, kroz vodu za piće i tri dana po prijemu pilića. U cilju terapije – antibiotik se daje obolelim životinjama ukoliko je u pitanju infektivno oboljenje bakterijske etiologije. U cilju metafilakse – terapijska doza antibiotika daje se i svim ostalim zdravim životinjama na farmi, kako se infekcija sa obolele jedinke ne bi proširila na ostale životinje. Kao promotori rasta – ovaj način upotrebe antibiotika kod životinja je najdiskutabilniji i najsporniji iako ima

za cilj brži prirast i bolju konverziju (manji utrošak) hrane do postizanja željene težine kod tovnih životinja. Izneti podaci ukazuju da životinje od momenta rađanja (ulaska u proizvodnju) do trenutka ekonomskog iskorišćavanja konstanto dobijaju najmanje 2 antibiotika svakog dana, a u pojedinim periodima i do 5 antibiotika dnevno. Ovo je razlog što do pojave multirezistentnih sojeva bakterija na farmama dolazi češće nego u bolnicama ali zbog određenih specifičnosti ovaj se problem više izučava u humanoj medicini. Identifikacija salmonela do roda vrši se primenom standardnih mikrobioloških metoda koje su skupe i dugotrajne (protokol izolacije traje i do 5 dana), a potom sledi identifikacija serovarijeteta primenom metode klasične aglutinacije koja je takođe izrazito skupa zbog primene specifičnih dijagnostičkih seruma. Sa druge strane, klasična aglutinacija na pločici može biti i nespecifična metoda i neretko se dobijaju lažno pozitivni rezultati aglutinacije zbog fenomena unakrsne reaktivnosti, ne samo između različitih serovarijeteta salmonela nego i između pripadnika različitih rodova posebno onih vrsta koje fenotipski i antigenski imaju vrlo sličnu strukturu kao i *Salmonella* vrste (*Proteus*, *Citrobacter*). Drugim rečima, postoji mogućnost da se veliki procenat serovarijeteta metodom aglutinacije pogrešno tipizira i tako onemogućiti precizan epidemiološki uvid u to koji se serovarijeteti salmonela nalaze kod određenih vrsta životinja na određenoj teritoriji. Stoga se u rutinskoj mikrobiološkoj dijagnostici sve češće predlaže da se iz upotrebe izbaci primena klasičnih metoda i pristupi uvođenju brzih molekularnih metoda za preciznu detekciju serovarijeteta salmonela (poput PCR ili elektroforeze u pulsirajućem polju). Molekularna tipizacija *Salmonella* Enteritidis (SE) se preporučuje za određivanje raznolikosti sojeva. Posebno su interesantna ispitivanja razvijanja multipleks PCR metoda kojima se identifikuju serovarijeti i biotipovi salmonela poreklom od živine brzo i jednostavno. Prvu molekularnu tipizaciju i rezistenciju na antibiotike *Salmonella* Enteritidis izolovanih od živine, hrane i ljudi u Srbiji objavili su (G Kozoderović i sar.2011). Podatke o serotipu *S. Enteritidis* po broju izolata u Srbiji iznete 1984. godine, a u niškom regionu njegovu dominaciju 1982. godine prema zvaničničnim godišnjim izveštajima Referentne laboratorije za crevne zaraze o kretanju primoizolata salmonela u Srbiji u preglednom radu

navode (Biljana Miljković-Selimović i sar 2011). U veterinarskoj kliničkoj praksi u Srbiji i Crnoj Gori podaci o ovoj problematici najviše se odnose na salmonele izolovane od domaće živine i u malom procentu od svinja. Na osnovu naših ispitivanja, oko 40% svih salmonela osetljivo je na sve antibiotike. Ostalih 60% rezistentno je na najmanje 3 do najviše 5 antibiotika. U najvećem procentu kod salmonela se javlja rezistencija na ampicilin i tetraciklin. Naročito opasna pojava u epidemiološkom smislu je to da je kod salmonela izolovanih od živine u našoj državi u visokom procentu otkrivena rezistencija na enrofloksacin i ciprofloksacin (preko 50% sojeva salmonela iz grupe koja pokazuje bilo kakav oblik rezistencije).

2. PREGLED LITERATURE

Postoji veliki broj literaturnih podataka koji se bave problematikom vezanom za *Salmonella* vrste, njihovu izolaciju, identifikaciju, molekularnu karakterizaciju i rezistenciju na antimikrobne lekove. Vrste i brojni serovarijeteti iz roda *Salmonella* izazivaju oboljenja kod brojnih vrsta životinja i ljudi poznata kao paratifozna groznica. Kao bolest zoonoznog karaktera salmoneloza kod ljudi se najčešće dovodi u vezu sa konzumiranjem kontaminirane hrane. Smatrali smo da bi odabrani naslovi koji slede doprineli boljem shvatanju i zaokruživanju problematike u ovoj disertaciji.

2.1. Istorijat

Prvi podaci o oboljenjima kod životinja koja su najčešće bila posledica loših zoohigijenskih uslova, potiču iz 1866. godine. Istraživači Salmon i Smith su 1885. godine izneli podatak da je *Bacterium suispestifer* uzročnik kuge svinja, što naravno nije bilo tačno. Autori su toj bakteriji dali ime *Bacterium cholerae suis*. Sedam godina kasnije (1892.) Löffler je izolovao bakteriju iz organa miša koji je oboleo od mišjeg tifoida i nazvao je *Bacterium typhi murium*. de Nobèle i Kaensche, 1888. godine dokazuju da postoji veza između infekcija kod životinja i infekcija kod ljudi. Istraživači Achard i Bensaude (1896) izveštavaju da je grupa tifoidnih bakterija veoma značajna za nastanak infekcija kod ljudi. Mikroorganizam koga su Salmon i Smith izolovali iz svinja, nije uzročnik klasične kuge svinja izveštava 1907 godine Glasser. Jedinstvenu nomenklaturu uspostavio je 1929 godine White da bi je kasnije više puta menjao Kauffmann sa saradnicima. Važeća nomenklatura obuhvata podelu unutar vrste *Salmonella enterica* na pojedine podvrste u okviru kojih se svrstava više od 2600 serovarijeteta .

2.2. Morfološke, kulturelne i fiziološke osobine bakterija iz roda *Salmonella*

Salmonellae pripadaju gram negativnim štapićastim nesporegenim, akapsularnim bakterijama čija se veličina kreće od 2-4 μm x 0-5 μm . Većina *Salmonella* se ubraja u pokretne bakterije zahvaljujući peritrihijalno raspoređenim flagelama izuzimajući serovarijete *S. Galinarum* i *S. Pullorum*. Zahvaljujući pilama adheriraju se na enterocite digestivnog sistema. Salmonelle na hranljivim podlogama rastu aerobno ali mogu da rastu i u anaerobnoj sredini, zbog čega se smatraju fakultativno anaerobnim bakterijama. Karakteriše ih oksidativni i fermentativni tip metabolizma. Zasejane u podlogu sa glukozom stvaraju gas, a sa dekstrozom stvaraju gas i kiselinu, ne razlažu šećer laktozu a za izvor ugljenika koriste citrate. Optimalna temperatura rasta im je 37°C ali mogu da rastu i na temperaturi od 43°C kada se izoluju iz kontaminiranih materijala. Reakcija sa metil crvenim (MR) i produkcija H₂S im je pozitivna, reakcija sa acetil-metil karbinolom ili Voges Proskauer (VP) i indol su negativne a imaju sposobnost da vrše i redukciju nitrata u nitrite. Na standardnim hranljivim podlogama rastu u vidu gustih sivo-belih kolonija sa pravilnim ivicama čija se veličina kreće od 2-4 mm. Za njihovu izolaciju iz kontaminiranih materijala koriste se brojne selektivne i diferencijalne podloge. Od čvrstih podloga to su Brillijant zeleni agar, Endo agar, SS- agar (*Salmonella-Shigella* agar), XLD-agar (ksiloza-lizin-dezoksiholat agar), MacConkey agar, a od polutečnih Wilson-Blair i tečnih hranljivih podloga za obogaćenje: Selenit F bujon, Rappaport-Vassiliadis (RV), tetrinat bujon, dektrozni bujon i drugi.

Prema današnjoj klasifikaciji u rodu *Salmonella* se nalaze tri vrste: *S. enterica*, *S. bongori* i *S. subteranea*. Vrsta *Salmonella enterica* sadrži šest podvrsta koje se razlikuju na osnovu fenotipskih i genotipskih karakteristika: *S. enterica* subspec. *enterica*, *S. enterica* subspec. *arizonae*, *S. enterica* subspec. *diarizonae*, *S. enterica* subspec. *houtenae*, *S. enterica* subspec. *indica* i *S. enterica* subspec. *salamae*. Zahvaljujući velikoj antigenskoj raznovrsnosti (O, H i Vi), salmonelle su svrstane prema Kauffmann-White shemi u serovarijete. U okviru jednog serovarijeteta dalja podela se vrši na osnovu metabolizma različitih šećera,

osetljivosti na bakteriofage, sposobnosti sinteze bakteriocina i rezistencije na antibiotike. Neki serovarijeteti salmonela striktno u adaptirani na jednog domaćina ali većina njih može da parazitira u velikom broju vrsta poput serovarijeteta *S.Typhimurium*. Sojevi *Salmonella* imaju sposobnost da lako razmenjuju svoje ekstrageneske faktore (plazmide) čija veličina varira od 2-200 kb koji sadrže gene odgovorne za virulenciju i za rezistenciju na određene antibiotike i hemioterapeutike. Neadekvatna upotreba antibiotika je značajno uticala na sticanje rezistencije salmonela na hemioterapijska sredstva. Tako je serovarijetet *S.Typhi* rezistentan na većinu antibiotika a osetljiv samo na neke. Multipla rezistencija na antibiotike je zapažena i kod drugih serovarijeteta, od kojih su neki važni patogeni životinja.

2.3. Raširenost

Salmoneloze se javljaju u svim zemljama širom sveta. Postoje značajne razlike u pojavljivanju u odnosu na region i vrstu životinja. Neki serovarijeteti su vezani za određene regione, a neki se nalaze svuda, odnosno ubikvitarni su. Tako na primer serovarijetet *S Sendai* izolovan je na Bliskom Istoku, serovarijetet *S. Berta* u Severnoj Americi, dok su neki ubikvitarni kao *S. Typhimurium*. Sojevi koji pripadaju *S. enterica* subspec. *salamae*, subspec. *arizonae* i subspec. *diarizonae* izolovani su često iz digestivnog sistema hladnokrvnih životinja a retko od ljudi i toplokrvnih životinja. Vrsta *S. bongori* sadrži 21 serotip koji su izolovani iz insekata, riba, amfibija i iz okoline, povremeno iz nekih sisara, a retko mogu biti patogeni i za ljude. Takođe, različit je i značaj pojedinih vrsta životinja u epizootijskom procesu. Smatra se da mali broj vrsta životinja ima značajnu ulogu u epidemiologiji/epizootiologiji salmoneloza.

2.4. Epizootiologija

U odnosu na epizootiologiju i epidemiologiju salmoneloza, značajna je činjenica da su pojedini serovarijeteti bakterija adaptirani na pojedine vrste životinja i čoveka.

U tabeli su navedeni visoko adaptirani serovarijeteti salmonela.

Tabela 2. Adaptirane i neadaptirane salmonele na vrstu životinja.

<i>Salmonele</i>		
<i>Adaptirane</i>	<i>na vrstu</i>	<i>Neadaptirane</i>
S. Abortus equi	Konj	S. Anatum
S. Abortus ovis	Ovca	S. Derby
S. Choleraesuis	Svinja	S. Newport
S. Dublin	Goveda	S. Tennessee
S. Gallinarum	Živina	S. Typhimurium
S. Paratyphi (A, C)	čovek	
S. Pullorum	živina	
S. Typhi	čovek	

Kao intestinalni paraziti, salmonele se nalaze u digestivnom sistemu brojnih vrsta životinja, ptica i ljudi, ali mogu da se izoluju i iz unutrašnjih organa i krvi kičmenjaka. Iako se smatra da ne mogu da se umnožavaju u spoljašnjoj sredini, ove bakterije mogu da se izoluju iz otpadnih voda i tla, a mogu da se nađu i u hranivima, povrću i voću dovodeći do trovanja. Većinom se radi o

ubikvitarnim mikroorganizmima, ali se kod nekih serotipova zapaža adaptiranost na pojedine vrste domaćina. Kao intestinalni paraziti, salmonele se nalaze u digestivnom sistemu brojnih vrsta životinja, ptica i ljudi, ali mogu da se izoluju i iz unutrašnjih organa i krvi kičmenjaka. Iako se smatra da ne mogu da se umnožavaju u spoljašnjoj sredini, ove bakterije mogu da se izoluju iz otpadnih voda i tla, a mogu da se nađu i u hranivima, povrću i voću dovodeći do trovanja. Većinom se radi o ubikvitarnim mikroorganizmima, ali se kod nekih serotipova zapaža adaptiranost na pojedine vrste domaćina. Kao intestinalni paraziti, salmonele se nalaze u digestivnom sistemu brojnih vrsta životinja, ptica i ljudi, ali mogu da se izoluju i iz unutrašnjih organa i krvi kičmenjaka. Iako se smatra da ne mogu da se umnožavaju u spoljašnjoj sredini, ove bakterije mogu da se izoluju iz otpadnih voda i tla, a mogu da se nađu i u hranivima, povrću i voću dovodeći do trovanja. Većinom se radi o ubikvitarnim mikroorganizmima, ali se kod nekih serotipova zapaža adaptiranost na pojedine vrste domaćina. Serovarijete salmonela koji su adaptirani na pojedine vrste životinja, izazivaju takozvane klasične salmoneloze koje karakteriše epizootijsko pojavljivanje i retko izazivanje oboljenja kod drugih vrsta životinja. Međutim, ima izuzetaka kao na primer S. Dublin adaptirana na goveda a javlja se kao izazivač oboljenja i kod svinja i kod ovaca. Od bakterija koje izazivaju oboljenja kod većeg broja životinjskih vrsta kao i čoveka, izdvaja se S. Typhimurium. Pored kliconoša domaćih i divljih životinja, uključujući glodare i ptice, kao rezervoari i izvori salmonela u prirodi javljaju se neživa priroda, kontaminisana stočna hrana, pašnjaci, voda i tako dalje. Ustanovljeno je da i kornjače koje se drže kao kućni ljubimci mogu da budu značajan izvor salmonela. Velika gustina populacije značajno doprinosi lakšem prenošenju bakterija sa izvora na prijemčivu životinju. Golubovi i galebovi mogu da prenose salmonele, a ustanovljeno je da i insekti mogu da budu prenosioci infekcije. Značajan izvor salmonela predstavljaju delovi opreme u industriji, na primer, stočne hrane. Hraniva koja se koriste za ishranu onih vrsta životinja kod kojih je dozvoljena upotreba animalnih proteina, najčešće su kontaminisana salmonelama koje se nalaze u koncentratima i dodacima (mesno, riblje i sojino brašno). Naročitu opasnost za održavanje salmonela i kontaminaciju predstavlja

faza u proizvodnji mesnog i koštanog brašna, kada se termički obrađena masa hladi. U takvim sudovima salmonela mogu da se umnožavaju i kontaminiraju hraniva. S obzirom da se koncentrovana hraniva većim delom uvoze, na taj način se uvoze i serovarijete salmonela koji do tada nisu bili prisutni u datom regionu ili državi.

I čovek može da bude izvor zaraze za životinje (*S. Typhimurium* kod živine). Jedini rezervoar salmonela koje izazivaju tifus i paratifus (*S. Typhi*, *Paratyphi A*, *B* i *C*) je čovek a one su primarno patogene za čoveka.

Fekalno-oralni put je osnovni način prenošenja salmoneloza među životinjama. Međutim, načini održavanja, putevi prenošenja i način zaražavanja mogu da budu daleko složeniji. Na primer, kod ptica primarni izvor zaraze može da bude kontaminisana hrana, pri čemu se u inkubatorima novoizleženi, nezaraženi pilići mogu da zaraze salmonelama koje se nalaze na ljusci kontaminisanih jaja. Određeni procenat inficiranih životinja i ptica, posle preboljenja postaju kliconoše i tako omogućavaju održavanje salmoneloza u populaciji. Ovakve jedinice luče salmonela izmetom a nekada i mlekom. Prijemčiva životinja može da se zarazi i inhalacionim putem, preko konjunktiva i preko tkiva tonzila.

Prijemčive su praktično sve vrste životinja. Neadaptirane salmonela izazivaju oboljenja koja su ograničena na pojedine zatvorene populacije (stada), ali predstavljaju i potencijalnu opasnost za zdravlje ljudi.

Salmoneloze predstavljaju klasičan primer takozvanih eksplozivnih zaraza. To znači da za nastanak oboljenja, poseban značaj imaju starost životinje, kondicija (uhranjenost, stres, napori i graviditet), kvalitet hraniva (velika količina proteina pogoduje nastanku oboljenja), prisustvo nekog drugog oboljenja i invadiranost parazitima.

2.5. Patogeneza i patogenost

Serotipovi salmonela podeljenni su prema oboljenjima koja izazivaju ili prema domaćinima kod kojih izazivaju oboljenja. Tako su striktno adaptirani serotipovi *S. Typhimurium* kod ljudi i *S. Choleraesuis* kod svinja koje mogu izazvati nekoliko sistemskih bolesti kod zdravih odraslih jedinki. Takođe *S. Dublin* je adaptirana na goveda ali može izazvati infekcije i kod manjeg broja drugih životinja. Bolest je često sistemska uključujući reproduktivni sistem gravidnih životinja kao i enteritise kod mladih jedinki. Serovarijeteti poput *S. Typhimurium* uzrokuju enteritis kod različitih vrsta. Prenosnje *Salmonella* je uglavnom feko-oralnim putem ali su moguće infekcije i preko mukoznih membrana, konjunktiva ili respiratornog sistema ().

U najvećem broju slučajeva infekcija nastaje oralnim putem. Salmonele mogu da pasiraju želudac i da neoštećene dospeju do intestinalnog sistema. Salmonele su razvile kompleksne mehanizme modulacije funkcija ćelija domaćina. Ovi mehanizmi omogućavaju bakteriji da uđe i preživi u vakuolama unutar makrofaga i ćelija epitela. Ove intracelularne vakuole su svojim membranama povezane sa ćelijskom opnom. Salmonele poseduju dve grupe gena koji su zaduženi za patogeno delovanje. Ovi geni funkcionišu po principu trećeg tipa sekretornog sistema koji podrazumeva direktnu sekreciju bakterijskih proteina u citosol ćelije, domaćina. Strukturno, sekretorni aparat 3. tipa, sličan je sistemu flagela

Posle ulaska u ćeliju, dolazi do smanjivanja pH vrednosti u vakuoli u kojoj se nalaze bakterije što injicira SPI-2 sekreciju. Kao rezultat, ne dolazi do spajanja vakuole sa lizozomima i endozomima. Štaviše, dolazi do formiranja specifične mebrane koja okružuje bakteriju koja se u tako stvorenoj vakuoli neometano umnožava. Ova osobina razlikuje salmonele od ostalih vrsta intracelularnih bakterija (*Shigella* spp i *Listeria monocytogenes*) koje mogu slobodno da se umnožavaju u citosolu makrofaga.

Patogeneza salmoneloznih infekcija se odigrava u tri faze: 1. kolonizacija distalnih partija tankih creva i kolona, 2. invazija epitela- enterocita creva i 3.

stimulacija izlaska tečnosti. Prva faza je neophodna za nastanak enteralnih infekcija. Kolonizaciju bakterija ometa normalni mikrobiom u crevima. Poremećaj normalnog mikrobioma, usled antimikrobne terapije, promene načina ishrane i žeđ (naročito kod svinja), mogu da izazovu povećanu prijemčivost na enteralnu ili septikemijsku formu oboljenja. Životinje u prvih nekoliko nedelja života su naročito prijemčive na salmonelozne infekcije, zato što još uvek ne poseduju razvijenu mikrofloru u intestinalnom sistemu. Naime, normalna mikroflora ne samo da deluje ometanjem kolonizacije salmonela, već i stimulisanjem peristaltike utiče da se sadržaj creva ravnomerno pomera, što otežava kolonizaciju bakterijama.

Druga faza podrazumeva ulazak salmonela u enterocite u kojima se umnožavaju i prelaze na okolne ćelije i dalje, preko lamina propria, u limfotok i cirkulaciju.

Gubitak tečnosti kod obolelih životinja nastaje kao posledica zapaljenjske reakcije, pri čemu se luče aktivne supstancije koje dovode do gubitka tečnosti, bikarbonata i hlorida. Akutno zapaljenje ileuma i kolona izaziva karakteristične promene u crevima.

Sistemske salmonelle se ponašaju kao fakultativni intracelularni paraziti, a njihovo umnožavanje se odvija u makrofagima jetre i slezine. Razaranjem ćelijskog zida (LPS) salmonela, oslobađa se endotoksin, što dovodi do ispoljavanja simptoma oboljenja kao što su povišena telesna temperatura, krvarenje, smanjenje krvnog pritiska i nastanak šoka. Kod gravidnih životinja, salmonelle prodiru u fetus uzrokujući septikemiju i uginuće.

2.6. Ekologija i epidemiologija

Rezervoari salmonela su digestivni sistem (creva) toplokrvnih i hladnokrvnih životinja koje su glavni supklinički izlučivači. Kod monogastričnih životinja to su kolon i cekum, a kod preživara salmonelle mogu preživeti u spoljašnjoj sredini više od devet meseci i to u zemlji, vodi, fecesu, posebno u mesnom, koštanom i ribljem brašnu.

2.7. *Salmonelle* kod ljudi

Salmonella serovarijeteti *S. Typhi* i *S. Paratyphi* A, B i C, prvenstveno su patogene za čoveka koji je i jedini njihov rezervoar i kod ljudi izazivaju tifus i paratifus. Ostale *salmonelle* mogu izazvati kod čoveka septikemiju, gastroenteritis, različite fokalne infekcije i takođe kliconoštvo. Ovakve infekcije izazvane bilo kojim serotipom poznate su kao zonoze koje se osim oralnim putem, mogu prenositi preko hrane i vode i sa čoveka na čoveka (interhumano).

2.8. *Salmonelle* kod životinja i njihova osetljivost na antibiotike

Uzročnik salmoneloze ljudi u najvećem broju slučajeva je *Salmonella* Enteritidis poreklom od živine. Kako pomenuti serovarijetet *salmonelle* uglavnom ne dovodi do kliničkih simptoma kod inficiranih ptica, terapijski tretman antibioticima se i ne sprovodi, zbog toga nema ni selektivnog pritiska pa se shodno tome i rezistencija na antibiotike retko javlja kod *S. Enteritidis*.

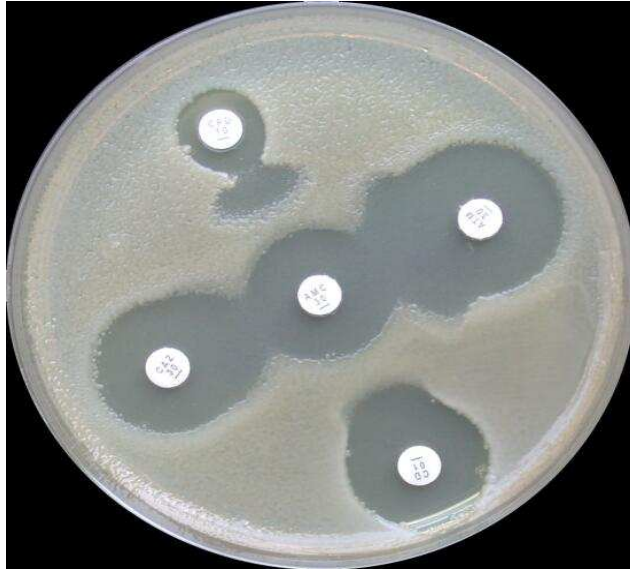
Sporadično se, međutim, javljaju epidemije sojevima *Salmonella* vrsta pojačane virulencije i patogenosti kao što je bio slučaj sa *S. Typhimurium* DT 204 i DT 193 koji su doveli do ozbiljnih kliničkih simptoma, kako kod ljudi, tako i kod životinja, tokom nekoliko epidemija u Evropi i SAD, od 1963. do 1969. godine a potom 1977. i 1980. godine. Iz navedenog razloga, sve inficirane životinje bile su tretirane visokim dozama antibiotika što je dovelo do jakog selektivnog pritiska i nastajanja multirezistentnih sojeva *Salmonella* Typhimurium. Iz fecesa goveda je 1994. godine izolovan još jedan multirezistentni soj *S. Typhimurium* DT 104 koji se putem lanca ishrane proširio na populaciju ljudi i doveo do nekoliko ozbiljnih epidemija skoro istovremeno u Kanadi, SAD i zemljama EU. Soj se karakterisao rezistencijom na ampicilin, hloramfenikol, streptomycin, tetraciklin i kanamicin a rezervoari su bile ovce, koze, svinje, telad, živina pa čak i konji. Zbog nemogućnosti izlječenja ljudi navedenim antibioticima, u terapiji su bili

primenjivani ciprofoloksacin i sulfametoksazol + trimetoprim. Mađutim, došlo je do razvoja rezistencije i na ove antibiotike tako da kada se epidemija proširila na Dansku 1998. godine, nije bilo mogućnosti izlječenja obolelih ljudi antibioticima zbog čega se dogodilo nekoliko smrtnih slučajeva. Ispitivanjem je otkriveno da su rezervoar infekcije u Danskoj bile svinje a *Salmonella* Typhimurium DT 104 se ističe kao jedan od školskih primera posledica upotrebe antibiotika kod životinja kao promotera rasta. Uprkos tome, pojava rezistentnih sojeva salmonela je vrlo retka i ove bakterije se svrstavaju u red „antibiotik predvidivih“ bakterija. Međutim, u poslednjih nekoliko godina, otkriveni su sojevi bakterija sa skrivenim mehanizmom rezistencije tj sojevi koji produkuju beta-laktamaze proširenog spektra delovanja, skraćeno BLPS (ili ESBL od engleskog izraza „extended spectrum beta-lactamases). Ove enzime produkuju bakterije iz familije *Enterobacteriaceae*, najčešće *Klebsiella pneumoniae*, mada su nađene kod gotovo svih enterobakterija uključujući *E.coli* i *Salmonella* vrste.

Sojevi koji produkuju BLPS, otporni su na sve beta-laktamske antibiotike izuzev karbapenema i u nekim slučajevima cefamicina. Pošto se standardnim disk difuzionim testom po Kirby Bauer-u koji se koristi u rutinskom, svakodnevnom ispitivanju osetljivosti bakterija na antibiotike ovaj mehanizam ne može otkriti, predloženo je više pomoćnih metoda za njegovo otkrivanje. Naime, sojevi bakterija koji produkuju BLPS u disk difuzionom testu mogu biti osetljivi na peniciline, cefalosporine i aztreonam dok su u uslovima *in vivo* rezistentni na ove antibiotike. Zbog opasnosti po život pacijenta u slučaju nedetektovanih BLPS, ovaj test ima posebnog značaja u humanoj medicini.

Sojevi BLPS pozitivni proglašavaju se rezistentnim na sve peniciline i cefalosporine uprkos njihovoj eventualnoj osetljivosti na ove antibiotike u disk difuzionom testu. *Salmonella* Enteritidis sojevi poreklom od ljudi i životinja osetljivi su na većinu antibiotika. Naime, uzročnik salmoneloze ljudi u najvećem broju slučajeva je *Salmonella* Enteritidis poreklom od živine. Kako napomenuti soj salmonele uglavnom ne dovodi do kliničkih simptoma kod inficiranih ptica, terapijski tretman antibioticima se ne sprovodi, tako da nema selektivnog pritiska

pa se shodno tome i rezisencija na antibiotike retko javlja kod sojeva *S. Enteritidis*.



Slika 1. Izgled pozitivnog ESBL testa

Produkcija BLPS dokazuje se duplim disk difuzionim testom (ESBL testom) ili takozvanim „produženim antibiogramom“ na osnovu postojanja sinergizma između amoksicilina sa klavulanskom kiselinom i nekog od cefalosporina III generacije, najčešće cefotaksima i ceftazidima. Kada je zona inhibicije oko ceftazidima ili cefotaksima proširena na strani amoksicilina sa klavulanskom kiselinom, zaključuje se da soj produkuje BLPS (slika 1).

2.9. *Salmonelle* kod životinja, ljudi i hrane

Ban B i sar. (2011) ispitivali su u Hrvatskoj salmonelozu kao vodeću bakterijsku infekciju izazvanu hranom. Cilj istraživanja bio je da se utvrdi prevalencija bolesti kod pacijenata prema starosti i polu, najčešće izolovani serotipovi salmonela, dužina kliconoštva i najčešći izvori infekcije. Sprovedena je retrospektivna analiza, a izvori podataka su izvještaji i epidemiološke ankete oboljelih. U periodu 1990-2009, 4492 slučaja salmoneloze je prijavljeno na području Novog Zagreba.

Prosečna prevalenca je 179 / 100.000. Od 2004. godine pa nadalje, salmoneloza je smanjena u zapadnim zemljama Evrope i SAD. U Hrvatskoj i dalje vodeća kada su u pitanju trovanja hranom. Najveća prevalenca je zabeležena kod dece uzrasta od 1 godine (880 / 100.000), zbog slabog imuniteta i niže infektivne doze. U posmatranom periodu (1990-2009), najčešće izolovani serotip je *Salmonella enteritidis* (84%), zatim *Salmonella typhimurium* (7%), *Salmonella virchow* (3%) i *Salmonella hadar* (2%). Postojala je dominacija kod žena (P: P odnos 1,2: 1) u slučajevima salmoneloze. Sve osobe pogođene ovom bolešću su stavljene pod sanitarni nadzor, uključujući bakteriološku kontrolu stolice. Akutno kliconoštvo je zabeleženo u 2557 (57%) ispitanika, dok izlučivanje stolicom salmonela je trajalo duže od 90 dana (hronično kliconoštvo) koje je bilo prisutano u 139 slučajeva. U devet (0,2%) ispitanika, hronično kliconoštvo je posmatrano duže od godinu dana. Tokom kliconoštva, 22,460 uzoraka stolice je ispitivano, tj 5 uzoraka po pacijenta u proseku. Ukupno 1033 (23%) ispitanika je hospitalizovano za 7 dana u proseku, dok je 359 lica ostalo u dnevnoj bolnici (1-2 dana). Više od 3592 (88,4%) ispitanika sa simptomima bolesti prijavljeno je. Salmonela koja je detektovana ispitivanjem kontakata u 413 (9,3%) i kliconoštvo su dokazani u 127 (2,3%) ispitanika koji su testirani za sanitarni sertifikat (vezano za sa sanitarnim nadzor zbog rada sa hranom). Evidentirano je 90% sporadičnih slučajeva i 10% malih epidemija. Najčešći izvor zaraze su jaja (32%), živina (10%) i peciva (10%). Epidemije su uglavnom ograničene na nivou porodica. Salmoneloza je glavni javno zdravstveni i ekonomski problem, kao i problem koji se odnosi na veterinarsku i humanu medicinu. Najbolji i najefikasniji način da se spreči širenje infekcije hranom je smanjenje salmoneloze u populaciji životinja.

Barua H et al. (2013) ispitivali su zaraženu živinu i proizvode od živine, kao glavni izvor salmoneloze širom sveta kod ljudi. Lokalna cirkulacija bilo kojeg pokretnog serotipa salmonela živine i njen transfer kroz trgovinu živine i putovanja ljudi ima širi javni uticaj na zdravlje. Da bi ispitali status pokretnih serovarijeteta salmonela u objektima za uzgoj brojlera u Bangladešu autori su posmatrali više jata iz dva objekta u periodu od šest meseci. Zatim su uradili presek sprovedenog istraživanja da bi utvrdili prisustvo i distribuciju pokretnih

serovarijeteta salmonela slučajnim odabirom 100 komercijalnih brojlera sa živinarske farme. Pet objedinjenih uzoraka fecesa predstavljali su čitavo jato brojlera i ispitivani su na prisustvo pokretnih salmonela konvencionalnim bakteriološkim procedurama. Izolatima salmonela naknadno je utvrđena serotipska pripadnost, a ispitivani su i plazmidski profili elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE). Rezultati su pokazali da su farme bile pozitivne na tri serovarijeteta salmonela: *S. Virchow*, *S. Paratyphi B* varijetet Java (*S. Java*) i *S. Enteritidis*. Od 100 ispitanih brojlera sa farmi jedanaest je bilo pozitivno na pokretne salmonele, sa prevalencijom od 11% (95% sa varijacijama 5-17%). *Salmonella Virchow* i *S. Kentucky* su dva glavna serovara izolovana sa farmi brojlera. Genotipizacija PFGE je pokazala da su izolati koji pripadaju istom serovaru bili usko povezani a varijacije su imali u samo 1-4 benda. Svi izolati *S. Virchow* i *S. Java*, bez obzira na mesto uzorkovanja (objekti za uzgoj ili farme koka nosilja), bili su bez plazmida, osim jednog izolata *S. Virchow* sa farme koka nosilja koji je imao plazmid od 9.7kb. Izolatima *S. Kentucky* pripadala su tri profila plazmida sa četiri različite veličine, u rasponu od 2,7 do 109 kb. Dobijeni rezultati predstavljaju prvi izveštaj o bilo kom serovaru pokretnih salmonela iz objekata za uzgoj i komercijalnih farmi brojlera u Bangladešu.

Karabasil Neđeljko i sar. (2014) izveštavaju da su salmonele i dalje jedan od vodećih uzročnika alimentarnih trovanja. U većini zemalja Evropske Unije, najčešći nalaz kod gastroenteritisa ljudi, čine *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*. Od ostalih serotipova koji se relativno često spominju kao uzročnici alimentarnih trovanja su: *S. Agona*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Newport*, *S. Panama*, *S. Saint-Paul*, *S. Thompson* i *S. Wirchow*. Prema podacima iz Godišnjeg izveštaja Instituta za zaštitu zdravlja Srbije "Dr Milan Jovanović Batut" najzastupljenija je *S. Enteritidis*, koja je u odnosu na ostale serotipove prisutna sa 80 %. Ovi podaci nisu vezani samo za sojeve izolovane iz kliničkog/humanog materijala nego i iz namirnica, radnih površina i dr. Ostali serotipovi imaju značajno manju procentualnu zastupljenost. Na drugom mestu se nalazi *S. Typhimurium*, zatim slede *S. Infantis* i *S. Hadar*, *S. Stanleyville*, *S. Agona*, *S. Tompson*, *S. Virchow*. Poslednjih godina, beleži se veći procenat nalaza *S.*

Infantis kod brojlera. Pregledom fecesa na farmama brojlera ovaj serotip je činio 48,6 % (18/37) od ukupnog broja izolovanih salmonela u 2011. godini, dok je u 2012. g. 46,15 % (18/39) i u 2013. 35,2 % (25/71).

Betancor L et al., (2012) izveštavaju da su Enteritidis i Dublin, serovari *Salmonella enterica*, blisko povezani. Značajno se razlikuju po patogenosti i epidemiologiji. *Salmonella* Enteritidis je serovar prilagođen velikom broju domaćina. Obično izaziva gastroenteritis i retko izaziva invazivne bolesti kod ljudi. *Salmonella* Dublin uglavnom kolonizuje krave, ali infekcija kod ljudi često se manifestuje kao invazivna bolest. Da bi se dobio širi pogled na stepen ovih razlika obavljena je (microarray-based) makro niz uporedna genetička analiza nekoliko izolata i za svaki serotip. Degradacija genoma je u korelaciji sa adaptacijom *Salmonella* na domaćina, pa je takođe upoređena cela genomska skala i dostupne genomske sekvence da bi se ocenilo prisustvo pseudogena u svakom serovaru.

De Knecht LV et al., (2015) su ispitivali pojavu serovarijeta *Salmonella* kod životinja i ljudi poredeći slučajeve salmoneloze kod brojlera, ćurki, svinja, koka nosilja i ljudi tokom putovanja, kao i epidemije u 24 zemalje Evropske Unije. Podaci o salmonelama kod životinja i ljudi, pokrivaju period od 2007. do 2009. godine i uglavnom su dobijeni iz studija i izveštaja objavljenih od strane Evropske agencije za bezbednost hrane. Dostupnost podataka o hrani za potrošnju kao izvoru salmonela iz trgovina i proizvodnje potiče iz Evropskog zavoda za statistiku. Rezultati su pokazali da su koke nosilje najvažniji rezervoar salmoneloze ljudi u Evropi, sa 42.4% (7903 000 slučajeva, 95% interval verodostojnosti 4 181 000-14 510 000) slučajeva, od kojih je 95 9% izazvano *S. Enteritidis*. Autori zaključuju da u Finskoj i Švedskoj glavni ulogu u nastajanju epidemija salmoneloze u većini slučajeva imaju vezana putovanja, a u drugim zemaljama ulogu imaju kokoške ili svinje, imajući u vidu razlike u epidemiologiji salmonela i navike ljudi u ishrani širom Evropske Unije.

Maja Milanović i sar., (2014) izveštavaju da su salmoneloze svrstane u alimentarne toksiinfekcije čiji se uzročnici prenose hranom i u najvećem broju

zemalja su među vodećim pruzrokovateljima trovanja. U Crnoj Gori, salmonelle su još uvek vodeći uzrok alimentarnih toksiinfekcija. Cilj ispitivanja je bio monitoring epidemioloških karakteristika salmoneloze u Crnoj Gori u periodu od 2001. Do 2011. godine. Podaci o obolevanju od salmoneloza su preuzeti iz Godišnjih izvještaja o zaraznim bolestima na teritoriji Crne Gore, koje publikuje Institut za javno zdravlje Crne Gore. U posmatranom vremenskom periodu bilježi se trend porasta incidencije salmoneloza na području Crne Gore. Salmoneloze se javljaju tokom čitave godine pokazujući sezonske varijacije. Na osnovu dobijenih rezultata autori su zaključili da su salmoneloze značajan ne samo javnozdravstveni, veterinarski i problem kliničke medicine već i značajan ekonomski problem. Potrebno je intenzivnije sprovoditi mere prevencije i suzbijanja salmoneloza, što podrazumijeva i bolju saradnju svih subjekata koji učestvuju u proizvodnji, pripremi i distribuciji hrane.

Papadopoulos T et al. (2016) proučavali su epidemiologiju *Salmonella enterica* serovar Enteritidis u Grčkoj, tako što su upoređivali izolate iz hrane i hrane za životinje sa kliničkim izolatima, u periodu od 3 godine. Upoređivanjem dobijenih rezultata sa bazom podataka PNE (Pulse Net Europe) želeli su da utvrde prijemčivost stanovništva na ovaj serotip i moguće veze sa evropskim sojevima. Autori su ispitali 168 serovarijeteta *S. Enteritidis* poreklom od ljudi, životinja i hrane, izolovanih u periodu 2008-2010 u Grčkoj. Sojevi su okarakterisani fenotipski (antibiorezistencija) i molekularno elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE) i tipiziranjem multilokus sekvenci (MLST). Metodom PFGE je utvrđeno 39 XbaI, 48 BlnI i 80 XbaI-BlnI različitih pulsotipova, što ukazuje na nekoliko klonova koji kruže kroz lanac ishrane i da potiču iz više izvora. Upoređivanjem sa bazom podataka PNE autori su utvrdili da je profil SENTXB.0001 najčešći profil PFGE u Evropi i da isti preovladava u Grčkoj (33,3%). Metodom tipiziranja sekvenci (MLST) autori su, takođe utvrdili da svi ispitivani sojevi pripadaju istoj sekvenci (ST11), koja predstavlja najčešći ST u Evropi. Otkrivena je visoka rezistencija na nalidiksinsku kiselinu kod izolata poreklom od ljudi i izolata od živine (~ 25%), što ukazuje na neuspešno lečenje fluorohinolonskim preparatima. Podaci prikupljeni tokom ovog istraživanja

pokazali su da sojevi *S. Enteritidis* koji cirkulišu u Grčkoj kroz lanac ishrane potiču iz više rezervoara. Dominantni profili u Grčkoj se poklapaju sa profilima baze PNE, što ukazuje na sličnosti između serovarijeteta *S. Enteritidis* u Grčkoj i u Evropi.

Pavlović N i sar. (2014) ispitivali su dokaze o povezanosti hrane i zaražavanje salmonelama u epidemijom javljanju salmoneloza na teritoriji Beograda za period 2011-2013.godine. U periodu od 2011. do 2013.godine u Beogradu je registrovano 112 alimentarnih epidemija, od kojih je 90 (80,4%) bilo epidemija salmoneloza. U tim epidemijama obolelo je 685 osoba, što je u odnosu na ukupno 1395 prijavljenih slučajeva u istom periodu činilo 49,1% svih obolelih od ove alimentarne toksiinfekcije. Najčešće mesto izloženosti obolelih u registrovanim epidemijama bila su individualna domaćinstva sa učešćem od 85,6%, a daleko ređe različite vrste kolektiva u kojima je zajedničko za obolele bilo pripremanje i/ili konzumiranje obroka. U 54,4% registrovanih epidemija salmoneloze nije utvrđena namirnica koja je bila put prenosa uzročnika oboljenja. Najčešće inkriminisane namirnice za nastanak epidemije bile su torte i kolači (22,2%), jaja (8,9%) i pečena piletina (4,4%). U odnosu na dokaze o jačini povezanosti hrane sa nastankom epidemije salmoneloze u Beogradu od 2011. do 2013. godine, u nešto više od jedne trećine salmoneloza (34,4%) utvrđeni su čvrsti dokazi. Prema podacima o epidemijama sa čvrstim dokazima o povezanosti hrane, kao puta prenosa salmonela najčešće su registrovane torte i kolači (48,4%), jaja (12,9%) i pečena piletina (9,7%). Dobijeni podaci se koriste za procenu situacije, kontrolu efikasnosti sprovedenih mera i planiranje potrebnih aktivnosti i preventivnih programa (EFSA and ECDC, 2007.). Prema najnovijim podacima u izveštaju za 2012. godinu, u zemljama EU prijavljeno je 5363 alimentarne epidemije od kojih su 1533 epidemije salmoneloza.

Ivic-Kolevska S i Kocić B.,(2009) su ispitivali kontaminaciju prehrambenih proizvoda salmonelama sa tržišta hrane u Makedoniji i procenu najčešće kontaminirane hrane, kao i najčešće izolovanog serotipa salmonela. Autori su sprovedli retrospektivnu studiju analiziranja podataka iz nacionalne baze podataka

za mikrobiološku ispravnost prehrambenih proizvoda za period od 2003. do 2005. godine, kao i prospektivnu studiju za 2006. i 2007. Izolacija i identifikacija *Salmonella* spp. vršena je u Laboratoriji za sanitarnu mikrobiologiju Republičkog zavoda za zaštitu zdravlja u Skoplju, Makedonija. Svi uzorci su testirani korišćenjem horizontalne metode za detekciju *Salmonella* spp, prema ISO 6579: 2002. tj dve imunološke metode: Singlepath i VIDAS *Salmonella* spp u hrani. Prisustvo *Salmonella* spp je 0.04-0.06% za period 2003-2005, 0.63% u 2006. godini, a 0,39% u 2007. godini U periodu od 2003. do 2005. godine, *Salmonella* spp je najčešće izolovana iz mesa i mesnih proizvoda (75%), zatim mleka i mlečnih proizvoda. U 2006. i 2007. godini, najčešće kontaminirani prehrambeni proizvodi su mehanički odvojeno pileće meso (71% u 2006. i 75% u 2007. godini). Najčešća serogrupa *Salmonella* spp u 2006. godini C (1) (47%), zatim grupe B, D (17,6%) i F (11,7%). U 2007. godini, najčešće serogrupe *Salmonella* spp bile su C (1) (50%), zatim D (20%), E (3) (15%) i B (10%). Dokazan je rastući trend u nivou kontaminacije prehrambenih proizvoda sa *Salmonella* spp., naročito u periodu 2006. i 2007., u kojem su najčešće kontaminirani prehrambeni proizvodi bili mehanički odvojeno pileće meso, mleko, mlečni proizvodi i slatkiši, a najčešći izolati pripadali su serograpi C (1).

The European Union summary report (2015). U ovom revidiranom izveštaju ažurirani su podaci koje su dostavile Rumunija, Irska, Portugal i Njemačka tokom 2015. Podaci se odnose na nalaz *Salmonella* kod živine u Rumuniji. Kao i prethodnih godina dva najrasprostranjenija serovara salmonele su bila *S. Enteritidis* i *S Typhimurium* čineći 39,5% odnosno 20,2% svih salmonela potvrđenih u humanoj populaciji. *Salmonella* Enteritidis je nastavila da pada sa 4720 manje slučajeva prijavljenih u EU tokom 2013 nego u 2012 godini. U dvogodišnjem periodu od 2011 do 2013, broj slučajeva *S.Typhimurium*, uključujući varijetet monofaznu *S.Typhimurium* 1,4,(5),12:i:-, je smanjen za 11,1%. Broj slučajeva *S.Infantis* koji je četvrti najčešći serovar je porastao za 26,5%. Zapaženo je povećanje u 2013 kad je u pitanju *S Derby*, peti najčešći serovar bi se mogao djelimično objasniti lokalnom epidemijom u jednoj članici EU. Dalje smanjenje prevalencije ciljnih serovarijeteta salmonela je zapaženo u

svim populacijama živine. Štaviše, broj zemalja koje ispunjavaju ovaj cilj smanjenja prevalencije u 2013 se povećao u odnosu na 2012; posebno, sve zemlje su postigle cilj kada su u pitanju jata nosilja i priplodna jata ćuraka. Tako su 22 članice ispunile cilj smanjenja salmonela od $\leq 1\%$ postavljen za priplodna jata kokošaka na nivou EU od 0,6%. Kada su u pitanju jata nosilja sve članice u EU su ispunile svoje ciljeve po pitanju smanjenja i prevalencije serovarijeteta (*S.Enteritidis* i *S.Typhimurium*) sa 1,3% u 2012 na 1,0% u 2013. U jatima brojlera 26 članica je ispunilo zadati cilj smanjenja od $\leq 1\%$ za dva serovara (*S.Enteritidis* i *S.Typhimurium*) pa je prevalencija za ciljne serovare bila 0,2% u poređenju sa 0,3% u 2012. Za ćurke je bio isti cilj kao i za brojlere i svih 14 članica koje su dostavile podatke za priplodna jata ćuraka su ispunile cilj sa konačnom prevalencijom od 0,3% za dva ciljna serovara (0,5% u 2012). Pored toga 21 članica je ispunila cilj smanjenja prisustva salmonela za jata tovnih ćuraka prije klanja. Na evropskom nivou 0,2% tovnih jata ćuraka je bilo inficirano sa dva ciljna serovara (0,4% u 2012). Izveštaji su takođe sadržavali nalaz salmonela kod drugih životinjskih vrsta kao što su: patke, guske, svinje, goveda, ovce i koze.

Ukupni nivo kontaminacije hrane životinjskog ili biljnog porekla salmonelama u 2013. godini je bio nizak (1,4%). Najviše pozitivnih uzoraka u pojedinačnim istraživanjima je bilo u kategoriji hrane „Materijal za hranu od sjemena uljarica ili poreklom od voća“, uglavnom od sjemena repe, soje, suncokreta i pamuka. U složenim hranivima kao na primjer, kompletnoj hrani za životinje ukupan iznos pozitivnih nalaza na salmonelu u 2013. je bio nizak za sve populacije životinja: 1,8% od 1091 testiranih uzoraka od goveda, 1,5% od 1590 testiranih uzoraka od svinja i 1,9% od 2551 testiranih uzoraka od živine

Najčešće izolovani serovar u 2013. godini od kokošaka (*Gallus gallus*) bila je *S. Infantis*; u mesu brojlera najčešći serovari su bili *S. Infantis* i *S. Enteritidis* dok je iz hrane za kokoške na prvom mestu je *S. Senftenberg* a zatim *S. Typhimurium*. Kod ćuraka u 2013. godini bila je *S. Saintpaul*, dok su u mesu ćuraka tri najčešća serovarijeteta bila *S. Derby*, *S. Typhimurium* i *S. Stanley*. *Salmonella Typhimurium* je bila najčešći serovar izolovan od svinja i iz svinjskog mesa za

njom *S. Derby* i monofazni varijeteti *S. Typhimurium*. Serovarijetet *S. Senftenberg* je najčešće detektovana u hrani za svinje a za njom *S. Typhimurium*. Kod goveda je najčešće izolovana *S. Typhimurium* za njom *S. Dublin*. Takođe, u goveđem mesu *S. Typhimurium* je bila najčešći serovar za njom *S. Enteritidis* i *S. Derby*. *Salmonella Infantis* je najčešći serovar izolovan iz hrane za goveda, u 2013. Autori su zaključili da *Salmonella* spp ostaju kao najčešći infektivni agensi koji uzrokuju epidemije preko hrane (22,5% od svih epidemija). Od 2008 do 2013 godišnji ukupni broj epidemija izazvanih serovarijetetima *Salmonella* u okviru EU se značajno smanjio za 38,1%, odnosno sa 1888 na 1168 epidemija. Prema mišljenju autora kao i prethodnih godina jaja i produkti od jaja su bili najčešći prenosioci salmonela sa 44,9% epidemija. Drugi po značaju, sa učešćem od 10,5% u epidemijama, za prenošenje salmonela bili su slatkiši i čokolade.

Park HJ et al., (2015) su ispitivali promenu prisustva salmonela tokom prerade pilećih trupova brojlera. Autori su prikupili 1040 uzoraka (fekalni brisevi i pileći leševi) sa dva pogona za preradu, iz sve četiri faze obrade brojlera uključujući žive ptice sa linije klanja, posle evisceracije/predpranje, nakon pranja/prije hlađenja i posle hlađenja. Biodiverzitet izolata salmonela je određivan korišćenjem DiversiLab automatskog ponavljanja sekvence zasnovane na PCR u (rep-PCR) sistemu. U oba pogona prevalencija salmonela rasla je posle evisceracije (sa 4,6% na 30,8%, $p < 0,05$) i smanjivala se posle pranja (od 30,8% na 25,4%, $p < 0,05$). Međutim hlađenje je imalo uticaja na prevalenciju salmonela (sa 25,4% na 22,7%, $p > 0,05$). Najčešći serovarijetet salmonela u jednom pogonu (A) bio je *S. Infantis* (35,8%), zatim *S. Enteritidis* (26,2%) i *S. Montevideo* (15,0%), dok su *S. Montevideo* (43,6%) i *S. Enteritidis* (35,9%) bili najzastupljeniji u drugom pogonu (B.). Razlikom u (rep-PCR) sistemu utvrđen je obrazac koji je vezan za proces prerade i pojavu serovarijeteta više nego vezan za mesto i dan uzorkovanja.

Sajid SU et al., (2015) ispitivali su tokom tri godine mogućnost izolovanja salmonela iz pilećih tkiva, jaja i komponenti hrane. Autori navode da je *Salmonella* važan zoonotski patogen i njegova rasprostranjenost u pilećem mesu

i jajima deluje kao stalna pretnja ljudskoj populaciji. U skladu sa već objavljenim i utvrđenim protokolima za 1747 slučajnih uzoraka iz dvanaest različitih izvora i 56 lokacija u Islamabadu i Severnom Punjabu, oblastima Pakistana, urađen je skrining izolacije. Od 1747 slučajnih uzoraka: 1069 (61.19%) organa piladi i 678 (38.81%) uzoraka iz zajedničkih izvora, uključujući jaja i sastojke hrane, 162 uzorka (9.27%) su bila pozitivna na salmonelu. Učestalost izolata iz različitih organa piladi iznosila je 86 (8,04%) i iz uzoraka iz zajedničkih izvora iznosila je 76 (11,20%). Maksimalna učestalost nalaza izolata zabeležena je u mesnom obroku (19.35%), zatim ribljem brašnu (17.54%), perju iz objekata za uzgoj (14.63%), jetrama (13.17%), prostirkama (10.89%) i jajima (9,64%). Raspon nalaza salmonela kretao se od 19.35% u različitim organima i 4,72% u uzorcima iz zajedničkih izvora. Saznanja dobijena kao rezultat ovih ispitivanja ukazuju na potencijalnu opasnost za javno zdravlje i značaj kontinuiranog sistema nadzora u zemlji i praćenje promena epidemioloških obrazaca serovarijeteta salmonela. Autori zaključuju da endemsko prisustvo različitih serovarijeteta može da dovede do izbijanja salmoneloze kod ljudi zbog konzumiranja kontaminiranog mesa i jaja, kao što je već poznato širom sveta.

Stojanov I i sar. (2005) izveštavaju da je kontinuirana kontrola zdravstvenog statusa živine u lancu proizvodnje važna kao i kontrola njihovih proizvoda namijenjenih za ishranu ljudi. Uzročnici poput kampilobakterija i salmonela široko su rasprostranjeni u prirodi. Uticaj ovih bakterija na zdravlje životinja zavisi od imunološkog statusa jedinki i u većini slučajeva kod imunološki nekompromitovanih jedinki infekcija ovim bakterijama ne dovodi do kliničkih simptoma. Za razliku od životinja, kod ljudi ove bakterije dovode do ozbiljnih kliničkih simptoma sa pojavom morbiditeta u visokom procentu. Njihovo prisustvo u proizvodima od živine predstavlja jedan od glavnih puteva prenošenja ovih patogena koji izazivaju bolesti ljudi putem hrane. Autori su kod živine koja je vještački inficirana salmonelom ispitivali njen uticaj na kliničko ispoljavanje kampilobakterioze. Sigurno je da infekcija živine salmonelom utiče na imunološki sistem dovodeći do njegovog iscrpljivanja i opterećenosti što će omogućiti kampilobakterijama da se umnože do one mjere kada će se pojaviti klinički znaci

i razviti kampilobakterioza. U eksperimentalnim uslovima autori su sproveli ispitivanje na tri grupe od po 30 pilića. Sve grupe su peroralno inokulisane suspenzijom terenskih izolata kampilobakterija. Titar specifičnih antitijela u serumu inficiranih pilića praćen je reakcijom vezivanja komplementa (RVK). Rezultati ispitivanja su potvrdili da infekcija salmonelama utiče na imunološki sistem pilića i tako stvara uslove da kampilobakterije lakše naruše zdravstveno stanje domaćina.

Biljana Miljković-Selimović i sar. (2010) izveštavaju da u poslednje vreme kao uzročnik alimentarnih toksiinfekcija u mnogim delovima sveta dominira *Salmonella enterica subspecies enterica* serotip Enteritidis (S. Enteritidis). Njenom širenju doprinose intenziviranje i globalizacija saobraćaja, trgovine i ostalih društveno-ekonomskih procesa. Međutim, bez obzira na globalno širenje S. Enteritidis, postoji nejednaka rasprostranjenost pojedinih fagotipova (Phage Type - PT) uz dominaciju PT 4 i PT 8. Salmonela mogu izazvati oboljenja, počev od akutnih enterokolitisa do tifusne groznice. Sve bakterije ovog roda poseduju brojne faktore virulencije u koje spadaju: atezini, toksini, plazmidi virulencije, lipopolsaharid ćelijskog zida. Kao i drugi serotipovi salmonela, S. Enteritidis poseduje plazmid virulencije. On omogućava bakteriji da perzistira unutar retikuloendotelinih ćelija, dok se sojevi bez plazmida brzo eliminišu. Poslednjih godina se opisuju virulentniji sojevi S. Enteritidis koji pripadaju PT 4 za koje se smatra da imaju zajedničko poreklo. Dominacija PT 4 fagotipa rezultat je verovatno i otpornosti nekih sojeva na nitrofurantoin koji se primenjuje u živinarstvu. Značaj koji S. Enteritidis ima povećava se ne samo zbog problema vezanih za pandemiju, već i zbog sve češćih izveštaja o ekstraintestinalnim lokalizacijama infektivnih procesa izazvanih ovom bakterijom. Imajući u vidu da su pored živinskog mesa, jaja veoma važan izvor infekcije, efikasne mere prevencije bile bi, između ostalog, promene u načinu pripreme živinskog mesa i ispitivanja jata povezanih sa epidemijama, uništavanje inficiranih jata ili podvrgavanje jaja pasterizaciji.

Abd-Elghany SM et al., (2015) su ispitivali prisustvo salmonele u 200 uzoraka piladi prikupljenih u Mansuru u Egiptu. *Salmonella* je detektovana kod celih leševa piladi u 16% (8/50), u batacima 28% (14/50), jetri 32% (16/50) i u 60% (30/50) želudaca sa ukupnom zastupljenošću od 34% (68/200) od svih uzoraka. Sto šezdeset i šest izolata je biohemijski identifikovano kao salmonela i genetski potvrđeno metodom PCR na osnovu prisustva *invA* i *stn* gena. Međutim, *spvC* gen otkriven je kod samo 25.3% (42/166) izolata. Izolati su serotipizirani kao: *Salmonella* Enteritidis (37.3%), *S. Typhimurium* (30.1%), *S. Kentucky* (10.8%), *S. Muenster* (8.4%), *S. Virchow* (4.8%), *S. Anatum* (4.8%), *S. Haifa* (1.2%) i četiri netipizirana. Testovima antimikrobne osjetljivosti izolata *Salmonella* autori su ustanovili 100% rezistentnciju na eritromicin, penicilin i amoksisicilin, dok je 98.8% izolata bilo rezistentno na nalidiksinsku kiselinu, 96.4% na sulfametoksazo, 95.2% na oksitetraciklin i 91,6% na ampicilin. Multirezistencija je evidentirana kod 92,8% izolata. Visok nivo kontaminacije pilećeg mesa multirezistentnim salmonelama kako autori konstatuju može predstavljati problem za javno zdravlje.

Rodríguez R et al., (2015) su sproveli ispitivanje da bi procenili učestalost nalaza salmonela vrsta na farmi koka nosilja u Tolimu, regionu Kolumbije. Prema podacima salmoneloze mnogo češće utiču na ljude od bilo koje druge zarazne bolesti prenosive hranom, a to izaziva ozbiljne ekonomske gubitke u industriji peradi. Autori su u ovo ispitivanje uključili petnaest farmi koka nosilja sa kojih je ukupno 589 uzoraka kultivisano radi izolacije salmonela vrsta. Prikupljeno je ukupno 14 izolata salmonela vrsta sa pet farmi. Salmonela vrste su izolovane iz jaja (57.15%, n = 8), hrane (28.57%, n = 4) i uzoraka okoline (14.29%, n = 2). Kako je praksa farmi billa i mlevenje hrane (OR = 24), skladištenje jaja na farmama koka (OR = 11.25), dodaci hrani (OR = 7.64) i korišćenje bambusa za izgradnju objekata (OR = 5.24) što su značajni faktori rizika za *Salmonella* spp. Identifikovano je 14 izolata kao serovarijeteti *Salmonella* Enteritidis (n = 6) i *Salmonella* Shannon (n = 8) i oba su bila rezistentna na brojne antibiotike.

Elektroforezom u polju jednosmerne struje predstavljena su tri različita Xbal makrorestrikciona obrasca. Svi izolati *Salmonella* Enteritidis pokazali su isti obrazac, dok su izolati *Salmonella* Shannon grupisani u dva različita obrasca. Rezultati ukazuju da se *Salmonella* spp. može izolovati iz različitih izvora na farmama koka nosilja, a kontaminacija ljuske jaja izaziva posebnu zabrinutost, navode autori.

Nielsen BB et al. (1981) su radili šestogodišnje ispitivanje (1975-81) kojim je bilo obuhvaćeno 3036 divljih sisara i 3004 divlje ptice iz Danske, kao i 684 toplokrvne životinje iz uvoza. *Salmonela* je detektovana u 0,2% danskih divljih sisara, 0,8% danskih divljih ptica, a samo u 0,1% životinja iz uvoza. Zatim, *Salmonella* je izolovana u 16% od 605 labudova koji su uginuli od gladi tokom zime 1978-79 i 2,4% iz 296 uzoraka fecesa sivih vrana. Iako je prevalencija *Salmonella* među danskim govedima u porastu tokom poslednjih godina ne znači da je to slučaj i među divljim, izuzetak su divlje patke. Divlje patke odrasle u uzgojnim objektima često su rutinski tretirane antibioticima; na taj način smrtnost od salmoneloze je smanjena, ali neke ptice su i dalje ostale nosioci salmonela kada su vraćene u prirodno stanište. Prema analizama autora visoka frekvencija salmonela među labudovima koji su uginuli tokom zime 1978-79 je verovatno rezultat okupljanja velikog broja ptica u lukama ili uz otvorene vode.

2.3.4. Molekularne metode za karakterizaciju Salmonela

Velhner M i sar. (2007) su u revijalnom radu opisali različite molekularne metode koje se trenutno koriste za istraživanje *Salmonella* Enteritidis (SE) izolovanih iz vode, hrane i različitih životinjskih i humanih uzoraka. Molekularna tipizacija SE se preporučuje za određivanje raznolikosti sojeva. Od najveće pomoći u ovakvim istraživanjima je najčešće bila kombinacija nekoliko metoda, ali zlatni standard koji bi se mogao primeniti u svim situacijama tokom epidemiološkog istraživanja ne postoji. Metode izbora u genotipskoj karakterizaciji SE u raznim okolnostima su kombinacija fagotipizacije, elektroforeze u pulsnom polju, nasumice umnožene polimorfne DNK ili ribotipizacija. Svaka metoda ima svoje prednosti i

mane, a najčešće kombinacija više njih dovodi do najvećeg nivoa diskriminacije, tj. detekcije najvećeg broja tipova u skupini izolata. U evaluaciji metoda za tipizaciju postoji nekoliko kriterijuma, kao što su reproducibilnost (dobijanje identičnih rezultata za svaki izolat u ponovljenim eksperimentima), moć diskriminacije (sposobnost diferencijacije među nesrodnim izolatima), lakoća interpretacije i lakoća izvođenja. Do danas nijedna pojedinačna metoda tipizacije nije optimalna u odnosu na sve ove kriterijume i nijedan pristup se ne može primeniti za sve kliničke situacije. Metode tipizacije se dele na fenotipske, tj one koje detektuju osobine ispoljene od strane mikroorganizama i genotipske, tj one koje uključuju direktne analize DNK, bilo hromozomalnih, bilo ekstrahromozomalnih elemenata.

Zhu C et al. (2015) su na osnovu podataka o genomu bakterija razvili one-step multiplex PCR test za identifikaciju salmonela i istovremenu diferencijaciju dva invazivna serovara adaptirana kod ptica *S. enterica* serovar Gallinarum biotipovi Gallinarum i Pullorum, a kao najčešći, specifični serovarijeteti koji kolonizuju pilad su: Enteritidis, Heidelberg i Kentucky. Autori su opisali metod one-step lančane reakcije polimeraze (PCR), za identifikaciju glavnih serovarijeteta *S. enterica* subsp. *enterica*. Princip ispitivanja je zasnovan na dizajniranju prajmera koji su specifični za amplifikaciju jedinstvenog seta izolata i serovarijeteta *Salmonella* čija je DNK u jednoj PCR tubi, uzimajući u obzir poznate dostupne podatke o genomu *Salmonella*, uključujući i nabrojane serovarijetete. Enteritidis (369 genoma), H (154), K(63) Gallinarum (8 biotipova Pullorum i 4 Gallinarum) i 2,563 genoma iz 104 druga soja. Željene specifičnosti su proverene korišćenjem BLAST (NCBL). Izolati iz roda *Salmonella* i Gallinarum biotipa identifikovani su uz pomoć prajmera za prepoznavanje konzervisanog dela DNK segmenta i njegovih bcf i ste fimbrijalnih gena. Specifični prajmeri za serovar Gallinarum biotip Gallinarum su napravljeni korišćenjem podataka o deleciji 4 nukleotida za steB biotip Pullorum. Ostali specifični delovi DNK služili su kao target obrazac za prajmere kod pojedinačnih serovarijeteta Enteritidis, Heidelberg, i Kentucky. Ukratko, za multipleks PCR korišćeni su, prečišćeni DNK prajmeri (koncentracije 1-5ng po reakciji, MagNA Pure LC DNA kit za izolaciju, Roshe Life Sci,

Indianapolis,IN) ekstrakt DNK (75ng po reakciji, dobijen zagrevanjem 5 minuta suspenzije bakterija, gustine 10^7 CFU/ μ l u dH₂O, 1 μ l supernatanta posle centrifugiranja je umnožen sa TaqDNK polimerazom u finalnoj koncentraciji jona Mg od 1,5mM. (Choise Taq BlueTM, Denville Sci. Inc. Sought Plainfield,NI) uz primenu standardnog protokola za PCR (25 ciklusa sa anelingom na temperaturi od 56°C) koji je izveden u Hybaid Thermal cycler-u. Specifičnost i podudarnost seta prajmera odabranih za multipleks PCR ocenjena je uz upotrebu genomske DNK od 128 *Salmonella* sojeva uključujući 34 različita serovara, kao i 3 *E. coli* i 2 *Yersinia* vrste kao negativne kontrolne sojeve. Profili za svaki pojedinačni amplikon su vizuelizovani u gelu agaroze upoređivanjem sa referentnim sojem. Svi sojevi *Salmonella* su potvrđeni, a za sojeve Gallinarum biotipovi i serovari Enteritidis, Heidelberg i Kentucky. Na osnovu dobijenih rezultata a u skladu sa informacijama korišćenim za izradu prajmera i validaciju predložene identifikacije autori su utvrdili razlike između izolata *S.enterica* i serovar/biotip poreklom od živine. Rutinski skrining jata na prisustvo *Salmonella* može se vršiti serološki što je skupo i dugo traje. Bazirajući se na ograničenom broju serovara nađenih kod živine, obimne molekularne tehnike nisu uvek isplative, i treba se fokusirati na pristup i upotrebu jednostavnijih testova koji daju bržu dijagnostiku. Ovde je korišćen mali rascep u genu *steB* biotipa Pullorum koji je predviđen genetskom analizom i na osnovu njega su napravljeni prajmeri koji hibridizuju biotip Gallinarum, ali ne i DNK Pulloruma. Omogućavajući u jednom koraku (one-step) PCR diferencijaciju navedena dva biotipa korišćeni metod skraćuje tehniku (two-steps) u dva koraka. Dizajnirane probe su specifične za identifikaciju serovara Gallinarum, Heidelberg i Enteritidis. Serovar Kentucky deli PCR profil sa srovarom Albany koji ne spada u glavne žvinske izolate u USA. Dodatno ova dva serovara mogu se razlikovati uz pomoć flagelin-specifičnog PCR. U ispitivanjima autori su koristili i podatke o genomu dobijene sekvenciranjem, u cilju izrade za živinu specifičnog multipleks PCR dijagnostičkog testa i široke kolekcije izolata i serovarijeteta *Salmonella* za validaciju specifičnosti metoda za identifikaciju i diferenciranje glavnih ptičijih serovara. Ovakav jednostavan i ekonomičan test može se koristiti za specifičan skrining jata, praktičan je za

zemlje u razvoju ili za jata koja se slobodno drže, kao i za ptice ljubimce u zemaljama u razvoju.

Bugarel M et al., (2011) sprovedli su studiju za detektuju prisustva deset kombinovanih markera makro nizom (macro-array) koristeći multipleks (multiplex real-time) RT PCR. Kao mete su koristili karakteristične determinante intergenske sekvence do tipa 104 (DT104). Da bi ispitali rezistenciju na antibiotike, studija je pratila prisustvo gena odgovornih za rezistenciju na sulfonamide (sul1) i beta-laktame (blaTEM). Ispitivanjem je bilo ukupno obuhvaćeno 538 nepovezanih *S. Typhimurium* sojeva izolovanih između 1999. i 2009. godine iz različitih izvora, uključujući i hranu za životinje, prehrambene proizvode, uzorke od ljudi i uzorke iz životne sredine. Na osnovu kombinovanog prisustva ili odsustva ovih markera, utvrđena su 34 genotipa, uključujući i tri glavna genotipa koji su prisutni kod 75% ispitivanih sojeva. Iako su SPI determinante gotovo uvek detektovane, SGI1, intl1, sul1 i blaTEM determinante su utvrđene u 47% , 52%, 54% i 12% sojeva, zavisno od vremena i materijala za izolaciju. Low -marker obrasci su najčešće otkriveni u materijalu poreklom od živine, dok full-marker obrasci su uočeni kod izolata poreklom od svinja, goveda i ljudi. GeneDisc® assay razvijen u ovoj studiji olakšava istraživanja varijabilnosti u okviru serotipa *S. Typhimurium* analizom 10 relevantnih genetskih determinanti u velikoj kolekciji sojeva. Autori zaključuju da ovaj multipleks PCR predstavlja dragoceno sredstvo za karakterizaciju sojeva prilikom epidemioloških ispitivanja.

Chen J et al.,(2012) u svojim ispitivanjima primenili su brzu multipleks PCR metodu za istovremenu detekciju pet glavnih alimentarnih patogena (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis i *Shigella flexneri*). Amplifikacijom PCR test je optimizovan za dobijanje visoke efikasnosti. Testovima osetljivosti i specifičnosti ispitivani su različiti sojevi. Multipleks PCR test je bio u stanju da istovremeno otkrije svih pet mikroorganizama u veštački kontaminiranim uzorcima svinjskog mesa. Razvijena metoda je dalje primenjena na uzorcima mesa u maloprodajnim objektima od kojih je 80% bilo pozitivno na jedan ili više od ovih pet

mikroorganizama. Svi uzorci su potvrđeni tradicionalnim metodama izolacije, svaki pojedinačno. Sprovedenom studijom izneti su podaci o upotrebi brze metode multipleks PCR koji može da koristi pet prajmer setova za detekciju više patogena. Utvrđeno je da postoji velika podudarnost između rezultata dobijenih metodom multipleks PCR i standardnim metodama izolacije. Ispitivanjima je utvrđeno da je multipleks PCR metoda pouzdana, korisna i isplativa. Metoda je jednako dobra kao i standardne metode izolacije i veoma osetljiva da detektuje salmonele, kako u veštački, tako i u prirodno kontaminiranim uzorcima.

Arügello H iet al., (2014) su ispitivali varijantu monofazne salmonele sa antigenom formulom *Salmonella* 4,[5],12:i:- koja se pojavila u poslednji deceniji kao jedan od glavnih serotipova, uzročnika salmoneloze kod ljudi. Autori su ispitivali 94 izolata S. 4,12: i: - i S. 4,5,12: i: - od domaćih životinja, svinja (86), goveda (7), i živine (1) u Danskoj. Sojevi su dobro obrađeni, identifikovani, dodatno serotipizirani, fagotipizirani i urađena im je molekularna tipizacija MLVA analizom. Štaviše, testirana je rezistencija svakog izolata. U 68. izolata fljB gen je bio odsutan (tj, oni su pravi monofazni sojevi), dok je kod 26 izolata, gen bio prisutan uprkos činjenici da izolati nisu izraziti. Prema rezultatima izolati su grupisani u tri glavne vrste impulsa. Dominantna grupa je kompatibilana sa prethodno opisanim obrascem STYMXB 0131. Svi izolati uključeni u ovaj skup nisu imali fljB gen, i svi izolati osim jednog pripadali su tipu fag DT 193 sa AMP-STR-SMX-TET obrascem rezistencije. MLVA analizom dobijene su grupe sa nekoliko MLVA profila ranije prijavljenih u drugim studijama. Konačno, rezistencija na antibiotike i multirezistencija je česta, iako je rezistencija detektovana na fluorohinolone i cefalosporine. Ovim ispitivanjem autori su utvrdili prisustvo monofaznih serovarijeteta *Salmonella* Typhimurium-sličnih sojeva u proizvodnji hrane životinjskog porekla u kojoj su dobro okarakterisani klonovi koji su opisani u prethodnim studijama, a sve to ukazuje na pojavu i širenje ovog serotipa u Danskoj.

de Freitas CG et al.,(2010) su primenili metodu multipleks (mPCR) za brzu i direktnu identifikaciju prisustva *Salmonella* spp. i serotipova

S. Enteritidis, *S. Typhi* i *S. Typhimurium* iz trupova živine (n = 127) i utroba živine (n = 73). Pojava oboljenja izazvanih hranom raste širom sveta. Bakterije iz roda *Salmonella* su odgovorne za trovanja hranom koja u nekim slučajevima, mogu biti fatalna. Implementacija standardnih metoda uz korišćenje pozitivne kontrole je bila uspešna. Rezultati detekcije salmonela u ohlađenim utrobama pokazali su da je mPCR bio u stanju da otkrije rod salmonela u 2,74% ovih uzoraka. Tradicionalnim mikrobiološkim analizama identifikovani su pozitivni uzorci sa salmonelama ali bez diferenciranja serotipa. Serotip *S. Enteritidis* je detektovan mPCR u 1,37% uzoraka. Autori su zaključili da je metoda mPCR u stanju da otkrije prisustvo salmonela u kratkom vremenskom periodu i da omogućava identifikaciju serotipa *S. Enteritidis*.

Cortez AZ et al., (2006) sprovedli su ispitivanja da bi stekli uvid o prisustvu *Salmonella* spp., *Salmonella* *Enteritidis* i *Salmonella* *Typhimurium* u klanicama piladi. Uzorci izmeta, perja, kožica, očišćenih trupova, spolja i iznutra opranih trupova i rashlađenih trupova su prikupljeni su sa šest klanica piladi. Izolati salmonela su identifikovani metodom multipleks PCR uz primenu tri seta prajmera ciljajući na genske sekvence (*invA*, *pefA* i *sefA*) *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*. *Salmonella* spp je detektovana u 10% (29/288) uzoraka, dok su serovari *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* identifikovani u 62% uzoraka. Autori na osnovu rezultata ukazuju na potrebu da je neophodno poboljšati higijenske i sanitarne standarde na linijama za klanje živine, uz edukaciju proizvođača hrane i informisanje potrošača.

Mahon J et al., (1994) su upoređivali metodu multipleks PCR sa standardnim bakteriološkim metodama za detekciju salmonela i posebno za *S. Enteritidis*, u uzorcima pilećih koža dobijenih iz maloprodajnih objekata. Pet od 68 uzoraka bilo je pozitivno primenom oba sistema (7,4%), 58 od 68 bilo je negativno primenom oba sistema (85%), pet je bilo pozitivno samo primenom metode PCR (7,4%), ali nijedan uzorak nije bio pozitivan samo primenom standardnih bakterioloških podloga. Autori su utvrdili da je metoda PCR brža i osetljivija od standardnih bakterioloških metoda, iako je njenom primenom detektovano manje

uzoraka na salmonele odnosno samo 7,4%, traje kraće i rezultati se dobijaju za manje od 24 časa u odnosu na standardne metode koje traju najmanje 2-3 dana.

Velebit Branko i sar. (2007) su ispitivali primjenljivost multipleks lančane reakcije polimeraze (multipleks PCR) kao jednostavne, brze visokoosjetljive i pouzdane metode za identifikaciju *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis. Autori navode da je salmoneloza jedna od najčešćih zaraznih bolesti ljudi i životinja koju izazivaju dve vrste bakterija iz roda *Salmonella* - *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. Radi obezbeđivanja efikasne, racionalne i kvalitetne zdravstvene zaštite stanovništva, neophodna je pouzdana identifikacija i potvrđivanje uzročnika salmoneloze. Ovo se danas ostvaruje primjenom metoda za izolaciju bakterijske kulture, određivanje biohemijskih osobina bakterija i serološku tipizaciju upotrebom specifičnih anti-O i anti-H antiseruma. Ove metode su kompleksne, skupe i iziskuju mnogo vremena. U poslednjih nekoliko godina ubrzan razvoj molekularno-bioloških metoda omogućio je brži, jeftiniji i pouzdaniji način identifikacije, odnosno potvrđivanja ovog mikroorganizma. Princip se zasniva na izolaciji DNK iz salmonele i ciljanoj amplifikaciji određenih sekvenci serovar-specifičnih gena. Serovarijete koje su autori ispitivali činili su više od 90 posto *Salmonella* spp utvrđenih u mesu. Materijal za ispitivanje predstavljala je kolekcija od 100 sojeva iz roda *Salmonella*, od kojih je 45 sojeva pripadalo serovarijetetu *Salmonella* Typhimurium, 40 sojeva pripadalo je serovarijetetu *Salmonella* Enteritidis, kao i 15 vrsta bakterija koje su izabrane tako da su strukturno i funkcionalno blisko povezani sa salmonelama ili rastu pod istim uslovima i u istoj sredini kao i salmonele, koje su korišćene radi isključivanja. Rezultati ispitivanja potvrdili su da je multipleks PCR metoda veoma pouzdana za rutinski rad u laboratorijama i da znatno skraćuje i pojednostavljuje čitavu proceduru dijagnostike salmonela.

Zahraei T Salehi et al. (2005) izveštavaju da su u ispitivanju koristili PCR kao pouzdanu metodu za identifikaciju salmonela. Korišćenjem ove metode u većini dijagnostičkih i istraživačkih laboratorija moguća je identifikacija salmonela molekularnim tehnikama. Ovaj metod je jednostavniji i jeftiniji. Prisustvo

salmonela je detektovano u 192 uzorka leševa piladi sa farmi iz provincije Širaz u Iranu. Iz navedenih uzoraka detektovano je 30 (15.6%) izolata salmonela konvencionalnim metodama, potvrđeno serološki i metodom PCR. Sojevi serogrupe D1 bili su najzastupljeniji a za njima serogrupe C1, B i C2. Svi sojevi su posedovali Salmonella-specifični gen (invA) specifičan za salmonelu i potvrđeni su kao salmonela pozitivni sa karakterističnim DNA fragmentom od 284-bp.

Fakhr MK et al., (2006) ispitivali su zaraženo živinsko meso salmonelama i radili molekularnu karakterizaciju izolata. Zaraženo živinsko meso je identifikovano kao jedan od glavnih izvora salmonela u hrani. Molekularna karakterizacija salmonela je važna metoda za kontrolu ovog patogena. Autori su ispitali 74 uzorka ćurećeg mesa koje su prikupili iz različitih objekata u Fargu, Severna Dakota u jesen 2003. godine. Primenom standardne konvencionalne metode (FSIS,USDA) Salmonella je utvrđena u 30 uzoraka. Izolovanim salmonelama je urađena serotipizacija, elektroforeza u polju jednosmerne struje (PFGE), analiza plazmidai rezistencija na antimikrobne lekove. Autori su Identifikovali pet serotipova : Newport (n = 12), Hadar (n = 8), Heidelberg (n = 7), 4,12:nepokretna (n = 2) i Reading (n = 1). Primenom Xbal PFGE analize otkriveno je 13 vrsta izolata koje su grupisali u skladu sa serotipskom pripadnosti. Kod 11 izolata kod kojih su utvrđeni plazmidi (1 ili 2 plazmida) i nakon analize autori su identifikovali 5 vrsta plazmida. Rezistencija na antibiotike utvrđena je kod 17 izolata.. Kod serotipa S. Heidelberg utvrđena je multirezistencija: kod 1 izolata na gentamicin, sulfametoksazol i streptomycin, kod 6 izolata na tetraciklin, gentamicin, sulfametoksazol, kanamicin, streptomycin. Izolati serovarijeteta Hadar bili su rezistentni na 2 ili 3 antibiotika: tetraciklin i streptomycin (1 izolat); tetraciklin i kanamicin (1 izolat); i tetraciklin, kanamicin i streptomycin (6 izolata). Kod izolata S 4,12: koji su nepokretni utvrđena je rezistencija samo na tetraciklin. Kod serovarijeteta S. Newport i S. Reading utvrđena je osetljivost na svih 16 testiranih antibiotika.

Mólbak K et al.(2014) su razvili model koji je omogućio povratno preračunavanje godišnje seroincidencije salmonela merenjem antitela protiv *Salmonella* i primenom ovog modela na 9677 uzoraka seruma sakupljenih od populacija iz 13 evropskih zemalja. Našli su desetostroke razlike u seroincidenci, koja je bila najniža u Švedskoj (0.06 infekcija po osobi godišnje), zatim u Finskoj (0.07) i Danskoj (0,08), a najviše u Španiji (0,61) i potom u Poljskoj (0.55). Ovi brojevi nisu u korelaciji sa prijavljenom nacionalnom incidencom infekcija izazvanih vrstama iz roda *Salmonella* kod ljudi, ali su u korelaciji sa podacima o prevalenciji salmonela kod koka nosilja ($p < .001$), brojlera ($p < .001$) i svinja za klanje ($p = 0.03$). Seroincidenca je takođe u korelaciji sa švedskim podacima o riziku specifičnom za svaku zemlju i pojavi infekcija izazvanih salmonelama tokom putovanja ($P = .001$). Procene zasnovane na seroepidemiološkim metodama su pogodne za merenje intenziteta prenosa salmonela na populaciju ljudi, a posebno gde podaci uključuju obaveštenja iz područja države ili zemlje sa različitim karakteristikama nadzora nad salmonelama..

2.6. Metode za ispitivanje osetljivosti *Salmonella* vrsta na antibiotike

Parvej MS et al. (2016) su utvrđivali prevalenciju i serotipsku pripadnost izolata salmonela izolovanih od zdrave živine. Autori konstatuju da je salmonela važan zoonotski patogen odgovoran za bolesti i životinja i ljudi. Osim toga, procenjivali su i klonsku povezanost između izolovanih serovarijeteta salmonela. Prikupili su ukupno 150 uzoraka kloakalnih briseva od zdrave piladi i radili izolaciju i identifikaciju povezanih salmonela organizama. Izolovane kolonije su identifikovane i morfološki okarakterisane, kulturelno, biohemijskim testovima, slajd aglutinacionim testom, metodom PCR i elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE). Osetljivost salmonela na antibiotike je takođe ispitivana primenom najčešće korišćenih antibiotika. Od 150 uzoraka, 11 (7,33%) je formiralo karakteristične pink kolonije sa crnim centrom na XLD agaru i svi su kulturelno i biohemijski potvrđeni kao salmonela. Svi serovari su imali specifični gen SpeF i reagovali su sa antiserumom za grupu D, što je upućivalo da su svi izolati *Salmonella enterica* serovar Gallinarum, biovar Pullorum i/ili

Gallinarum. Ispitivanjem osetljivosti na antimikrobna sredstva utvrđeno je da je 54.54% izolovanih serovara *Salmonella enterica* visoko osetljivo na ciprofloksacin, dok je 81.81% izolata rezistentno na amoksisicilnom, doksiciklin, kanamicin, gentamicin i tetraciklin. Elektroforeza u polju jednosmerne struje (Pulsed-field gel electrophoresis) sa XbaI-digested genomom DNA pokazala je identične trake obrazaca, što ukazuje da multirezistencija serovara *Salmonella enterica* dostiže visok klonalitet kod komercijalnih nosilja u Bangladešu. Ispitivanja u ovoj studiji su sprovedena kako bi se utvrdila prevalencija salmonela kod živine, kao i da se odredi međusobni odnos klonova. Podaci u ovoj studiji ukazuju na učestalost nalaza multirezistentne vrste *Salmonella enterica* čiji su klonovi veoma zastupljeni kod komercijalnih jata u Bangladešu

Sing P i Mustapha A (2013) u svojim ispitivanjima ukazuju da je preterana upotreba antibiotika u medicinskoj i veterinarskoj industriji jedan od glavnih uzroka za nastanak multirezistentnih (MDR) prehrambenih patogena koji se često teško leče. U poslednjih nekoliko godina, pojava epidemija uzrokovanih multirezistentnim salmonelama je dokumentovana. Cilj ove studije bio je da razvije brzu multipleksa (PCR) metodu za simultanu detekciju patogenih i multirezistentnih salmonela vrsta. Multipleks TaqMan®real-time PCR je dizajniran da ciljano detektuje invazivni gen virulencije (*invA*), i četiri gena antibioretencije za ampicilin, hloramfenikol, streptomycin i tetraciklin. Da bi se izbeglo dobijanje lažno negativnih rezultata i povećala pouzdanost testa, uvedena je interna amplifikaciona kontrola (IAC) dodata za detekciju zaključane nukleinske kiseline (LNA). U serijski razblaženim (5 ng 50 FG) DNK uzorcima, ispitivanje je u stanju da detektuje 100 genomskih ekvivalenata salmonele, dok je u multipleks formatu, osetljivost 1000 genomskih ekvivalenata. Test detektuje podjednako dobro veštački kontaminirane uzorke govedine, mlevene govedine različitih mesnih sadržaja (73:27, 80:20, 85:15 i 93: 7), isprane piletine, piletine sa podnog sistema uzgoja, ćuretine sa podnog sistema uzgoja, jaja, spanaća i paradaiza. Dok je limit detekcije inokulisanih uzoraka hrane iz preobogaćenja bio 10 (4) CFU/g, ovim postupkom je postignuto poboljšanje do 10 CFU/g posle 12-č obogaćenja u puferizovanoj peptonskoj vodi, sa 100% reproduktivnosti. Multipleks

PCR test razvijen u ovoj studiji može se koristiti kao vredno sredstvo za detekciju multirezistentnih virulentnih salmonela i tako povećati sigurnost hrane.

Tu LT et al., (2015) su ispitivali rasprostranjenost, raznolikost i antimikrobnu rezistenciju (AMR) kod netifoidalnih salmonela (NTS) i povezanih faktora rizika na 341. farmi svinja, pilića i pataka u provinciji Dong Tap (Mekong Delta, Vijetnam). Uzorkovanje je bilo podijeljeno po vrstama, okrugu (četiri kategorije), i veličini gazdinstva (tri kategorije). Zbirni feces, prikupljen pomoću nazuvaka, je testiran primenom metode prema standardu ISO 6575: 2002 (prilog D). Izolovane su serogrupe; Grupa B izolati su testirani PCR do utvrđivanja *S. Typhimurium* i (monofaznog) serotipa 4, [5], 12. Prevalencija NTS na nivou farmi bila je 64 - 7% za piliće, 94 - 3% patke i 91%-3% za farme svinja. Faktori nezavisno povezani sa NTS su farma pataka (OR) 21-2], farma sa > 50 svinja (OR 11-9), farma svinja sa 5-50 svinja (OR 4-88) (vs. pilića), i često posmatranje glodara (OR 2-3). Oba *S. Typhimurium* i monofazna *S. Typhimurium* su češća na farmama pataka. Izolat je imao visoku učestalost rezistencije (77 · 6%) na tetraciklin, umerenu rezistenciju (20-30%) na hloramfenikol, sulfametoksazol-trimetoprim, ampicilin i nalidiksinsku kiselinu malu rezistenciju (<5%) na ciprofloksacin i treću generaciju cefalosporina. Multirezistencija (rezistencija na 3 grupe antimikrobnih sredstava) je povezana sa monofaznim sojem *S. Typhimurium* i drugih izolata grupe B (isključujući *S. Typhimurium* i farme svinja. Neuobičajeno visoka prevalencija NTS na Mekong Delta farmama predstavlja ogroman izazov za kontrolu.

Wierup M (2000) naglašava da je kontrola i prevencija infektivnih bolesti u držanju domaćih životinja značajna je i sa ekonomskog stanovišta. Pojava rezistentnih sojeva pokazuje da se lečenje bakterijskih infekcija ne može osloniti na upotrebu antibiotika bez nekog kritičnog razmatranja. Specijalna pažnja posvećuje se upotrebi antibiotika kod životinja, uključujući i promotore rasta, jer mogu doprineti problemima rezistencije na antibiotike kod ljudi. Ovakva saznanja su znatno uticala na potrebu uvođenja metoda za prevenciju bolesti, a upotreba antibiotika odobrava se tek onda kada druge metode ne daju rezultate. Dakle,

antibiotici ne bi trebalo da budu uključeni u prvim linijama tretmana lečenja životinja.

Ungemach RF et al.,(2006) svojim ispitivanjima potvrđuju da se antibiotici i dalje smatraju neizbežnim u tretmanima lečenja i prevenciji infektivnih bolesti kod životinja koje se uzgajaju na farmama, a namenjene su za proizvodnju hrane, kao i radi zaštite javnog zdravlja od bolesti prenosivih hranom. Svi antibiotici koji se koriste u veterinarskoj medicini su isti ili su blisko vezani sa antibioticima koji se koriste u humanoj medicini, ili mogu izazvati unakrsnu rezistenciju. Podaci EU pokazuju da se antibiotici dvostruko više koriste u humanoj nego u veterinarskoj medicini. Ipak, uslovi uzimanja antibiotika kod životinja koje se uzgajaju na farmama uglavnom svinje i živina, oralnom primenom kod velikog broja životinja u dugom vremenskom periodu kao i rizik od davanja malih doza, mogu ići u prilog selektivnom pritisku i nastanku rezistencije kod bakterija. Da bi se redukovala upotreba antibiotika i na taj način minimalizovao razvoj rezistencije u veterinarskoj medicini, objavljene su obavezne smernice pažljive upotrebe antibiotika kod životinja u Nemačkoj. Ove smernice opisuju uslove koje veterinari moraju da poštuju kada tretiraju životinje antibioticima. Ključni elemenat je upotreba antibiotika na osnovu tačne dijagnoze (najbolje mikrobiološka), izbor najprikladnije antibakterijske supstancije, restrikcija upotrebe antibiotika kao poslednjeg sredstva i pridržavanje uputstva za upotrebu. Bilo kakva odstupanja od smernica moraju se obrazložiti i zabeležiti. Rezultati dobijeni nakon objavljivanja smernica, pokazuju da je upotreba antibiotika kontinuirano opadala. Tako je na primer upotreba hlortetraciklina sa početnih 76% ukupne količine propisanih lekova, pala na 14,7%.

Katie L et al., (2005) u radu objavljenom pod naslovom "Mehanizmi hinolon rezistencije *E.coli* i *Salmonella* spp." , navode da su fluorohinoloni antibiotici širokog spektra delovanja i da su visoko efikasni u lečenju različitih kliničkih infekcija u veterinarskoj medicini. Oni deluju antibakterijski inhibicijm replikacije DNA. Uobičajeno je da se rezistencija spontano povećava zbog tačkastih mutacija. Pored toga, skorašnje otkriće plazmidom posredovane rezistencije na

hinolone, može imati za posledicu horizontalni transfer rezistencije na fluorohinolone kod navedenih vrsta bakterija (*E.coli* i *Salmonella* spp). Autori konstatuju da je potrebno sprovesti stroge kontrolne mere kako bi se izbegla preterana upotreba ovih važnih antibiotika i u humanoj i u veterinarskoj medicini i na taj način sprečilo povećano pojavljivanje rezistentnih sojeva bakterija.

Adesiyun A et al.,(2014) su ovim ispitivanjem utvrdili frekvenciju rezistencije 84 izolata salmonela uključujući 14 serotipova izolovanih sa farmi nosilja iz tri karibske zemlje (Trinidad i Tobago, Grenada i Sant Lucija) na osam antimikrobnih lekova, primenom disk difuzione metode. Rezistencija među izolatima salmonela je uslovljena zemljom iz koje potiču, vrstom uzoraka, veličinom farme i serotipom izolata. Generalno, svih (100.0%) izolata je rezistentno na jedan ili više testiranih antimikrobnih lekova, a svi su bili osetljivi na hloramfenikol. Detektovana rezistencija kretala se od 11.9% na sulfametoksazol-trimetoprim (SXT) do 100.0% na eritromicin. Razlika nije statistički značajna ($P = 0,23$). Širom zemlje postoje znatne razlike u učestalosti rezistencije detektovane na sulfametoksazol SXT ($P = 0.002$) u Trinidad i Tobagu i na gentamicin ($P = 0.027$) u Sant Luciji. Za ove tri zemlje, učestalost rezistencije na antimikrobne lekove se značajno razlikuje za ampicilin ($P = 0.001$) i sulfametoksazol trimetoprim SXT ($P = 0.032$). Ukupno 83 (98.8%) od 84 izolata pokazuje 39 obrazaca multirezistencije. Veličina farme značajno ($P = 0,032$) utiče na učestalost rezistencije na kanamicin širom zemlje. Generalno, među 14 testiranih serotipova salmonele značajna je rezistencija ($P < 0.05$) na kanamicin, ampicilin i sulfametoksazol-trimetoprim. Prema mišljenju autora rezultati ukazuju da je na šest testiranih antimikrobnih lekova (eritromicin, streptomycin, gentamicin, kanamicin, ampicilin i tetraciklin). relativno visoka učestalost rezistencije. Detektovana multirezistencija prema autorima može predstavljati problem prilikom primene navedenih lekova u profilaksi i lečenju koka nosilja u ovim zemljama.

Costa RG et al.,(2013) vršili su procenu antibioretencije na 12.582 sojeva salmonela poreklom iz komercijalnih trupova živine i živinskih proizvoda različitih

regiona u Brazilu između 2007. i 2011. godine. a izolovane su u javnim i privatnim laboratorijama, Izolati su uzeti iz Nacionalne laboratorije (National Reference Laboratory for Bacterial Enteroinfections, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation) sa sedištem u Riu de Žaneiru, Brazil radi konačne antigenske karakterizacije. Najučestalije serogrupe vrste *Salmonella enterica* bile : O:4 (B) (28.9%), O:9 (D1) (22.3%), O:21 (L) (15.9%), i O:7 (C1) (14.3%); a najčešći serovarijeteti bili su: Enteritidis, Minnesota, Typhimurium, Schwarzengrund i Mbandaka. Profili antimikrobne osjetljivosti 1234 soja pokazali su da je 54.5% njih rezistentno na osam antimikrobnih lekova. Multirezistencija (tri ili više grupa) je primećena u 16,4% sojeva, sa 190 različitih obrazaca. Rezultati su pokazali povećanu rezistenciju na ampicilin (12.4 do 18.9%), tetraciklin ($\approx 15,2$ do $\approx 18.9\%$) i gentamicin (7.0 do $\approx 9,6\%$). Primećena je smanjena rezistencija na nitrofurane (sa 61,9 na 9,2%), kvinolone (sa 44.4 na 15.5%), i inhibitore folata (sa 11.7 na 7,2%). Rezistencija na treću generaciju cefalosporina je detektovana u 5,5% sojeva tokom čitavog perioda ispitivanja; rezistencija na fluorohinolone je primećena u 0,3% sojeva od 2009. godine. Ovi nalazi ukazuju na značaj nadzora lanca ishrane i detekciju izmenjenih obrazaca kod hranom prenosivih zoonoznih bakterija značajnih za javno zdravlje.

Ahmed AM et al.,(2014) izveštavaju da su patogeni koji se nalaze u hrani uzrok bolesti i smrti, posebno u zemljama u razvoju. Problem se pogoršava ako je bakterija multirezistentna. Malo je poznato o obimu antibiotezistencije patogena iz hrane i molekularnim mehanizmima u Africi. Ovim ispitivanjem vršena je karakterizacija mehanizma multirezistencije na molekularnom nivou kod *Salmonella enterica* izolovanih od 1600 uzoraka hrane (800 mesnih prerađevina i 800 mlečnih proizvoda) prikupljenih od različitih uličnih prodavaca, mesara, maloprodajnih objekata i klanica u Egiptu. Od 69 izolata 47 (68,1%) je ispoljilo fenotipsku multirezistenciju na najmanje tri klase antimikrobnih lekova. Prevalencija multirezistentnih izolata je bila veća u proizvodima od mesa (37, 69,8%) nego u mlečnim proizvodima (10, 62,5%). Multirezistencija serovarijeteta uključuje *S. Enterica* serovar Typhimurium (24 izolata, 34.8%), *S. enterica* serovar Enteritidis, (15 izolata, 21.8%), *S. enterica* serovar Infantis (7 izolata,

10.1%) i *S. enterica* serovarijetet koji nije tipiziran (1 izolat, 1.4%). Najveća rezistencija utvrđena je na ampicilin (95.7%), zatim na kanamicin (93,6%), spektinomycin (93.6%), streptomycin (91,5%) i sulfamethokazole i trimetoprim (91,5%). Metoda PCR i DNA sekvenciranje su korišćene za karakterizaciju integrona i gena antibioretencije. Utvrđeno je da je 39,1% i 8,7% izolata bilo pozitivno na klasu 1 i klasu 2 integrona, a geni odgovorni za produkciju β -laktamaza su identifikovani u 75.4% izolata i plazmid-posredovani geni rezistencije na kvinolone su identifikovani u 27,5% izolata. Konačno, gen za rezistenciju na florfenikol floR, je identifikovan u 18.8% izolata. Metodom PCR je identifikovna *S. enterica* serovar Typhimurium DT104 u mesu i mlečnim proizvodima. Ovo su prvi izveštaji o genima rezistencije u mlečnim proizvodima. Takođe ovim ispitivanjem je utvrđeno visoko prisustvo multirezistentne vrste *S. enterica* u mesu i mlečnim proizvodima u Egiptu, uz mogućnost njenog prenošenja na ljude, a sve to vodi ka terapijskom neuspehu. Autori zaključuju da u zemljama u razvoju treba drastično smanjiti preteranu upotrebu antibiotika kod životinja.

Shanen N et al.,(2004) u svojim istraživanjima navode da su se infekcije ljudi izazvane *S. Enteritidis* (fagotipa 4) povećale svuda u svetu tokom zadnje decenije, a pokazalo se da su uglavnom vezane za konzumiranje živinskog mesa i jaja. Značaj zbog opšteg zdravlja i ekonomska važnost ovog serovara nameće potrebu da se stvori baza podataka o njegovoj osetljivosti na antimikrobna sredstva. U tu svrhu izvršeno je ispitivanje osetljivosti ove bakterije na izolatima od živinskog mesa i jaja. Rezultati standardnog disk difuzionog testa pokazali su rezistenciju na bacitracin, eritromicin i novobiocin. Svi (100%) izolati bili su visoko osetljivi na hloramfenikol, dok su kanamicin, streptomycin i spektinomycin slabo delovali na ovaj serovar. Autori ukazuju na limitirani terapijski potencijal kada je u pitanju *S. Enteritidis* (fagotipa 4).

Karami A et al., (2001) izveštavaju da se veliki broj salmoneloznih infekcija javlja kod ljudi i životinja. Konvencionalne metode izolacije sojeva salmonela traju 4-7 dana, naporne su i zahtevaju značajnu radnu snagu. Autori su imali za cilj da

razviju brzu metodu detekcije salmonela primenom skraćene metode PCR i brze elektroforeze. Pranjmere za PCR tyv (rfbE), prt (rfbS) i invA gene koristili su za brzu identifikaciju *S. enterica* serovar Typhi i Paratyphi A, primenom brzih i skraćenih ciklusa multipleks PCR. Primenom vrlo brze i jednostavne metode DNA ekstrakcije u trajanju od 10 min. , PCR ciklusa sa trajanjem od 35 min i brzom procedurom elektroforeze sa jednostavnim i jeftinim puferima uspeali su da za 15 min razdvoje PCR produkte. Klinički izolati precizno su identifikovani kao serovarijeteti *Salmonella* Typhi i β -laktamaze-kodirani β -laktamaze-kodirani β -laktamaze-kodirani Paratyphi. Uspeli su da zahvaljujući specifičnosti metode utvrde i unakrsnu reaktivnost sa ostalim sojevima enterobakterija. Osetljivost testa bila je od 1-10 ćelija. Ukupno vreme metode multipleks PCR od pripreme uzorka do krajnjeg rezultata bilo je 45 do 50 min. Ovi podaci ukazuju da specifičnost i osetljivost optimizovano brzog ciklusa multipleks PCR koji može poslužiti za brzu dijagnostiku *Salmonella* Typhi primenom konvencionalnih termalnih ciklusa. Ispitivana metoda smanjuje vreme PCR reakcije sa 3.5 h na manje od 60 min. Autori smatraju da se ovi nalazi mogu primeniti na druge PCR programe detekcije različitih gena koji omogućavaju istraživačima da znatno skrate svoje PCR metode.

Hong Y et al., (2009) izveštavaju da salmonele i dalje izazivaju značajne epidemije hranom. To najbolje ilustruje nedavna epidemija puterom od kikirikija, sirovim paradaizom i serano paprikama. Da bi se utvrdio mogući izvor epidemije, tipizacija bakterija je od suštinskog značaja za ovaj proces. Metoda PCR je postala važan instrument za detekciju patogena u hrani. Metoda može da identifikuje razlike ciljanjem gena ili sekvenci pokazujući polimorfizam ili varijabilnost u distribuciji u okviru bakterijske populacije. Preko 2.500 serovarijeteta *Salmonella enterica* identifikovano je na osnovu antigenskih razlika lipopolisaharida i flagelina do danas. Autori su razvili PCR šemu za identifikaciju O i H alela kod vrste *S. enterica* serovarijeteta Enteritidis, Hadar, Heidelberg, Typhimurium i drugih, sa istim alelima antigena , ali sa različitim O i H kombinacijama alela (npr *S. enterica* serov. Kentucky), i validirali ga kao potvrdu u identifikaciji uzoraka kontaminiranih ovim serovarima salmonela. Tačno

su identifikovani uzorci živine koji sadrže *S. enterica* serovare Enteritidis, Kentucky i Typhimurium skrinig metodom iz primarno obogaćenih briseva okoline. Metoda PCR se podudara (kappa vrednosti = 0.81 do 1.0) sa konvencionalnim metodama serotipizacije. Zajedno sa salmonela specifičanim PCR, kao što je invA, ovaj PCR za tipizaciju alela može poslužiti u identifikaciji salmonela i specifičnih *S. enterica* serovara prisutnih u hrani ili životnoj sredini. Autori su zaključili da se ovim metodama mogu smanjiti vreme i troškovi vezani za serotipizaciju konvencionalnim metodama.

O'Regan E et al., (2008) su vršili detekciju multiserotipizacije salmonela u uzorcima piletine metodom multipleks PCR. Serotipovi salmonela detektovani u piletini ovom metodom bili su Enteritidis, Gallinarum, Typhimurium, Kentucky i Dublin. Autori su paralelno uradili i izolaciju standardnom metodom u skladu sa EN ISO 6579: 2002 za detekciju salmonela u hrani. Multipleks PCR metoda je zasnovana na preobogaćenju u puferu (BPV) preko noći, zatim obogaćenju na Rapaport Vasiliadis soja bujonu (RVS) 6 sati i kasnijom ekstrakcijom DNK. Primenom obe metode detektovani su isti serotipovi. Metodom multipleks PCR detektovani su i sojevi salmonela u veštački kontaminiranim uzorcima piletine i identifikovani serotipovi. Granica detekcije za veštački kontaminirane uzorke piletine je između 1 i 10 CFU/ 25 g uzorka za obe metode. Ukupno 63 prirodno kontaminirana uzorka piletine su ispitivana primenom obe metode relativne tačnosti, relativne osetljivosti i relativne specifičnosti. Testirano je trideset kultura slepom probom i svi su ispravno identifikovani metodom multipleks PCR. Autori zaključuju da multipleks PCR metodologija može da doprinese brzom detekciji i identifikaciji salmonela u laboratorijama koje se bave ispitivanjem hrane.

Paião FG et al., (2013) izveštavaju da prisustvo salmonele u intestinalnom sistemu, na koži i perju piladi može izazvati kontaminaciju trupova tokom klanja i obrade i uvesti ovaj mikroorganizam u klanice. Zbog toga brz način da se identifikuju i prate salmonele i njihovi serovari na farmama postaje neophodan. Multipleks lančana reakcija polimeraze (m-PCR), primenom specifičnih prajmera, je razvijena metoda za detekciju i identifikaciju salmonela na nivou roda. Ovom

metodom su izolovani *Salmonella enterica* serovar Enteritidis i *S. enterica* serovar Typhimurium iz uzoraka briseva brojlera. Metoda je potvrđena testiranjem ekstrakta DNA 90 svežih kultura uzoraka kloakalnih briseva piladi kultivisanih u fosfatnom puferu peptonske vode na temperaturi od 37°C tokom 18 časova. Konačni rezultati su pokazali prisustvo *Salmonella* spp. u 25% uzoraka, od čega *S. Enteritidis* je bila prisutna u 12% od salmonela-pozitivnih uzoraka i *S. Typhimurium* u 3% uzoraka. Test m-PCR razvijen u ovoj studiji je specifična i brza alternativna metoda za identifikaciju salmonela vrsta i omogućava posmatranje kontaminacije specifičnim serovarom u terenskim uslovima, na mestima gde se ova pilad obično odgajaju.

Ribeiro SA et al.,(2009) izveštavaju da su *Salmonella* Pullorum (SP) i *Salmonella* Gallinarum (SG) veoma slične. One su uzročnici paratifusa i tifusa živine i ove dve bolesti su odgovorne za ekonomske gubitke u proizvodnji živine. Iako je SP i SG teško razlikovati u rutinskim laboratorijskim postupcima, sposobnost da metabolišu ornitin je biohemijski test koji se može koristiti za postizanje ovog cilja. Dok je SP u stanju da dekarboksiliše ovu aminoiselinu, SG to nije. Tokom izolacije sojeva javljaju se atipične biohemijske reakcije što otežava diferencijaciju. Jedan od gena odgovornih za metabolizam aminokiseline ornitina naziva se *speC* i nalazi se u oba serovarijeteta. Analiza 21 SP i 15 SG sojeva metodom PCR nije omogućila razlikovanje ova dva serovarijeteta, jer dobijeni fragmenti su identični. Međutim, nakon primene tretmana sa restrikcijom enzimom *Eco RI*, grupni obrazac svakog serotipa je bio drugačiji, čak i u uzorcima atipične biohemijske reakcije. Dobijeni podaci doprineli su standardizaciji tehnika za brzu i sigurnu diferencijaciju serovarijeteta Pullorum i Gallinarum.

Secundo de Souza AI et al.,(2015) izveštavaju da su *Salmonella* Gallinarum (SG) i *Salmonella* Pullorum (SP) klasifikovane kao biovarijeteti koji pripadaju *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum. Genetička raznolikost izolata istog biovarijeteta može se detektovati DNK tehnikama koje su korisne u epidemiološkim istraživanjima. Autori su primenili (Enterobacterial Repetitive

Intergenic Consensus sequences -ERIC-PCR) za analizu 45 sojeva SG i SP, od kojih je većina izolovana od zaražene peradi iz različitih regiona u Brazilu u periodu od 27 godina sve do 2014. godine. Dobijeni ERIC-genotipovi su korišćeni za opisivanje epidemiološke slike i odnosa među sojevima. Autori su ustanovili šest ERIC -obrazaca za sojeve SG sa 80% sličnosti. Osim toga, neki od SG izolata su skupljeni iz različitih regiona i godina sa 100% sličnosti, što ukazuje da je došlo do transfera genotipova između regiona. Kod komercijalnog soja u vakcini 9R utvrđen je jedinstveni profil. Autori su tokom ispitivanja uočili veću genetsku raznolikost kod sojeva *S. Pullorum* i uspjeli su da formiraju deset ERIC-obrazaca sa 80% sličnosti.

Turki Y et al., (2014) ispitivali su izolate vrste *Salmonella enterica* koji predstavljaju najčešće izolovan serotip u Tunisu. Izolatima je urađena genotipizacija i fenotipizacija a ERIC i ITS-PCR metodama ispitano je 48 izolata salmonela među kojima je detektovano 12 i 10 različitih profila. Distribucija profila među serotipovima pokazala je prisustvo sojeva sa identičnim fingerprinting obrascima. Svi salmonela sojevi korišćeni u ovoj studiji bili su pozitivni na *sdhA* gen. Tri salmonela izolata koji pripadaju serotipovima Anatum, Enteritidis i Amsterdam su bili negativni za *invA* gen. Gen *spvC* je otkriven u trinaest izolata koji pripadaju serotipovima Anatum, Typhimurium, Enteritidis, Gallinarum i Montevideo. Rezistencija na antimikrobna sredstva je česta među izolatima salmonela koji pripadaju serotipovima Anatum, Typhimurium, Enteritidis, Zanzibar i Derby. Većina ovih izolata ispoljila je rezistenciju na najmanje dve grupe antibiotika. Četiri multirezistentna izolata izolovana su iz hrane za životinje i živinskih proizvoda. Ovi izolati nisu pokazali samo rezistenciju na tetraciklin, sulfonamide i ampicilin, već i na fluorohinolone. Takođe je detektovana rezistencija na nalidiksinsku kiselinu, ciprofloksacin i ofloksacin kod dva soja *S. Anatum* i *S. Zanzibar* izolovanih iz sirovog mesa i živine. Osim toga, izolati od ljudi i otpadnih voda su češće bili rezistentni na nalidiksinsku kiselinu i tetracikline. Od ispitivanih izolata kod 33.5% utvrđena je sposobnost da formiraju biofilm.

Krawiec M et al., (2015) izveštavaju da su salmonela vrste rasprostranjene u okruženju i to kod goveda, svinja i ptica, uključujući i živinu i slobodne ptice. Tokom ove studije autori su detektovali salmonele kod različitih vrsta divljih ptica u Poljskoj, sa fokusom na pet serovara salmonela praćenih kod živine od strane Evropske Unije: serovari *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Virchow, i Hadar. Okarakterisali su im fenotipske i genetske varijacije. Izolati su klasifikovani u vrste i podvrste roda salmonela pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR). Prikupljeno je 64 salmonela izolata. Najveći broj izolata je prikupljen od evroazijskog češljugara i teksaškog vrabca. Utvrđeno je da prikupljeni sojevi pripadaju jednoj od tri salmonela podvrste: enterica (81.25%), salamae (17.19%), ili houtenae (1.56%). Osamnaest sojeva pripadalo je serovarijetetu *Salmonella* Typhimurium (28.13%), jedan serovar. Infantis (1.56%), jedan serovar. Virchow (1.56%), i jedan serovarijetet Hadar (1.56%). Autori su ustanovili da se izolati serovarijeteta *Salmonella* Typhimurium razlikuju iako potiču od iste vrste domaćina, ali su primetili sličnost kod sojeva izolovanih iz istog okruženja (npr, ista hranilica ili isto jezero). Rezultati potvrđuju da su neke divlje vrste ptica rezervoari salmonela, posebno serovarijeteta *Salmonella* Typhimurium.

Kozoderović G i sar. (2010) su ispitivali molekularnu tipizaciju i rezistotipizaciju zajedno sa gyrA polimorfizmom jednog nukleotida (SNP) kod 60 izolata *Salmonella* Enteritidis poreklom od živine, hrane i ljudi u Srbiji. Molekularna metoda fingerprinting je izvedena nasumično umnožavanjem polimorfne DNA (RAPD) uz korišćenje četiri prajmera, a indeks raznolikosti (D) iznosio je 0.688. U kombinaciji sa rezistotipizacijom i gyrA SNP, indeks D je porastao na 0,828. Dobijene su ukupno 23 genetske grupe. Kada su četiri RAPD prajmera u uzeta u kombinaciji, epidemični izolati iz restorana brze hrane su grupisani u prepoznatljive genetske grupe. Od 60 serovarijeteta *Salmonella* Enteritidis tri su bila multirezistentna na tri ili više antibiotika. Devet sojeva je bilo rezistentno na nalidiksinsku kiselinu. Mutacije na kvinolon rezistenciju-određenog regiona (QRDR) nađene su u NAL-rezistentnim sojevima što je pripisano Asp(87) → Asn šest sojeva, Asp(87) → Gly jedan soj, i Ser(83) → Phe jedan soj. Jedan NAL

rezistentni soj nije imao mutacije u (QRDR), ukazujući na druge mehanizme rezistencije.

Dione MM et al (2012) u Senegalu ispitivali su različite serotipove netifoidnih salmonela (NTS) koji su izolovani iz uzoraka koji su poticali sa farmi brojlera, pilećih leševa i od uličnih prodavaca. Zna se da živina i živinski proizvodi kontaminirani netifoidnim salmonelama jesu najčešći uzrok bolesti ljudi koje se prenose hranom. Autori su 261 izolat NTS ispitali DNK (RAPD) i (MLST) tehnikama. Autori su ustanovili 20 različitih profila RAPD koji odgovaraju različitim serotipovima (18). Sojevi iz svake od ovih 20 grupa su dalje analizirani korišćenjem MLST. Shodno tome, otkriveno je 12 novih MLST alela i 17 novih tipova sekvenci. Tri vrste sekvenci (S. Kentucky ST198, S. Agona ST13 i S. Istanbul ST33) su ranije opisani u Senegalu i drugim zemljama, što ukazuje da su ovi klonovi geografski široko distribuirani i da cirkulišu u velikom broju domaćina. Devet klonova je ispoljilo multirezistenciju na najčešće korišćene antibiotike kod ljudi i životinja. Međutim, pronađen je novi multirezistentni klon S. Kentucky ST832. Autori zaključuju da su ova ispitivanja doprinela boljem poynavanju genetskih raznolikosti NTS-a u Senegalu. Primenjene molekularne metode su od suštinskog značaja za bolje razumevanje epidemiologije NTS i praćenje izvora infekcije i / ili kontaminacije salmonelama.

Antunes P et al.,(2016) izveštavaju da salmoneloza ostaje jedna od najčešćih hranom prenosivih bolesti, i predstavlja veliki zdravstveni problem širom sveta. Trenutno, na globalnom nivou, uprkos uspehu mera kontrole salmonela sprovedenih u proizvodnji hrane industrijalizovanih zemalja, glavni izvor infekcije za ljude su mesni proizvodi, uključujući i potrošnju zaraženog mesa. U poslednjih nekoliko godina, promena serotipova salmonela koji se odnose na živinu i živinske proizvode je prijavljena u različitim geografskim regionima, koji su posebno u vezi sa širenjem nekih dobro prilagođenih klonova. Osim toga, smatra se da je rezistencija na antibiotike netifoidnih salmonela jedna od glavnih pretnji za javno zdravlje u vezi sa proizvodnjom hrane animalnog porekla, uključujući i lanac proizvodnje živine i živinskog mesa, što je dodatna briga u kontroli

salmoneloze. Cirkulacija istih multirezistentnih klonova salmonela i / ili identičnih mobilnih genetičkih elemenata koji kodiraju gene antibioretencije sa živine na ljude daje poseban značaj ovom ispitivanju. Svrha ovog pregleda je da ukaže na ulogu mesa živine kada su u pitanju salmoneloze na globalnom nivou. Sa povećanjem globalizacije potrošnje namirnica kao što je meso živine, mogu nastati novi problemi u pogledu kontrole salmoneloze. Stoga je, zaključuju autori, potrebno pripremiti nove programe i strategije sa merama kontrole duž celog lanca ishrane.

Kristinsson KG et al., (2015) izveštavaju da je pristup bezbednoj hrani privilegija za ljude koji žive na Islandu. Nagli porast rezistencije na antibiotike, u vezi je sa uslovima na farmi kao i upotrebom antibiotika u poljoprivredi što predstavlja glavnu pretnju za javno zdravlje. Trgovinska razmena hrane između zemalja i kontinenata olakšava globalno širenje patogena i njihove rezistencije. Islandska poljoprivreda ima prednosti zbog svoje izolacije i male površine. Nakon intervencije da se smanji učestalost vrsta *Campylobacter* i *Salmonella* na farmi živine, incidenca humane kampilobakterioze je 17-43 / 100.000, od čega je oko polovina infekcija sa autohtonim sojevima i infekcije salmonelama 10-15 /100.000 uglavnom stečenih u inostranstvu. Pošto enterohemoragična *E. coli* (EHEC) nije detektovana kod autohtonih životinja, niska incidenca infekcija nije iznenađujuća. (0-0.6/100.000/god). Nedavna epidemija izazvana multirezistentnim enterohemoragičnim sojem *E. coli* (*Enterohaemorrhagic E. coli* - EHEC) je vezana za uvoz zelene salate. Upotreba antibiotika u islandskoj poljoprivredi je među najnižim u Evropi i infekcije izazvane vrstama iz roda *Salmonella* i *Campylobacter* su retko izazvane rezistentnim sojevima. Enterobakterije koje proizvode karbapenemaze nisu otkrivene na Islandu. Niska upotreba antibiotika u islandskoj poljoprivredi kao i akcije koje su sprovedene radi ograničenja širenja vrsta iz rodova *Campylobacter* i *Salmonella* dale su rezultate. Autori zaključuju da javnost mora biti obavještena o važnosti porekla hrane, kao i činjenici da se islandski prehrambeni proizvodi ubrajaju među najsigurnije.

Busani L et al.,(2004) ispitivali su osetljivost na antimikrobna sredstva izolovanih serotipova vrste *Salmonella enterica*: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Infantis poreklom od ljudi, prehrambenih proizvoda i farmских životinja u Italiji, između 1999. i 2001. godine. Svi izolati su bili osetljivi na cefotaksim i ciprofloksacin, ali je visok stepen rezistencije zabeležen na nekoliko drugih antibiotika, posebno kod *Salmonella* Typhimurium. Stepen rezistencije i multirezistencije bio je generalno viši kod izolata od životinja i prehrambenih artikala nego kod ljudi, dok nikakva značajnija razlika nije zapažena kod izolata od životinja i hrane. Kada je *Salmonella* Typhimurium u pitanju, multirezistencija je bila češća kod izolata poreklom od goveda, živine i zečeva nego od svinja. Rezistencija na trimetoprim i sulfametoksazol uglavnom je bila utvrđena kod izolata poreklom od svinja i ljudi. Ova studija potvrđuje ulogu životinja kao izvora *Salmonella* spp i naglašava potrebu za integrisanim sistemom nadzora rezistencije na antibiotike.

Boris Habrun et al.,(2012) su vršili determinaciju, minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) za 158 izolata vrste *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Najveći broj izolata pripadao je serovaru *S. Enteritidis* 54 (34%), *S. Mbandaka* 49 (31%) i *S. Infantis* 19 (12%). Određivane su vrednosti MIC za ciprofloksacin, cefotaksim, trimetoprim, ampicilin, nalidiksinsku kiselinu, gentamicin, hloramfenikol, tetraciklin, streptomycin i sulfamethokazol. Svi testirani izolati bili su osetljivi na hloramfenikol i streptomycin. Ukupno 157 (99.3%) izolata bilo je osetljivo na gentamicin, 156 (98.7%) na cefotaksim, 154 (97.5%) na tetraciklin, 151 (95,5%) na trimetoprim i ampicilin, 135 (85.4%) na ciprofloksacin, 128 (81%) na sulfamethokazol i 92 (58%) na nalidiksinsku kiselinu. Prema broju antimikrobnih sredstava uključujući individualnu rezistenciju 66 (41.7%) izolata je bilo osetljivo na sva antimikrobna sredstva, 68 (43%) su bili rezistentni na jedno antimikrobno sredstvo, 20 (12,7%) na dva antimikrobna sredstva i 4 (2.6%) na tri testirana antimikrobna sredstva. U poređenju sa nivoom rezistencije *Salmonella* spp u drugim evropskim zemljama, autori su zaključili da sojevi *Salmonella* spp izolovani iz živine u Hrvatskoj imaju zadovoljavajuću osetljivost na antimikrobne lekove.

Parry CM (2003) ispitivao je obrasce rezistencije na antibiotike *Salmonella* spp. Autor iznosi podatke da je rezistencija na hloramfenikol i ampicilin česta kod *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Paratyphi A u Aziji i nekoliko zemalja u Africi. Izolati *Salmonella* Typhimurium DT 104 dosta su česti kod ljudi i životinja u mnogim industrijskim zemljama. U zaključku autor iznosi podatak da se rezistencija povećava na nekoliko antibiotika koji se koriste u lečenju invazivnih salmoneloza, uključujući i cefalosporine i hinolone sa proširenim spektrom delovanja. U siromašnim zemljama ovakve infekcije salmonelom rezistentnom na više vrsta antibiotika mogu postati neizlečive.

Mercado E et al., (1984) u Argentini su kod ukupno 85 netifoidnih vrsta salmonela, izolovanih iz različitih proizvoda životinjskog porekla u periodu od 1982 do 1987. godine ispitivali osetljivost na antimikrobna sredstva primenom dilucione metode u agaru. Autori su na osnovu rezultata ustanovili da je 25,3% izolata bilo rezistentno na ampicilin, cefalotin i streptomycin, a osetljivo na hloramfenikol, tetraciklin, gentamicin, amikacin, kanamicin i trimetoprim-sulfametoksazol.

Meunier D et al. (2002) su identifikovali *Salmonella* genom Island I (SGI1) u izolatima *Salmonella* enterica serovarijetet S. Paratyphi B. Navedeni serovarijetet je najčešće izolovan iz uzoraka morskih plodova uvezenih iz azijskih zemalja. Ovaj gen antibioretencije koji daje multirezistenciju je prethodno identifikovan kod *S. enterica* serovarijetet S Typhimurium i fagotipa DT 104 i DT 120 i kod *S. enterica* serovarijetet S. Agona. Autori su identifikovali SGI1 kod S. Paratyphi B sojeva. Ovi podaci zajedno sa identifikacijom SGI1 kod S. Agona i S. Typhimurium sojeva ukazuju na horizontalni tranfer gena u ovom regionu. Utvrdili su da SGI1 ima istu hromozomsku lokaciju kod S. Typhimurium, S. Agona i S. Paratyphi B što ukazuje da je umetanje došlo homologom rekombinacijom možda transdukcijom faga. Ova hipoteza je eksperimentalno podržana činjenicom da geni rezistencije serotip Typhimurium DT 104 mogu biti efikasno transdukovani preko P22-like faga ES18 i faga PDT17 koji se oslobađaju iz svih analiziranih DT 104 izolata. Saznanja o SGI1 mogu biti ključni faktor DT 104 epidemija širom sveta i ne samo kroz selekciju upotrebe antimikrobnih sredstava

već i mogućim virulentnim svojstvima SGI1. Zbog toga dalji nadzor ne garantuje za pojavu horizontalnog transfera SGI1 serotipova *S. enterica* što ima javni zdravstveni značaj.

Camarda A et al. (2013) ispitivali su 24 *Salmonella enterica* izolata (13 serovara Enteritidis i 11 Typhimurium) izolovanih od 5.600 uzoraka iz intenzivnog uzgoja farmi koka nosilja u Italiji od 1998-2007 god. Izolati su ispitivani na prisustvo gena rezistencije, pulsotip i tip faga. Većina *Salmonella* Typhimurium sojeva su pulsotip STYMXB.0147 (81.8%), tip faga DT143 i rezistentni su na sulfametoksazole kodirani sa sul2. Identifikovana su dva multirezistentna soja (MDR). Jedan soj, STYMXB.0061 je bio rezistentan na ampicilin (A), hloramfenikol (C), streptomycin (S), sulfametoksazol (Su) i tetraciklin (T), kodiran od strane *Salmonella* Genomic Island SGI1. Drugi MDR soj, STYMXB.0110 je bio rezistentan na SSuT kodiran od strane sul1 i sul2, aadA1 i tet(C-okružen IS26 elementom. Kod tet gena tet(C) zabeležen je nizak nivo rezistencije i to veoma retko kod *Salmonella* Typhimurium živine. U trenutnoj studiji, MIC vrednosti (32 µg/mL) su u skladu sa graničnom vrednošću (≥16 µg/mL) kod *Enterobacteriaceae*. Većina sojeva *S. Enteritidis* je rezistentna na Su (kodirano sa sul2). Jedan MDR soj (ANxSSuT) je identifikovan. Sa izuzetkom nalidiksinske kiseline (Nx), rezistencija je kodirana sa bla(TEM), strAB, sul2 i tet(A) čiji je nosilac IncN konjugovani plazmid. Svi izolati su pulsotipe SENTXB.0001 sa PT14b kao najčešćim identifikovanim tipom faga (57,1%). U Evropi, SENTXB.000 je dominantan profil PFGE iz kliničkih materijala i identifikacija PT14b je stalno u porastu od 2001. Nalazi predstavljeni u ovoj studiji ukazuju na potencijalno širenje *S. Enteritidis* PT14b i *S. Typhimurium* DT143 što je od posebnog značaja za nastanak zoonoze. Prisustvo gena rezistencije i genetskih elemenata (konjugovanog plazmida i IS elementa) ističe potrebu za procenom rutinskih ispitivanja živinarskih farmi koje su pogodne za širenje rezistencije na antibiotike što je važno za javno zdravlje.

Löfström et al. (2015) izveštavaju da je *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium je jedan od najčešćih serovara u Evropi gde su živina i živinski proizvodi uobičajeni izvori salmoneloze kod ljudi. Zbog efikasnih

programa kontrole prevalencija *S. Typhimurium* u živinarskoj proizvodnji u Danskoj je vrlo niska. Uprkos tome tokom poslednjih decenija došlo je do pojave infekcije fagotipom DT41 *S. Typhimurium* u živinarskoj proizvodnji bez identifikacije izvora. Krajem 2013 godine i početkom 2014. povećana izolacija *S. Typhimurium* DT41 je zabeležena u proizvodnji ali i drugim uzorcima. Da istraže ovo detaljnije 47 izolata jaja od koka nosilja ($n = 5$, 1 jato), brojlera ($N = 33$, 13 jata), brojlera za uzgoje i nosilja jaj za nasad ($n = 5$; 2 jata i 1 uzorak iz okoline), hrane za životinje ($n = 1$), klanica živine ($n = 3$, uzorak iz okoline i mesa) je (MLVA) analizirano, zatim (PFGE) tipizirano sa ciljem utvrđivanja epidemiologije novih slučajeva. Bazirani na PFGE izolati su bili podeljeni u četiri grupe (Simpson's index of diversity (DI)= 0.24 ± 0.15). Zbog niskog DI, PFGE nije bila dovoljna da pruži informacije o novim slučajevima epidemije. MLVA tipizacija DT41 (42/47 izolata) i RDNC izolati (5/47) bili su podeljeni u devet grupa (DI= 0.65 ± 0.14). Kada je maksimalna razlika u jednom lokusu dozvoljena oni mogu biti podeljeni u četiri grupe. Koristeći ovaj kriterijum, u kombinaciji sa epidemiološkim podacima, širenje jednog tipa salmonele od objekta za uzgoj preko brojlera do klanice za živinu, smatraju autori, prihvatljivo. Evidentirano je da je širenje u proizvodnoj piramidi brojlera dovelo do iznenadnog povećanja *S. Typhimurium* DT41. Da bi istražili detaljnije, buduća ispitivanja uključujući ceo genom kako bi se dobio veći diskriminacioni kvalitet, treba uključivati i izolate iz dužeg vremenskog perioda i iz različitih izvora.

Sapkota AR et.al. (2014) su ispitivali široku primenu antibiotika u proizvodnji živine u SAD. Kao posledica toga kod velikog broja izolovanih sojeva salmonela sa konvencionalnih farmi živine kao i iz proizvoda u maloprodajiotkrivena je rezistencija na antibiotike. Testirali su velike živinarske farme preorjentisane sa konvencionalne na organsku proizvodnju, gde je obustavljena primena antibiotika. U cilju izolacije salmonela ispitali su po 10 uzoraka (prostirke, vode i hrane) sa novih organskih i sa 10 konvencionalnih farmi živine. Izolaciju salmonela radili su primenom standardnih metoda obogaćivanja. Izolati su identifikovani korišćenjem standardnih biohemijskih testova i primenom Vitek®2 Compact System-a. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike vršeno je Sensititre®

mikrodilucijom u bujonu. Na obe farme ustanovili su prisustvo više serovarijeteta salmonela. Najzastupljeniji serovarijeteti bili su *Salmonella* Kentucky, zatim *S. Orion*, *S. Enteritidis*, *S. Gostrup* i *S. Infantis*. Od 41.izolata *Salmonella* Kentucky utvrđena je rezistencija statistički značajno manja kod izolata dobijenih sa organskih nego sa konvencionalnih farmi na kojima je živina gajena: amoksisicilin-klavulanatom ($p = 0,049$), ampicilin ($p = 0,042$), cefoksitin ($P = 0.042$), ceftiofur ($p = 0,043$) i ceftriakson ($p = 0.042$). Procenat multirezistencije (rezistencija na ≥ 3 antimikrobnih klasa) je takođe bio statistički značajno niži među *Salmonella* Kentucky izolatima iz objekata sa organskim načinom uzgoja (6%) u odnosu na izolate iz konvencionalnih objekata (44%) ($p = 0,015$). Prema saznanjima autora, ovo su prvi podaci u SAD koji su odmah pokazali, promene na farmama u rasprostranjenosti antibioretencije salmonela posle povlačenja antibiotika iz upotrebe u velikim živinarskim objektima sa organskom proizvodnjom.

Schwarz i Chaslus-Dancla E (2001) vršili su pregled upotrebe antimikrobnih sredstava u veterinarskoj medicini i fabrikama stočne hrane kao i mogućim posledicama zbog široke rasprostranjenosti i višenamenske upotrebe antibiotika. Autori detaljno izveštavaju o mehanizmima koje su bakterije razvile da bi izbegle inhibitorne efekte najčešće korišćenih antibiotika u veterinarskoj medicini. Rezistencija bakterija na tetraciklin, makrolidne antibiotike, β -laktamske antibiotike, aminoglikozide, sulfonamide, trimetoprim, fluorohinolone i hloramfenikol, opisana je u odnosu na enzimsku inaktivaciju, smanjenu intracelularnu koncentraciju leka i modifikaciju položaja ciljnih mesta.

San Martin et al. (2005) ispitivali su dilucionom metodom u agaru osetljivost na antimikrobna sredstva 94 vrste salmonela izolovanih sa različitih živinarskih farmi u Čileu (brojlerske farme, farme koka nosilja). Rezultati su pokazali da je 38 izolata bilo rezistentno na flumekvin, nalidiksinsku kiselinu i oksolinsku kiselinu. Autori navode da je ovo prva studija koja opisuje rezistenciju izolata salmonela na hinolon i fluorohinolon na živinarskim farmama u Čileu, što ukazuje na

potrebu formiranja programa za monitoring upotrebe antimikrobnih lekova u veterinarskoj medicini.

Wedel SD et al. (2005) upoređivali su rezistenciju na antimikrobna sredstva kod 1.028 izolata poreklom od ljudi i 716 izolata *Salmonella enterica* serotip Typhimurium poreklom od životinja, u Minesoti od 1997-2003. godine. Prema rezultatima, 29% izolata bilo je rezistentno na više vrsta antimikrobnih preparata. Dominantni fenotipovi uključivali su rezistenciju na ampicilin, hloramfenikol ili kanamicin, streptomycin, sulfisoksazol i tetraciklin. Izolati od životinja uglavnom su poticali od goveda i svinja, a 81% je bilo rezistentno na više antibiotika. Dobijeni rezultati podržavaju hipotezu da su životinje za proizvodnju hrane primarni rezervoar serovarijeteta *Salmonella* Typhimurium koja je rezistentna na više vrsta antibiotika.

Pope C et al. (2005) izučavali su vrstu *Salmonella enterica* serovar Newport kao uzročnika septikemije kod ljudi i životinja i njegovu rezistenciju na cefalosporine širokog spektra delovanja. Mehanizmi pomoću kojih serovar Newport postaje rezistentan na cefalosporine kao i na neke druge grupe antibiotika, prilikom naseljavanja intestinalnog sistema, nisu potpuno jasni. Autori su ovim ispitivanjem pokazali da *Salmonella enterica* serovar Newport, može postati rezistentna na cefalosporine i na neke druge antibiotike preko konjugativnog plazmida *E. coli* odgovornog za rezistenciju.

Pulido-Landínez M et.al.(2014) su prikupili 50 izolata salmonela da bi dobili informaciju o salmonelama iz komercijalnih jata i živine iz okruženja Misisipija. *Salmonella enterica* izolati su okarakterisani putem ISR (intergenic sequence ribotyping) i određen im je test osjetljivosti na antibiotike. Primenom ISR metode izvršena je serotipizacija svih izolata (50) *Salmonella enterica* dok je primenom Kauffman-White-LeMinor šeme detektovano 48 serotipova. Podudarnost ovih metoda je $k = 89.58$. U okviru skupa, detektovano je 12 serotipova. Obrascima antimikrobne rezistencije (ARP) 12 serotipova: Enteritidis, Typhimurium, Kentucky, Bredeney, Mbandaka, Saintpaul, Montevideo, Cubana, Lille, Senftenberg, Johannesburg i jednom serotipu

UN0094, utvrđene su minimalne inhibitorne koncentracije. Antibiogrami su pokazali razlike među serotipovima i među izolatima istog serotipa. Svi izolati su 100% osjetljivi na enroflokacin i trimetoprim-sulfametoksazol. Broj antimikrobnih lekova na koje su izolati bili rezistentni kretao se od dva do devet. Dvadeset dva različita ARPs su identifikovana i ARP1, sa rezistencijom na spektinomycin i na sulfadimetoksin. Četrdeset izolata (80%) su rezistentni na tri ili više antimikrobnih lekova i stoga su označeni kao multirezistentni. Detekcija jedinstvenog serotipa, i varijacije u antibiogramima u okviru seta, ukazuje da je važno povremeno ispitati izolate iz regiona i pratiti epidemiološke trendove.

Chotinun S et al., (2014) ukazuju da je salmonela glavni patogen koji se prenosi hranom širom svijeta, uključujući i Tajland. Poznato je da se živinskim mesom bolest sa životinja prenosi na ljude. Autori su ispitivali prisustvo i karakteristike *Salmonella* izolovanih sa 41 manje klanice živine u Ciang Maiu, Tajland tokom jula 2011. godine do maja 2012.godine. Prevalencija salmonela kod žive živine, leševa, otpadnih voda i tla oko postrojenja za preradu kretala se : 3,2%, 7,3 %, 22.0% i 29.0%. Identifikovano je osamnaest različitih serotipova. Najčešći utvrđeni serotipovi bili su Corvallis (15,2%), zatim Rissen (13,9%), Hadar (12,7%), Enteritidis (10,1%), [I. 4,5,12: i: -] (8,8%), Stanley (8,8%), i Welteverden (8,8%). Testovima antimikrobne osetljivosti otkrili su da je 68,4% salmonela vrsta rezistentno na najmanje jedan antibiotik, dok je 50.6% pokazalo multirezistenciju (MDR). Konkretno, 44,3% salmonela je bilo rezistentno na nalidiksinsku kiselinu, zatim streptomycin (41.8%), ampicilin (34,2%), tetraciklin (34.2%) i sulfametoksazol / trimetoprim (20,3%). Kontaminacija salmonelama utvrđena je u linijama za preradu, leševima i u okruženju pogona za preradu. Ovi nalazi ukazuju na to da je poboljšanje higijene u živinskim klanicama malih kapaciteta, kao i razumno korišćenje antimikrobnih lekova hitno potrebno u cilju smanjenja kontaminacije salmonelom.

Dahshan H et al., (2015) izveštavaju da, proizvodnja živine u Egiptu predstavlja jedan od glavnih izvora zagađenja životne sredine veterinarskim antibioticima (VAs). Oko 80% proizvodnje mesa u Egiptu je poreklom od živine i potencijalni

rizici za životnu sredinu u vezi sa upotrebom veterinarskih antibiotika na ovim farmama još uvek nisu adekvatno ispitani. Zato su osnovni ciljevi ovog istraživanja bili da se proceni prevalencija rezistencije na antimikrobne lekove ključnih enterobakterija, pojava rezidua antibiotika na farmama živine i uzorcima iz životne sredine i da se utvrdi da li je đubrenje zemljišta prostirkom iz živinarskih farmi ekološki rizično. Od decembra 2011. do septembra 2012. godine, ukupno 225 otpadaka, bačenih ptica i uzoraka vode su prikupljeni od 75 nasumično odabranih farmi brojlera. Detektovana je visoka prevalenca *Escherichia coli* (n=179; 79.5 %) ,što je u suprotnosti sa niskom prevalencijom *Salmonella* spp. (n=7; 3.1 %). Među *E. coli* izolatima najčešći serotipovi bili su: O142:K86, O125:K70, O91:K, i O119:K69. U međuvremenu su pronađeni *Salmonella enterica* serotip Emek i Enteritidis. Kristeći disk difuzionu metodu autori su detektovali češću rezistenciju i multirezistenciju kod brojlera. Rezidue tetraciklina i ciprofloksacina su detektovane na 2.125 i 1.401 mg kg (-1) srednji nivo, u uzorcima životne sredine kontaminiranih rezistentnim sojevima *E. coli* pomoću HPLC. Procenjujući rizik autori ističu da ostaci tetraciklina u živinarskim otpacima predstavljaju ekološke rizike i da je vrednost količnika opasnosti iznad 1 (1,64). Ovo ispitivanje je ukazalo da se neefikasno sprovode veterinarski zakoni koji su neophodni u kontroli korišćenja antibiotika, što predstavlja potencijalni rizik po zdravlje i životnu sredinu.

Donado-Godoy P et al., (2015) imali su za cilj, kao korak ka implementaciji sledećeg programa: Colombian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (COIPARS), utvrde osnovne obrasce antimikrobne rezistencije *Salmonella* serovara, *Escherichia coli* i *Enterococcus* spp izolovanih iz maloprodaje mesa, samostalnih radnji i od glavnog distributera. MICs izolata su određeni za antimikrobna sredstva koja se koriste za ljude i životinje, koristeći automatizovani sistem. *Salmonella* serovari su izolovani iz 26% uzoraka mesa i *E. coli* od 83%, dok su *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* detektovani u 81 i 13% uzoraka mesa. Autori zaključuju da je skoro 98% testiranih izolata multirezistentno. Ceftiofur, enroflokacin, nalidiksinska kiselina i tetraciklin su antimikrobni lekovi na koje je utvrđen najveći stepen rezistencije

izolata *Salmonella* i *E. coli*. Za Enterococcus, 61,5% izolata *E. faecium* je rezistentno na kvinupristin-dalfopristin. Ovo je značajno jer se koristi za lečenje bolničkih infekcija kada je prisutna rezistencija na vankomicin. Rezistencija na vankomicin je detektovana kod 4% izolata *E. faecalis*. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na potrebu za brзом realizacijom integrisanog programa za nadzor nad antimikrobnom rezistencijom od strane kolumbijskih vlasti u cilju praćenja trendova, podizanja svesti i pomoći u promovisanju prakse u zaštiti kasnije generacije antimikrobnih lekova

Im MC et al. (2015) su ispitivali salmonelozu, najčešću bolest izazvanu hranom. Izbijanje ove bolesti je često povezano sa jajima. Autori su ispitivali prevalenciju i karakteristike salmonela na farmi kokošaka u Koreji. Postoje faktori rizika koji utiču na učestalost salmoneloze na ovim farmama. Od 32 farme i 67 ispitanih jata, 19 farmi (59,3%) i 34 jata (50,7%) su bili pozitivni na salmonelu. Salmonela je detektovana u okruženju, kao što je feces (41,8%), prašina (40,3%), ljuske od jaja (17,2%), kao i unutrašnji sadržaj jaja (5,2%). Prevalencija pozitivnih nalaza na salmonele se povećava kada je jato veće ($p = 0.021$). Razlike u regionima takođe utiču na učestalost nalaza salmonela ($p < 0,001$). Najčešće uočeni serovari *Salmonella* u jatima su *Salmonella* Bareilly (41,2%), *Salmonella* Mbandaka (32,4%) i *Salmonella* Rissen (17,6%). Kod dvadeset izolata iz jata detektovana je kontaminacija sa više serovarijeteta (2 do 4). Ispitivanje antimikrobne osetljivosti je pokazalo da je 93 od 101 izolata osetljivo na 17 testiranih antimikrobnih lekova. Ostali izolati pokazuju rezistenciju na ampicilin (4,0%), nalidiksinsku kiselinu (3,0%), tetraciklin (1,0%), cefalotin (1,0%) i gentamicin (1,0%). Salmoneloza kod ljudi je u korelaciji sa potrošnjom živinskih proizvoda širom sveta. Kontinuirane studije su potrebne da se smanji kontaminacija farmi nosilja i proizvoda od jaja salmonelama.

Yoon RH et al. (2014) su ispitivali kontaminaciju pačijeg i pilećeg mesa salmonelama prikupljenog iz supermarketa, tradicionalnih marketa, internet tržnih centara i veletržnice u Jeonaldu (Južnoj Koreja) u 2013.godini. Kontaminacija salmonelama je utvđena u 51,3% uzoraka pačijeg mesa i 3,7% uzoraka pilećeg

mesa. Kontaminacija uzoraka pačijeg mesa salmonelama razlikuje se prema vrsti mesa, odnosno, 69,8% u uzorcima celih pataka i 33,9% u uzorcima komada. Identifikovano je šest serotipova od 64 izolata salmonela u pačetini: *Salmonella* Typhimurium (37.5%), *Salmonella* Enteritidis (21.8%), *Salmonella* Stanley (3.1%), *Salmonella* Regent (1.6%), *Salmonella* Winterthur (3.1%) i *Salmonella* Westhampton (1.6%). Svi izolati su rezistentni na jedan ili više antibiotika. Rezistencija na sulfafurazol je najčešća (93.8% izolata), zatim rezistencija na nalidiksinsku kiselinu (59.4%), ceftazidim (26,6%) i ampicilin (26,6%). Prema saznanjima autora, ova studija je prva koja izveštava o kontaminaciji pačijeg mesa iz Koreje salmonelama. Pačije meso treba uzeti u obzir kao važan izvor patogena u hrani.

Tiriziu E et al., (2015) imali su za cilj da ispitaju pojavu salmonela u uzorcima sirovog pilećeg mesa, prikupljenih na rumunskoj obali, i da ocene antimikrobnu osetljivost izolata. U 2012. godini je ispitivano 317 uzoraka pilećeg mesa iz klanica (n = 289) i maloprodajnih objekata (N = 28). Generalno, 13.2% (42) uzoraka je bilo kontaminirano salmonelama, 12.8% (37) pilećih trupova iz klanicama i 17.8% (5) svežeg mesa iz maloprodajnih objekata. Identifikovano je osam serotipova *Salmonella enterica* subsp. *enterica*: Infantis (18 izolata), Bredeney (7), Virchow (6), Djugu (4), Grampian (4), Brandenburg (1), Derby (1), i Ruzizi (1). Izolati su rezistentni na tetraciklin (66,6% izolata), nalidiksinsku kiselinu (64,3%), sulfametoksazol (64,3%), ciprofloksacin (61,9%), streptomycin (59,5%), trimetoprima (33,3%), ampicilin (9,5%), hloramfenikol (7,1%) i gentamicin (2.4%). Rezistencija nije utvrđena na cefotaksim i ceftazidim. Trideset (71.4%) od 42 testirana izolata bilo je multirezistentno na najmanje dva antimikrobna sredstva. Ovo istraživanje je istaklo da kontaminacija multirezistentnom salmonelom sirovog pilećeg mesa u ovoj oblasti Rumunije, može ozbiljno ugroziti zdravlje ljudi.

Todorović D i sar., (2015) su sproveli istraživanje s ciljem determinacije gena odgovornih za rezistenciju na tetraciklin (TET) Rezistencija na TET sojeva *S. Infantis* iz Srbije je važna osobina klonova. *Salmonella* Infantis je izolovana sa 28

živinskih farmi od 55 u sjevernom djelu Srbije. Detektovana su tri rezistotipa, ali prevalencija rezistencije bila je na NAL i TET kod 18 izolata. Dva izolata su rezistentna samo na NAL i osam izolata je osjetljivo na antibiotike. Minimalna inhibitorna koncentracija MIC na TET kretala se u rasponu od 1-256 mg/L. Za 13 izolata MIC na TET je iznosio 256 mg/L, za četiri izolata MIC je iznosio 128 mg/L i jedan izolat je imao MIC 64 mg/L. Deset izolata je MIC od 1mg/L. Bilo je očigledno da je *Salmonella* Infantis prisutna i kod brojlera i kod nosilja. Tokom ovog istraživanja, detektovani su tetA geni i odgovarajući tetR geni (encoding the repressor protein) i hromozomski segment Tn1721 koji je odgovoran za rezistenciju na TET. Prisustvo ne konjugovanog transposona iz ne konjugovanog plazmida omogućava širenje rezistencije na TET kod *Salmonella*. Zaključeno je da bi bolje biosigurnosne mere na živinarskim farma bile najbolja opcija za eliminaciju infekcija jata živine u Srbiji salmonela vrstama. Racionalna upotreba antibiotika je neophodna bi se sprečilo dalje širenje otpornih klonova *Salmonella* Infantis.

Cardinale E et al., (2005) određivali su obrazce antibioretencije, elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE), sojeva koji pripadaju ovim serovarima i procenu značaja mesa brojlera u nastanku infekcije kod ljudi. *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Brancaster i *Salmonella* Enteritidis su serovari *Salmonella* enterica ssp. *enterica* izolovani iz živine u Senegalu. Analizirano je ukupno 142 salmonela izolata 79 su izolovani od senegalskih pacijenata sa sporadičnom dijarejom (11 S. Hadar, 9 S. Brancaster i 59 S. Enteritidis) i 63 od živine (30 S. Hadar, 17 S. Brancaster i 16 S. Enteritidis). PFGE od XbaI- i SpeI-razložene hromozomske DNA daju 20 različitih profila za S. Hadar, 9 za S. Brancaster i 22 S. Enteritidis. Svaki serovar karakteriše veliki pulsotipe koji je X3S1 u 42% za S. Hadar, X8S1 u 53.8% za S. Brancaster i X1S2 u 43% za S. Enteritidis izolate. Izolati salmonela od ljudi i živine imali su zajedničke PFGE obrasce. Testovi osjetljivosti su pokazali multiresistenciju (više od dva leka) 14.5% za S. Hadar i 5% kod S. Enteritidis izolata. Rezistencija na kvinolone je od posebnog značaja i 14.5% S. Hadar izolata su rezistentni na nalidiksinsku kiselinu. Zaključak ove studije bi bio da razmena sličnih PFGE profila među

izolatima kod ljudi i živine je indirektan dokaz da se salmonela prenosi kontaminiranim mesom brojlera. Većina salmonela izolata ostao je osjetljiv na lekove. Potrebni su naponi da se salmonela eliminiše iz mesa za ljudsku ishranu. Ova studija je takođe istakla značaj monitoringa antibiotezistencije bakterija koje su povezane sa životinjama i ljudima.

Chaisatit C et al., (2012) vršili su procenu kontaminacije bakterijama rezistentnim na antibiotike pilećeg mesa uzorkovanog iz supermarketa u Bangkoku, Tajland. Prevalenca *Salmonella enterica* i *Escherichia coli* je 18,7% (14/75) i 53% (106/200). Analiza najverovatnijeg broja (MPN) je pokazala da 56,7% uzoraka (34/60) prelazi dozvoljenu granicu koliformnih bakterija u pilećem mesu, gdje je maksimum 46,000 MPN/g. Pronađeni su multirezistentni fenotipovi i *S. enterica* i *E. coli*. Prisustvo klase 1 integrona dokazano je polimeraza lančanom reakcijom (PCR) i dot-blot hibridizacijom (dot-blot hybridization) Metodom PCR je utvrđeno prisustvo klase 1 integrona u 42,9% (6/14) izolata *S. enterica* i u 37,7% (40/106) izolata *E. coli*. Rezistentni geni identifikovani u ovoj studiji su aadA2, aadA4, aadA22, i aadA23 (za rezistenciju na aminoglikozide); dfrA5 (za rezistenciju na trimetoprim), i lnuF (za rezistenciju na linkozamide). Četiri izolata *S. enterica* podvrgnuta su metodi multilokularne tipizacije i sekvenciranja i kao rezultat dobijeni su tipovi sekvenci (ST) 50, ST 96, ST 1543, i ST 1549, koji odgovaraju sojevima iz mnogih zemalja što ukazuje na njihovu veliku rasprostranjenost. Ova studija je pokazala da su integroni klase 1 rasprostranjeni unutar zajedničkih izvora i to može imati važnu ulogu u horizontalnom transferu gena rezistencije na antimikrobne lekove.

Diarra MS et al., (2014) ispitivali su rezistenciju na antimikrobne lekove, fenotip i genotip salmonela izolovanih iz objekata za uzgoj brojlera. Ispitano je 193 izolata salmonela sa komercijalnih farmi u Britanskoj Kolumbiji, u Kanadi. Antibiotezistencija izolata je ispitivana Sensitar sistemom. Geni rezistencije i virulencije su detektovani metodom PCR a genetska raznolikost je utvrđena elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE). Identifikovano je sedamnaest serovarijeteta salmonela. Najzastupljeniji serovarijeteti salmonela

bili su: Kentucky (29.0% izolata), Typhimurium (23.8%), Enteritidis (13.5%), i Hadar (11.9%); serovarijeteti Heidelberg, Brandenburg, i Thompson su identifikovani kod 7.7, 4.1, i 3.6% izolata. Preko 43% izolata je istovremeno bilo rezistentno na ampicilin, amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, ceftiofur, cefoksitin i ceftriakson. Obrazac β -laktamske rezistencije zabeležen je u 33 (58,9%) *Salmonella* Kentucky izolata; 2 od ovih izolata su takođe bili rezistentni na hloramfenikol, streptomycin, sulfafurazol i tetraciklin. Gene rezistencije na aminoglikozide (aadA1, aadA2 i strA), β -lactams (blaCMY-2, blaSHV, i blaTEM), tetracikline (tetA i tetB) i sulfonamide (sul1) autori su detektovali među određenim rezistentnim izolatima. Invazin gen (invA) i plazmidi gena virulencije salmonela (spvC) su detektovani kod 97.9 i 25.9% izolata, kod 33(71.7%) od 46 *Salmonella* Typhimurium izolata i kod 17(65.4%) od 26 *Salmonella* Enteritidis izolata koji nose oba gena invA i spvC. Tipizacijom PFGE otkriveno je da je rezistencija na antibiotike kod ispitivanih serovarijeteta genetski raznovrsna. Ovi podaci potvrđuju da brojleri mogu biti kolonizovani genetski raznovrsnim antibioretistentnim izolatima salmonela koje nose determinante virulencije. Autori zaključuju da saznanje o prisustvu takvih sojeva je veoma značajno za bezbednost hrane i javnog zdravlja.

Dolapci I et al.,(2015) izveštavaju da je multi rezistencija (MDR) kod salmoneloza, posebno infekcije izazvane serovarijetetom *Salmonella* Typhimurium DT104 važno pitanje za javno zdravlje u mnogim delovima sveta. *Salmonella* Typhimurium je najčešći serotip izolovan iz kliničkih uzoraka u Turskoj, ali malo ima podataka o vrstama faga kod ovih izolata. Ispitivane su kod multirezistentnih izolata *Salmonella* Typhimurium DT104 fagotip i klasa 1 integrona, karakteristike plazmidskih i PFGE profila. Odabrano je 66 sojeva *Salmonella* Typhimurium iz laboratorije u Ankari (Enterobacteria Laboratory culture collections of Ankara University School of Medicine, Department of Medical Microbiology) i analiziran im je plazmidski profil (PPA) i PFGE uz korišćenje XbaI i SpeI enzima. Prisustvo klase 1 integrona i fagotipa 104 ispitivano je metodom (PCR). Sojevi korišćeni u studiji su sporadično izolovani iz

sedam provincija posle 2000. godine sa ACSSuT (63), ACGSSuTT/S (1), ACSSuTT/S (1) i ASSuTT/S (1 vrste rezistencije [ampicilin (A) hloramfenikol (C), gentamicin (G), streptomycin (S), sulfonamid (Su), tetraciklin (T), trimetoprim/sulfametoksazol (T / S)]. Detektovano je 65 izolata kao DT104 fagotip. Kod 43 izolata DT104 *Salmonella* Typhimurium nosilaca klase I integrone utvrđeno je pet različitih bendova čije veličine su se kretale od 350-1600 baznih parova (bp); svi izolati nosili su od 1-4 plazmida sa veličinama u rasponu od 1.0-180 kbp i 62 izolata plazmid od 90 kbp koji je specifičan za serotip i određuje virulenciju. *Salmonella* Typhimurium izolati DT104 su grupisani u pet (X1 X5) i sedam (S1-S7) profila nakon restrikcije sa XbaI i SpeI enzimima. Evaluacijom profila ova dva enzima 58 od 65 (89,2%) izolata utvrđeni su slični (X1.S1) profili. Na osnovu molekularnih karakteristika većina izolata *S.*Typhimurium je grupisana u slične grupe prema klasi I integrone, plazmidima i PFGE obrazacima kada su analizirani zajedno. Ovom studijom je pokazano da skoro svi izolati *S.*Typhimurium sa pet obrazaca rezistencije na lekove (ACSSuT) pripadaju izolatima DT104. Profili dobijeni primenom PFGE ispitivanih izolata ukazali su na epidemiološku povezanost.

Gharieb RM et al., (2015) su tokom ove studije ispitivali porast infekcija uzrokovanih hranom kontaminiranom antibiotezistentnim patogenima što predstavlja problem javnog zdravlja u čitavom svetu. Stoga, ovom studijom utvrđivana je prevalencija, antibiotezistentnost, profili gena virulencije i integrone netifoidnih salmonela izolovanih iz živinskog mesa i pacijenata sa dijarejom u Egiptu. Ispitano je 150 uzoraka (100 živinskog mesa i 50 uzoraka stolice pacijenata sa dijarejom) na prisustvo salmonela vrsta primenom metoda kultivacije, biohemijskim testovima i serološkom identifikacijom izolata. Svi salmonela sojevi su testirani na prisustvo rezistencije primenom disk difuzione metode, zatim na prisustvo gena virulencije i klase I integrone primenom PCR metode. Ukupna prevalencija salmonela vrsta u uzorcima živinskog mesa je 10% u odnosu na 4% kod pacijenata sa dijareom. Svi izolati su serološki identifikovani kao *Salmonella* Typhimurium (sedam izolata), *S.* Derby, *S.* Kiel, *S.* Rubislaw (jedan izolat) i netipizirani sojevi (dva izolata). Testovi osetljivosti na antibiotike

pokazali su veću rezistenciju na eritromicin i tetraciklin (100%), zatim amoksicilin sa klavulanskom kiselinom (91.7%), trimetoprim-sulfamethokazole (83.3%), streptomycin, nalidiksinsku kiselinu, ampicilin-sulbaktame (75%), gentamicin, ampicilin (66.7%), hloramfenikol (58.3%), ciprofloksacin (25%) i ceftriakson (16,7%). Povećanje stope rezistencije na antibiotike i klase I integrona među lekovima na koje su salmonela vrste rezistentne ističe značaj smanjenja upotrebe antibiotika u stočarstvu u cilju sprečavanja rezistencije.

Ghazaey S i Mirmomeni MH (2012) ispitivali su antibiotezistenciju soja *Salmonella* enteritidis. Multirezistencija *Salmonella* Enteritidis izolata je problem javnog zdravlja širom sveta. Sojevi salmonela izolovani iz uzoraka živine, su ispitivani biohemijski i metodom PCR i identifikovani su kao *Salmonella* Enteritidis. Za detekciju i identifikaciju izolata *Salmonella* Enteritidis su korišćeni, sdfI gen-specifični prajmeri. Autori su ustanovili da je 100% izolata rezistentno na ampicilin, 90% na cefalotin i streptomycin, 70% na cefotaksima, a 60% su bili rezistentni na kanamicin i gentamicin. *Salmonella* Enteritidis izolati su rezistentni na ispitivane antibiotike.

Filipović Irina i sar. (2007) izveštavaju da sojevi bakterija koji poseduju gene za proizvodnju beta-laktamaza proširenog spektra delovanja (ESBL) najčešće ispoljavaju multirezistenciju i istovremeno su nosioci gena odgovornih za rezistenciju na većinu drugih antibiotika, uključujući aminoglikozide, sulfametoksazol-trimetoprim i fluorohinolone. Zbog navedenih razloga najveći problem danas u kliničkoj praksi predstavljaju infekcije ljudi i životinja izazvane ESBL produkujućim sojevima *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella* i *Shigella* vrsta. Autori su ispitivali bakterije izolovane iz briseva ušiju, kože, vaginalnih briseva, fecesa i urina, jaja i ljuske od jaja. Primenom klasičnih i komercijalnih testova mikrobiološke dijagnostike izolovali su i identifikovali sojeve *E.coli* i *Salmonella* vrsta. Navedenim sojevima ispitivali su i osjetljivost na određeni broj antibiotika i hemioterapeutika primenom metoda propisanih od strane CLSI, USA iz 2006. Samo oni sojevi *E.coli* i *Salmonella* poreklom od pasa, mačaka, goveda, ovaca, koza, svinja i živine kod kojih je

ustanovljena rezistencija na 3 i više antibiotika kategorizovani su kao multirezistentni i dalje su ispitivani na prisustvo beta-laktamaza proširenog spektra delovanja. Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 112 sojeva *E.coli* i 45 sojeva *Salmonella*. Takođe su ispitivanjem bila obuhvaćena i dva ESBL pozitivna soja *E.coli* koji su izolovani iz urina ljudi, a služili su kao kontrola. Od 112 ispitivanih sojeva *E.coli*, kod 35 je utvrđena multirezistencija na određeni broj antibiotika, dok je od 45 sojeva *Salmonella* koji su ispitivani samo kod 6 sojeva ustanovljena multirezistencija. Najveći broj multirezistentnih sojeva *E.coli* (MR *E.coli*) otkriven je kod goveda, ukupno 12, a najmanje kod koza i ovaca, po dva soja. Svi multirezistentni sojevi *Salmonella* pripadali su vrsti *Salmonella* Enteritidis (*S.enterica* subsp. *enterica* serovar. Enteritidis). Ukupan broj multirezistentnih sojeva u odnosu na broj sojeva koji su ispitivani bio je relativno nizak (13,3 %). Međutim, izuzetno visoka prevalencija rezistencije kod ispitivanih sojeva utvrđena je na ampicilin i amoksicilin sa klavulanskom kiselinom (100 %), a na tetraciklin 83,3%. Primenom "screening" ispitivanja, gotovo svi sojevi uključeni u ispitivanje bili su sumnjivi na prisustvo ESBL i zbog toga je u ispitivanje bio uključen i potvrdni test. Tek po završenim ispitivanjima mogao se izvesti zaključak da među izolovanim sojevima *E.coli* i *Salmonella* poreklom od životinja nisu otkriveni sojevi koji poseduju laktamaze proširenog spektra delovanja.

Fitch FM et al. (2016) su analizirali izolate iz programa MAPA vezano za otpornost β -laktama i gena rezistencije koji su uključeni, kao i geografske distribucije potencijalnih klonskih populacija rezistentnih izolata u Brazilu. *Salmonella* vrste su široko rasprostranjene u prirodi, međutim, ljudi se inficiraju uglavnom konzumiranjem kontaminirane hrane, naročito živine i jaja. U Brazilu, Ministarstvo poljoprivrede (MAPA) nadgleda proizvodnju hrane uopšte, sa ciljem sprečavanja prenošenja patogena putem lanca ishrane. U 2004. godini, MAPA je pokrenula program za praćenje i kontrolu nivoa salmonela kod živine prilikom klanja. U početku je ispitano 1.939 salmonela vrsta izolovanih u periodu između 2004. i 2011. godine. Ovi izolati su testirani na antimikrobnu osetljivost i 100 izolata rezistentni ili umereno osetljivi na ampicilin i ceftriakson su ispitivani

prvobitno na prisustvo blaSHV, blaTEM, blaOXA, blaPSA, blaCMY-1, i blaCMY-2 gena. Bilo je 55 izolata čije geni rezistencije nisu identifikovani u ovom panelu i ovi izolati su predmet ovog izveštaja. Ovih 55 izolata diferencirano je u 31 različitu ribogrupu, sa više β -laktamskih gena rezistencije, uključujući AmpC blaCMY, blaTEM, blaCTX-M-1, blaCTX-M-2, blaCTX-M-8 i blaCTX-M-14. Izolati nosioci varijanti blaCTX-M su identifikovani u tri geografske regije. Salmonela nosi određene genetske varijante blaCTX-M i pripadaju istoj ribogrupi, a identifikovane su iz više objekata za klanje živine. U nekim slučajevima, ovi klonski vezani izolati su iz objekata udaljenih 300 milja, što ukazuje na potencijalnu klonska razliku između dva geografska regiona. Ovo je prvi izveštaj o blaCTX-M-1 i blaCTX-M-14 kod salmonela u Brazilu.

Yang B et al. (2014) su ispitivali vrstu *Salmonella enterica* na produkciju betalaktamaza (ESBL) koja je inače je detektovana širom sveta. Međutim, izolacija ESBL-produkujućih salmonela u hrani se retko sprovodi. Sto i trideset osam ceftriakson ili / i cefoperazon rezistentnih sojeva salmonela izolovano je iz hrane u maloprodaji (Šanksi i provincija Henan) u Kini, ispitivana na ESBL. ESBL produkujući sojevi su okarakterisani rezistencijom, PFGE profilima, i prisustvom blaTEM, blaSHV, blaOXA, blaCTX-M, i blaPSE. Prenosivost ESBL kodiranih gena na osetljivi *Escherichia coli* soj je takođe ispitivana. Trideset (21.7%) izolata je identifikovano kao ESBL pozitivano i pripadalo je *S. enterica* serovarima Indiana, Shubra, Typhimurium, i Enteritidis. *Salmonella* Indiana i *S. Shubra* izolati su prvi identifikovani ESBL produkujući sojevi. Velika genetska raznolikost je bila prisutna među ovim ESBL sojevima. Sekvenciranjem nukleotida otkriveno je da je blaTEM-1Be bio jedini ESBL produkujući gen među genima testiranim i detektovan je u 26 od 30 sojeva i nosilac je konjugativnih plazmida. blaTEM-1B gen je prenosiv putem konjugacije u rasponu od $4,71 \times 10^{-7}$ do $7,55 \times 10^{-6}$ transkonjugant po ćeliji primaoca. Ova studija pruža dokaze o ESBL produkujućim salmonelama u hrani i prenosivost plazmida nosioca ESBL-kodirajućih gena što bi moglo doprineti širenju ESBL sojeva.

Hu Y et al., (2015) ispitivali su epidemiološko stanje i subtipizaciju serovarijeteta *Salmonella* Indiana (*S. Indiana*) rezistentnih na ciprofloksacin i cefotaksim izolovanih iz pilećih trupova uzorkovanih u maloprodajnim objektima iz šest kineskih provincija. Testovima osetljivosti na antimikrobne lekove je bilo podvrgnuto 2.647 izolovanih salmonela sojeva. Svi izolati salmonela korezistentni na ciprofloksacin i cefotaksima su serotipzovani, rađen im je (ESBLs) test i tipizacija elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE). Među 2.629 testiranih salmonela izolata 227 (8,52%) je bilo korezistentno na ciprofloksacin i ceftazidima / cefotaksima (Peking: 11.67% (99/874), Đilin: 8,20% (60/726), Guandong: 1,39% (7 / 502) Jiangsu: 15.61% (42/260), Šanksi: 8.56% (16/186), Unutrašnja Mongolija: 0 (0/81)), a 224 od njih su identifikovani kao *S. Indiana*. Dvesta trinaest (95.10%) izolata *S. Indiana* produkuju β laktamazu proširenog spektra delovanja. Svi ciprofloksacin i cefotaksim korezistentni *S. Indiana* izolati su multirezistentni, 17.86% (40/224) je bilo rezistentno na sve testirane antibiotike osim karbapenema, 50.89% (114/224) njih je rezistentno na 9 antibiotika, 25,45% (57/224) od njih je pokazalo multirezistenciju na 8 antibiotika. Svi ciprofloksacin i cefotaksim korezistentni *S. Indiana* izolati su bili podeljeni u 32 PFGE grupe i 150 PFGE obrazaca. Sojevi *S. Indiana* iz istih ili različitih uzoraka, vremenski i teritorijalno odvojenih imaju iste PFGE obrasce ili se razlikuju međusobno u zavisnosti od regiona. Rezultati su pokazali da su pileći trupovi prikupljeni u delovima Kine veoma zagađeni ciprofloksacin i cefotaksim rezistentnim serovarijetetom *S. Indiana* i predstavljaju važan rezervoar ciprofloksacin i cefotaksim korezistentnih salmonela. Rezultati molekularne subtipizacije ukazuju da unakrsna kontaminacija ili zajednički izvor zagađenja potiče od ovih sojeva.

Hur J et al., (2011) ispitivali su rezistenciju na antimikrobne lekove i virulenciju gena. Četrdeset i šest *Salmonella enterica* serovar Enteritidis je izolovno iz pilećeg mesa, fecesa, a ljuske jaja uzetih iz objekata za uzgoj širom Koreje. Svih 46 izolata bilo je bilo rezistentno na bar jedan od 21 antibiotika ispitivanih u ovoj studiji, 30 (65,2%) izolata bilo je rezistentno na tri ili više antibiotika, i jedan izuzetan izolat je bio rezistentan na 15 antimikrobnih sredstva. Izolati su bili

prvenstveno rezistentni na penicilin, sulfafurazol, streptomycin, tetraciklin i kvinolone. Visoka stopa rezistencije sojeva *Salmonella* Enteritidis, ponekad multirezistencija, može da iskomplikuje buduće opcije za lečenje infekcija kod ljudi. Devetnaest od 21 penicilin rezistentnih izolata nosilo je bla(TEM) gen, dok je jedan soj, rezistentan i na penicilina i ceftriaksona, nosio bla(CTX-M) gen. Trideset sedam od 45 sulfiksazol rezistentnih izolata no sul2 i 23/24 streptomycin rezistentnih izolata nosi oba gena strA i strB. Svih 10 tetraciklin rezistentnih izolata je nosilo tet(A) gen. Većina izolata imalo je oba SPI-1 i SPI-2- udružena gena, i spv operon, koji mogu biti povezani sa infekcijama kod ljudi. Prisustvo ovih gena ukazuje na to da ovi sojevi mogu dovesti do javnih zdravstvenih problema ako se nađu u opštoj ljudskoj populaciji.

Katoh R et al., (2015) su ispitivali 477 sojeva salmonela izolovanih iz domaćeg pilećeg mesa (maloprodaja) tokom 1992-2012 u Tokiju. Sojevi su serotipizirani i testirana im je rezistencija na lekove. Ovi sojevi su detektovani u 469 (29,8%) od 1.576 uzoraka. Stopa detekcije u dve godine bila je 10,1% do 46,3% . Rezultat tipizacije bila je klasifikacija sojeva (477) unutar 22 serovara uključujući dva netipizirana soja. Među njima, *S. Infantis* (312 sojeva) je najčešći, zatim *II O4: b: [e, n, x]* (*S. II Sofia*) (71 soj), *S. Hadar* (20 sojeva), *S. Typhimurium* (20 sojeva), *S. Manhattan* (12 sojeva), *S. Schwarzengrund* (9 sojeva), *S. Agona* (7 sojeva), i ostalih 15 serovara (24 soja). Rezultati antimikrobne osetljivosti na lekove za 477 sojeva otkrili su da je 89,9% bilo rezistentano na neke od 12 lekova testiranih i da je među njima multirezistentno 90.2% sojeva.

Mattiello SP et al. (2015) su ispitivali profile antimikrobne rezistencije i prisustvo determinanti rezistencije na sojevima *Salmonella enterica* brazilske živine. Analiza 203 izolata pokazala je da oni od živine iz okruženja (88 izolata) imaju veću rezistenciju na antimikrobne lekove nego izolati iz drugih izvora, posebno oni izolati iz živinskih sporednih proizvoda (106 izolata). Trideset sedam izolata su rezistentni na najmanje tri antimikrobne grupe. Klasa 1 integroni su detektovani u 26 izolata, a analiza varijabilnog regiona između 5' konzerviranog segmenta (CS) i 3' CS svakog integron pozitivnog izolata klase 1 pokazala je da

13 sadrži tipičan 3'CS a 14 je sadržavalo atipične 3'CS. Jedan *Salmonella* Senftenberg izolat čuvao je dva intergrona klase 1, pokazujući i tipičan i atipičan 3'CSS. Najveći procenat rezistencije je pronađen na sulfonamide, a sul geni su detektovani u većini rezistentnih izolata. Rezistencija na aminoglikozide je detektovana u 50 izolata i aadA i aadB su bili prisutni u 28 i 32 izolata. Pored toga, strA i strB su detektovani u 78.1% i 65.6% izolata rezistentnih na streptomycin. Dvadeset jedan izolat posjeduje smanjenu osjetljivost na beta-laktamazu i čuva bla (TEM), bla(CMY), i / ili bla(CTX-M). Četrdeset izolata pokazalo je smanjenu osjetljivost na tetraciklin, a većina predstavlja tet gene. Ovi rezultati ukazuju na značaj životne sredine kao rezervoara rezistentnih salmonela, što može omogućiti postojanost determinanti rezistencije u proizvodnom živina lancu, doprinoseći, dakle, u raspravi vezano za uticaj upotrebe antimikrobnih sredstava u proizvodnji životinja na ljudsko zdrave.

Gong J et al., (2016) su ispitivali rezistenciju *Salmonella enterica* serovar Indiana. Veoma otporan na lekove *Salmonella enterica* serovar Indiana je postao najčešći serovar kod brojlera sa dijarejom u Kini tokom ove studije (15% u 2010. godini na 70% u 2014. godini). Većina *S. Indiana* izolata (87%, 384/440) bili su rezistentni na 13. do 16. od 16 testiranih antibiotika, 89% ostalih izolata (528/595) su rezistentni na 0 do 6 antibiotike. Klasa 1 integroni i IncHI2- plazmidi su otkriveni u svim *S. Indiana* izolatima, ali samo u 39% i 1% u ostalim (ne *S. Indiana*) izolatima.

Hyeon JY et al.,(2011) ispitivali su prisustvo salmonela u uzorcima pilećeg mesa (n = 26), govedine (n = 49), i svinjskog mesa (n = 56) prikupljenim od veletržnica, maloprodajnih objekata i tradicionalnih tržišta u Seulu, Južna Koreja, u 2009.godini. Primenom rep PCR metode i DiversiLab sistema određena je rezistencija na antimikrobna sredstva i molekularni podtipovi *Salmonella* izolata. Ukupno 18 salmonela sojeva je izolovano iz 17 od 131 uzorka: 16 sojeva iz svakog od 16 uzoraka i 2 soja iz istog uzorka (svinja). Prevalenca salmonela kod uzoraka mesa iz maloprodaje 2,0% u govedini, 8,9% u svinjetini, a 42,3% u pilećem mesu. Među 10 različitih serotipova, *Salmonella enterica* Panama je

detektovana u uzorcima govedine, dok su *Salmonella* London i *Salmonella* Montevideo bile dominantni serotipovi u svinjskom i pilećem mesu. Najveća rezistencija na antibiotike zabeležena je na eritromicin (100%), zatim streptomycin (22,2%), tetraciklin i hloramfenikola (16,7%). Od 18 izolata, 5 (27.8%) su rezistentni na dva ili više antibiotika, i 1 izolat od pilećeg mesa je rezistentan na osam antibiotika, uključujući cefalosporine. Diferencijacija između svih salmonela izolata osim između *Salmonella* Montevideo i *Salmonella* London uspešno je izvedena automatizovanom rep-PCR sistemom, što znači da može imati važnu ulogu tokom monitoringa izvora alimentarnih patogena povezanih sa epidemijama.

Li Q et.al., (2015) predstavili su multirezistentni soj S06004 (izolovan iz klinički bolesne piladi u Kini 2006. godine) i njegovu genomsku sekvencu. *Salmonella* enterica serovar Pullorum ostaje veliki ekonomski problem industrije živanja u zemljama sa neefikasnim merama kontrole. Poređenjem genoma dokazano je da soj sadrži dva profaga, ST104 i profag-4 (Fels2) za E.coli LF82, koji nisu detektovani u genomima S. Pullorum RKS5078 i CDC1983-6. Tačkasta mutacija GyrA Ser83, geni rezistencije i prisustvo mnogih antibiotskih pumpi kod soja S06004 mogu doprineti njegovoj multirezistenciji.

Kottwitz LB et al., (2011) su ispitali 41 soj *Salmonella* Enteritidis, uključujući fagotipove PTs, PT4 i PT9, antimikrobnu rezistenciju i PFGE. Od ovih sojeva, 34 su izolovane od pacijenata i hrane, a 7 od živine. Svi sojevi su bili osetljivi na ampicilin, hloramfenikol, cefotaksim, ciprofloksacin i trimetoprim /sulfametoksazol, a 41.5% (n = 17) su bili rezistentni na nalidiksinsku kiselinu. Pomoću PFGE vršena je analiza XbaI i SpeI restrikcionim enzimima koja ukazuje da je X1S1 dominantan obrazac, zastupljen u 48,8% (n = 20) epidemijskih sojeva i u jednom soju izolovanom iz odbačenih priplodnih jaja. Različiti obrasci nađeni su za druge sojeve izolovane iz živine (X3S1, X8S8, X11S12, X11S13, X16S1 i X13S15). *Salmonella* Enteritidis PT9 sojevi vezani sa izbijanjem salmoneloze su bili veoma slični (≥ 0.90), što ukazuje na prisustvo klonova. Dobijeni PFGE genotipovi su bili povezani sa PTs, i bilo je moguće razlikovati sojeve izolovane

od pacijenata sa salmonelozom od drugih sojeva koji nisu epidemijskog porekla. Rezultati dobijeni primenom PFGE ukazuju da je *S. Enteritidis* poreklom od živine bila uzročnik salmoneloze kod ljudi.

Kuang X et.al. (2015) ukazuju da se salmonelom mogu indirektno inficirati ljudi putem transfera od životinja i prehrambenih proizvoda životinjskog porekla, a time izazivati potencijalno smrtonosne bolesti. Stoga, sticanje razumevanja salmoneloza kod domaćih životinja je sve važnije. Cilj ove studije je bio da identifikuje distribuciju serotipova u *Salmonella* uzorcima izolovanim iz piladi (n = 837), svinja (n = 930) i krava (n = 418) u centralnoj Kini (Henan, Hubej, i Hunan provincija) u periodu 2010-2011, a zatim ispita osetljivost sojeva na antimikrobne lekove. *Salmonela* izolati su identifikovani PCR amplifikacijom *invA* gena, serotipovi su određeni testom aglutinacije za O i N antigene, i testom osjetljivosti na 24 antimikrobna leka korišćenjem agar dilucione metode. Identifikovano je 248 sojeva salmonela : 105 (kokoške), 105 (krave muzare), i 38 (svinje). Osim toga, 209 sojeva su identifikovani kod obolelih svinja iz (Huazhong Agricultural University) veterinarske bolnice. Od 457 sojeva, dominantni serotipovi su bili Typhimurium serogrupa B, IIIb serogrupa C Enteritidis serogrupa D. U testovima antimikrobne osjetljivosti 41,14% *Salmonella* spp. su osjetljive na sve antimikrobne agenase, 48.14% su rezistentni na najmanje jedan, a 34.72% su rezistentni na više od tri grupe lekova. Sojevi su visoko rezistentni na sulfametokazol-trimetoprim (39.61%), nalidiksinsku kiselina (39.17%), doksiciklin (28.22%), i tetraciklin (27.58%). Rezistencija na cefalosporine i fluorokvinalone kretala od 5,25 do 7,44% i 19,04 do 24.51%. Među penicilin rezistentnim i cefalosporin-rezistentnim sojevima, 25 izolata produkuje beta-laktamazu (ESBLs). Multirezistentni i ESBL produkujući sojevi salmonela identifikovani kod zdravih životinja ovde će predstavljati izazov za veterinu i stočarstvo, a takođe mogu predstavljati opasnost po javno zdravlje. Nivo rezistencije na antibiotike posmatrano u ovoj studiji dalje naglašava potrebu za pažljivim i selektivnim korišćenjem antibiotika.

Lee SK et al. (2013) su nastojali da utvrde prevalencu *Salmonella* serotip Enteritidis u jajima u Južnoj Koreji. Uradili su mikrobiološki pregled komercijalno dostupnih jaja proizvedenih u konvencionalnim ili organskim farmama u periodu od 2010. do 2012. godine. Sadržaj 7.000 ljuski jaja (6.000 konvencionalnog i 1.000 organskog porekla) je ispitivan da bi utvrdili obim i vrstu kontaminacije *Salmonella* serotip Enteritidis. Ukupno 26 salmonela (7,4% zbirnog uzorka) je izolovano od 350 homogenizovaniha, svaki sadrži 20 jaja. Neočekivano i posebno iznenađujuće otkriće je da su svi salmonela izolati stereotipizovani kao *Salmonella Gallinarum*. *Salmonella Gallinarum* je češći kod jaja iz organske farme: 10 od 50 jaja zbirnog uzorka (20,0%) sa organskih farmi i 16 od 300 jaja zbirnog uzorka (5,3%) sa konvencionalnih farmi je bilo pozitivano na *Salmonella Gallinarum*. Međutim, organski i konvencionalni izolati pokazuju sličnu antimikrobnu osetljivost. Svi izolati i soj vakcine, SG 9R, koji ima široku upotrebu u Južnoj Koreji, su je dalje karakterisani korišćenjem automatskog ponavlja sekvenci baza PCR (rep-PCR) sistemom, DiversiLab za utvrđivanje molekularnih podtipova i da identifikaciju razlika u odnosu na vakcinalni soj. Rep-PCR identifikovao je 2 različite grupe među 26 *Salmonella Gallinarum* izolata sa indeksom sličnosti većim od 96%. Oni se jasno razlikuju od vakcinalnog soja SG 9R, sa kojim je indeks sličnosti manji od 86%. Autori su otkrili nisku genetsku heterogenost među izolatima unutar svake grupe i bili u stanju da naprave razliku između sojeva divljeg tipa iz živog vakcinalnog soja SG 9R, korišćenjem DiversiLab sistem.

LU Y et al.,(2014) su ispitivali osjetljivost izolata na antimikrobne lekove. Ukupno 310 izolata salmonela izolovanih sa 6 farmi brojlera u istočnoj Kini serootipizirano je prema Kauffmann-White klasifikaciji. Svim izolatima ispitivana je osjetljivost na 17 najčešće korišćenih antimikrobnih lekova. Reprezentativnim izolatima ispitivani su geni rezistencije i klasa I integrona primenom metode PCR. Zastupljenost klonova je ispitivana elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE). Otkrivena su dva soja od 310 *Salmonella* sojeva, uključujući 133 *Salmonella enterica* serovar Indiana izolata i 177 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis izolata. Rezultati antimikrobne osjetljivosti pokazali su da su izolati

generalno rezistentni na sulfametoksazol, ampicilin, tetraciklin, doksiciklin i trimetoprim, a 95% od izolata bilo je osetljivo na amikacin i polimiksin. Među svim *Salmonella enterica* serovar Indiana izolatima, 108 (81.2%) posedovalo je blaTEM, floR, tetA, strA i aac (6')-Ib-cr gene rezistencije. Otkriveni su nosioci klase 1 integrona 66.5% (206/310) i šest sojeva nosioca gena intergron cassette dfr17-aadA5. Sve veća učestalost multirezistencije *Salmonella* je povezana sa povećanom prevalencom int1 gena (rs = 0.938, P = 0.00039). int1, blaTEM, floR, tetA, strA i aac (6')-Ib-cr. Pozitivni *Salmonella enterica* serovar Indiana izolati pokazali su pet glavnih obrazaca određenih PFGE. Većina izolata sa farme piladi poseduje zajedničke PFGE obrasce, što ukazuje da su mnogi multirezistentni izolati *Salmonella enterica* serovar Indiana bili prisutni u ovim izvorima. Neki izolati sa sličnim antimikrobnim obrascima rezistencije su poticali iz različitih genotipova *Salmonella enterica* serovar Indiana i bili izvedeni iz različitog klona.

Mandilara G et al., (2013) izvestili su da se nedavno pojavio multirezistentni serovar *Salmonella enterica* 1,4,[5],12:i:-, monofazna varijanta S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:1,2) i sada je među najčešćim serovarima izolovanim od ljudi u mnogim zemljama. U Grčkoj, monofazni serovarijetet S. Typhimurium koji je zabeležen prvi put kod ljudi u 2007. godini (0,3% ukupnih izolata), povećava mu se prevalencija, a od 2009. je treći najčešći serovarijetet. U ovoj studiji je ispitivano 119 multirezistentnih *Salmonella enterica* 1,4,[5],12:i:- sojeva ljudi, životinja i hrane izolovanih u periodu između 2006. i 2011. godine. Sojevi verifikovani kao monofazne Typhimurium varijante lančanom reakcijom polimeraze (PCR) (97 sojeva), su dodatno okarakterisani fenotipski (antibiotska rezistencij i fagotipizacija) i molekularnim metodama (elektroforeza u polju jednosmerne struje - PFGE). Rezultati su pokazali da više klonova multirezistentnog monofaznog Typhimurium soja cirkuliše u Grčkoj. Najčešći klon kod ljudi i svinja je fagotip DT120, R-type ASSuTSpTm i PFGE profil STYMXB.0010, a kod živine su detektovani drugi klonovi. Podaci pokazuju da svinje mogu biti rezervoar ovog klona u Grčkoj.

Matthews TD et al., (2015) ispitivali su *Salmonella enterica* serovarijetet Enteritidis, Dublin, i Gallinarum koji su blisko povezani ali se razlikuju u virulentnosti i zavisno domaćina. Da se identifikuju genetski elementi odgovorni za ove razlike i u cilju boljeg razumevanja razvoja ovih serovara, sekvencirali su genome Enteritidis soja LK5 i Dublin soja SARB12 i odnos ovih genoma na Enteritidis P125109, Dublin CT 02021853 i Dublin SD3246 dostupnim sekvencama. Takođe su upoređivali dostupne sekvence genoma Gallinarum biotipove Gallinarum 287/91 i Pullorum RKS5078. Koristeći bioinformatički pristup, identifikovan je jedan nukleotidni polimorfizam, umetanje, delecije, i razlike profaga i pseudogena između sojeva koji pripadaju istom serotipu. Kroz navedene analize identifikovali su nekoliko profaga grupe gena i pseudogena koji utiču na virulenciju i specifičnost domaćina. Ovi rezultati ukazuju na to da se Enteritidis, Dublin i Gallinarum serovari *Salmonella enterica* razvijaju sticanjem novih gena kroz horizontalni transfer gena, a zatim i formiranjem pseudogena. Gubitak gena potrebnih za gastrointestinalnu kolonizaciju na kraju dovodi do sistemske kolonizacije i isključivanja specifičnosti serovara za određenog domaćina.

Mezal EH et al., (2014) prikupili su ukupno 60 izolata *Salmonella enterica* serovar Enteritidis i to 28 od živine i 32 iz kliničkih uzoraka, tokom 2010. Navedenim izolatima ispitivana je rezistencija na antibiotike, geni virulencije koji se prenose plazmidima i utvrđivanje vrste plazmidskih replikona. Da bi se procenila genetska raznolikost koristili su (PFGE) fingerprinting, uz primenu XbaI restriktionog enzima, zatim Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) i utvrđivani su plazmidski profili. Svi izolati od živine i 10 od 32 klinička izolata bili su osetljivi na ampicilin, hloramfenikol, gentamicin, kanamicin, nalidiksinsku kiselinu, sulfafurazol, streptomycin i tetraciklin. Od 32 klinička izolata 21 je bio rezistentan na ampicilin i tetraciklin, a jedan izolat je bio rezistentan na nalidiksinsku kiselinu. Tipizacija metodom PFGE 60 serovarijeteta S Enteritidis sa XbaI enzimom rezultirala je dobijanjem 10-12 bendova grupisanih u šest klastera sa sličnošću od 95% na 81%. MLVA analiza šezdeset izolata daje 18 profila alela sa većinom izolata prikazanih u tri grupe, i dva klinička izolata koji

su dodati bazi podataka Pulse Net national MLVA. Svi izolati su bili pozitivni na 12 ili više od 17 gena virulencije uglavnom nađeni kod vrste *S. enterica* (spvB, spiA, pagC, msgA, invA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iroN, sitC, lpfC, sifA, sopB, i pefA) i negativni na jedan gen (cdtB) . Svi izolati nosili su tipičan 58 kb plazmid, tip Inc/FIIA. Tri živinska izolata i jedan klinički izolat nosioci su malih plazmida sa 3.8, 6, 7.6 i 11.5 KB. Deset kliničkih izolata nosioci su plazmida, veličine 36 i 38 kb, tipa IncL/M i IncN, a jedan izolat nosilac je plazmida od 81 kb tipa IncI. Hibridizacijom plazmid sa Inc/FIIA genom nastaje jedan veliki 58 kb plazmid u svim izolatima. Nekoliko velikih i malih plazmida od živinskih izolata nije tipiziran PCR metodom.. Ovi rezultati su potvrdili da PFGE fingerprinting ima ograničenu diskriminacionu snagu za serovar Enteritidis kod živine i kliničkih izvora. Međutim, plazmid i MLVA profili alela su korisni i važni za epidemiologiju, razlikovanje i izolaciju sojeva salmonela serovara Enteritidis poreklom od živine i kliničkih uzoraka.

Mohamed T et al., (2014) ukazuju na postojanje konfliktnih podataka da li komercijalno hlađenje ima bilo kakav uticaj na preživljavanje serovara *Salmonella*, uključujući antibioretizientne varijante, na trupove piladi. Ukupno 309 *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Kentucky izolata je prikupljeno pre i posle rashlađivanja čitavih trupova brojlera. Ispitivana im je genetska povezanost analizom (PFGE), prisustvo faktora virulencije (invA, pagC, spvC) pomoću PCR i produkcija aerobaktina i kolicina biološkim testovima. Podgrupa ovih izolata (n = 218) pokazala je rezistenciju bilo na sulfafurazol i / ili ceftiofur [*S. Typhimurium* (n = 66) i *S. Kentucky* (n = 152)]. Oni su dalje testirani na prisustvo pridruženih elemenata rezistencije na antibiotike (class-I intergrona i blaCMY gena) pomoću PCR. Svih 145 ceftiofur rezistentnih *S. Kentucky* i *S. Typhimurium* izolata poseduje blaCMY gene. Klasa I integrona detektovana je samo kod 6,1% (n = 4/66) sulfafurazol rezistentnih *S. Typhimurium* izolata. PFGE analiza je otkrila prisustvo genetski različitih populacija unutar dobijenih izolata ali grupe su generalno u skladu sa serotipovima i antimikrobnim profilima rezistencije. Na 100% obrazaca sa indeksom sličnosti 36% latentne *S. Typhimurium* i 22% od latentne *S. Kentucky* izolata je detektovano nakon

hlađenja . Svi izolati posedovali su *invA* i *pagC* gene, ali samo 1,4% poseduje *spvC*. Bez obzira na hlađenje, postojala je značajna razlika ($P < 0,05$) u proizvodnji aerobaktina i kolicina između *S. Kentucky* i *S. Typhimurium* izolata. Uzeti zajedno, ovi rezultati pokazuju da je hlađenje imalo uticaj pojedinih salmonela klonskih grupa ali nije imao nikakav uticaj na prisustvo klase I integrona, *blaCMY* gena, i na testirane faktore virulencije.

Naik VK et al.,(2015) su ispitivali rezistenciju kod salmonela izolata. Cilj je bio da se utvrdi prevalenca salmonela u sirovom kozjem mesu i pilećem mesu iz maloprodajnih radnji mesa u distriktima Indije. Prikupljeno je ukupno 400 uzoraka, 200 kozjeg i 200 pilećeg mesa. Svi uzorci su podvrgnuti izolaciji i izolovani sojevi su potvrđeni biohemijskim testovima i potvrđeno je prisustvo *invA* gena salmonela. Svi salmonela izolati su ispitani testom antimikrobne osjetljivosti na najčešće korišćene antibiotike. Od 400 uzoraka detektovana je prevalenca salmonela u kozjem mesu 9% i u pilećem 7%, sa ukupnom prevalencom od 8%. PCR metodom detektovan je *invA* gen kod 31 izolata salmonela. Trideset dva izolata je bilo osjetljivo na ciprofloksacin, dok je 96,87%, 96,87% i 93,75% bilo osjetljivo na gentamicin, imipenem, i ceftazidima, 93.75% i 59.37% izolata bilo je rezistentno na eritromicin i oksitetraciklin. Od 32, 14 izolata je imalo indeks multirezistencije jednak ili veći od 0,2. Uzrok prisustva salmonela u uzorcima kozjeg i pilećeg mesa su jako loši higijenski uslovi na mestima uzorkovanja. Izolati su pokazali visok stepen rezistencije kao i multirezistencije. Prema tome, ova studija naglašava potrebu za daljim nadzorom zoonoznih alimentarnih patogena, uključujući i antibioretenciju duž celog lanca proizvodnje hrane.

Pande VV et al., (2015) u Australiji su sproveli ispitivanja antimikrobne rezistencije (AMR) izolovanih *Salmonella* spp od komercijalnih zatvorenih jata u Novom Južnom Velsu. Svi izolati ($n = 145$) su ispitani fenotipski, genotipski, testovima antibioretencije i na prisustvo gena odgovornih za integrone. Većina izolata (91.72%) bila je osjetljiva na testirana antimikrobna sredstva. Limitirana rezistencija je zapažena na amoksicilin i ampicilin (5.51%), tetraciklin (4.13%),

cephalotin (2,06%) i trimetoprim (0,68%). Nijedan od izolata nije bio rezistentan na cefotaksim, ceftiofur, ciprofloksacin, hloramfenikol, gentamicin, neomicin ili streptomycin. Zapažena je i niska frekvencija izolata (4,83%) salmonela koje nose gena rezistencije i gene za klasu 1 integrona. Najčešće detektovani geni antimikrobne rezistencije (AMR) među izolatima salmonela bili su: blaTEM (2.07%), tetA (1.38%) i dhfrV (0.69%). Autori zaključuju da su uglavnom izolati vrste *Salmonella enterica* ispoljili nisku AMR te predstavljaju minimalni rizik za javno zdravlje.

Rowlands RE et al.,(2014) u Brazilu ispitivali su antibiotezistenciju i prisustvo gena virulencije kod izolovanih serovarijeteta salmonela. Pošto je salmonela najčešći etiološki uzročnik pojedinačnih slučajeva i epidemija crevnih bolesti izazvanih hranom, posebno pojava i širenje multirezistentnih *Salmonella* spp. kao potencijalni patogena, dovode do zabrinutosti. Ispitano je 237 izolata salmonela vezanih za slučajeve salmoneloza izazvanih hranom. Uglavnom je utvrđena dominacija serotipa S. Enteritidis kod kojih je testirana osetljivost na antibiotike i na prisustvo gena virulencije spvC, invA, sefA i pefA. Ustanovljeno je da je 46,8% izolata bilo osetljivo na sva antimikrobna sredstva a 51,9% rezistentno na najmanje jedan antimikrobni lek. Multirezistencija je zabeležena kod 10,5% izolata. Najveća stopa rezistencije utvrđena je na streptomycin (35,9%) i nalidiksinsku kiselinu (16,9%). Nije bilo sojeva rezistentnih na cefoksitin, cephalotin, cefotaksim amikacin, ciprofloksacin i imipenem. Gen invA je detektovan u svim sojevima. Geni spvC i pefA su detektovani u 48,1% i 44,3% sojeva. Gen sefA je detektovan u 31,6% sojeva i samo kod serovarijeteta S. Enteritidis. Rezistencija i determinante virulencije su detektovane u više serotipova salmonela. Visoka stopa antibiotezistencije izolovanih serotipova iz živinskih proizvoda ukazuju na potencijalni rizik konzumiranja ovih proizvoda i potrebu da se osigura valjano održavanje higijene od farne do stola, kao i smanjenje širenja patogena što je relevantno za javno zdravlje.

Sanad YM et al. (2016) su tokom svojih ispitivanja vršili procenu antibiotezistencije i faktora virulencije kod izolata *Salmonella enterica* skupljenih

na farmama ćurki gde se antibiotici ne aplikuju ni kroz hranu ni kroz vodu. *Salmonelle* su izolovane od ćurki i različitih uzoraka životne sredine primenom konvencionalnih mikrobioloških metoda. Izolati su serotipizirani, fenotipizirani, testirani na antibioretzistenciju, genotipizirani elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE) fingerprintingom, integron analizirani, plazmid profilisani, replikon inkompatibilnost (Inc) (AD) tipizirani i profilisani na gene virulencije. Devedeset pet *S. enterica* izolata je izolovano iz sadržaja cekuma (n = 29), hrane (n = 22), ostataka hrane (n = 13), prostirke (n = 12), pojilica (n = 10), okruženja (n = 8), i insekata. Identifikovani su sledeći serotipovi: Montevideo (24%), Anatum (22%), Agona (17%), Kentucky i Worthington (12%), Senftenberg (11%), i neodređenog fenotipa (3%). Većina izolata (61/95; 64%) su osetnjivi na 12 testiranih antimikrobnih lekova; Međutim, uprkos odsustvu antibiotika u objektu, oko 36% izolata su rezistentni na dva do pet antimikrobnih sredstava. Klasa 1 integroni su detektovani u 8% izolata. Analiza integron sekvence otkriva dihidrofolat reduktazu (DHFR) i aminoglikozid adenilil transferazu (aadA2) gena, koji kodiraju rezistenciju na trimetoprim i streptomycin. Nadalje, 71% izolata je imalo najmanje jedan plazmid. Bilo je pet tipova plazmidskog replikon identifikovani kod izolata, uključujući IncI1, IncHI2, IncFIIA, IncB/O, i IncP, sa promenom prevalencije među serotipovima. Svih 95 izolati testirani su PCR- om i 19 je pozitivno na gene virulencije i negativno na virD4 and virB4. Profili gena virulencije slični su unutar izolata istog serotipa. U okviru specifičnih serotipova, PFGE obrasci pokazuju 100% sličnosti, čak i kada su bakterijski sojevi izolovani iz različitih izvora, što ukazuje na unakrsnu kolonizaciju farmi ćuraka. Na ovim farmama ćuraka gde se ne koriste antibiotici, čini se da su ćurke i hrana glavni rezervoari multirezistentnih salmonela, nosioca gena virulencije.

Thai TH i Yamauchi R., (2012) ispitali su 118 izolata salmonela od 283 uzorka (135 svinjskog i 148 pilećeg) mesa uzetih iz maloprodajnih radnji u Severnom Vijetnamu. Autori su tipizirali trinaest serovarijeteta, uključujući Infantis, Anatum, Rissen, Reading, Emek, Typhimurium, Blockley, London, Newport, Derby, Weltevreden, Albany, i Hadar. Kod ovih izolata zapažena je rezistencija na tetraciklin (54.2%), sulfonamide (52,5%), streptomycin (41,5%), trimetoprim

(36.4%), hloramfenikol (35.6%), i ampicilin. (33.1%). Četrnaest [bla(TEM), bla(OXA-1), bla(PSE-1), aadA1, sul1, tetA, tetB, tetG, cmlA1, floR, dfrA1, dfrA12, aac(3)-IV i aphA1-1AB od 17 gena rezistencije detektovanih kod izolata pokazuje rezistenciju. Geni za plazmid-posredovanu rezistenciju na kvinolone, kao što su qnrA, qnrB, qnrS, qepA, i acc(6')-1b-cr, nisu otkriveni u 23 kvinolon rezistentna izolata. Supstitucijom TCC to TTC na kodonu 83 gyrA je pronađeno 18 kvinolon rezistentnih izolata. Autori zaključuju da podaci ukazuju da su sojevi rezistentnih salmonela široko rasprostranjeni u severnom Vijetnamu preko lanca identičnu ishrane i da bi mogli da sadrže više gena koji određuju fenotipsku rezistenciju. Smatraju da bi dodatna istraživanja bila neophodna kako bi se razjasnio mehanizam rezistencije na antibiotike kod izolovanih salmonela i njihovo širenje na stočnoj pijaci.

Wang Y et al. (2015) su ispitivali 1026 izolata *Salmonella* Enteritidis od 1152 uzorka svežeg živinskog mesa (maloprodajni objekti). Testirani su na antimikrobnu osetljivost, elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE), prisustvo kvinolon rezistencije (Qnr) povezanih gena, klase 1 integrona, beta-laktamaza proširenog spektra (ESBLs) kodirajućih gena i mutacije u kvinolon regionu odgovornom za rezistenciju (QRDR) koji određuju GyrA i ParC. Utvrđena rezistencija bila je najčešća na nalidiksinsku kiselinu (88,1%), zatim na tetraciklin (65,9%), sulfafurazol (65,1%) i ampicilin (61,9%), a u manjoj meri na cefoksitin (8,7%), gatifloksacin (8,7%), levoflokacin (7,9%), ceftriakson (7,1%) i ceftiofur (6,3%). Rezistencija na bar jedan antibiotik, utvrđena je kod 123 (98,4%) izolata i kod 93 (74.4%) na najmanje četiri antibiotika. Genetske različitosti ($D = 0.9255$) autori su utvrdili među izolatima na osnovu PFGE analize.

Yasser M et al., (2016) vršili su procenu rezistencije na antibiotike i faktore virulencije kod *Salmonella* enterica izolovanih iz jata ćuraka koje su uzgajane na farmama u okruženju, na kojima se antimikrobna sredstva ne primenjuju na ptice, ni kroz hranu ni kroz vodu. Salmonela je izolovana od ćurki i različitih uzoraka životne sredine primenom konvencionalnih mikrobioloških metoda. Izolati su ispitivani sledećim testovima: serotizacijom, fenotipskom rezistencijom na

antibiotike i genotipizacijom putem (PFGE) fingerprintinga, analizom integrona, profilisanjem plazmida i gena virulencije. Vrste *Salmonella enterica* (95 izolata) poticale su iz sadržaja cekuma (N = 29), hrane (N = 22), ostataka hrane (N = 13), prostirke (n = 12), pojilica (n = 10), okruženja (n = 8) i insekata. Identifikovani su sledeći serotipovi: Montevideo (24%), Anatum (22%), Agona (17%), Kentucky and Worthington (12%), Senftenberg (11%), i približno fenotipizirani (3%). Kod većine izolata (61/95; 64%) utvrđena je osetljivost na 12 testiranih antimikrobnih sredstava. Međutim, uprkos odsustvu antibiotika u objektu, oko 36% izolata bilo je rezistentno na dva do pet antimikrobnih sredstava. Klasa 1 integroni su detektovani u 8% izolata. Analizom sekvenci integrona detektovani su geni za dihidrofolat reduktazu (DHFR) i aminoglikozid adenilil transferazu (aadA2), koji kodiraju rezistenciju na trimetoprim i streptomycin. Takođe kod, 71% izolata utvrđeno je prisustvo makar po jednog plazmida. Utvrđeno je pet tipova plazmidskog replikona među izolatima, uključujući IncI1, IncHI2, IncFIIA, IncB/O, i IncP, sa promenom učestalosti unutar serotipova. Kod 95 izolata koji su ispitivani metodom PCR utvrđeno je prisustvo 19 gena virulencije dok geni za virD4 i virB4 nisu utvrđeni. Profili gena virulentncije su slični unutar istog serotipa. U okviru određenih serotipova, PFGE otkriveno je 100% sličnosti, čak i kada su bakterijski sojevi izolovani iz različitih izvora, što je pokazatelj unakrsne kolonizacije izvora unutar farmi ćuraka. Autori su zaključili da su na farmi ćuraka bez upotrebe antibiotika ćurke i hrana glavni rezervoari multirezistentntnih serovarijeteta salmonela koje nose više gena za virulencijeu

Yu CY et al., (2008) ustanovili su da je *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sa fagotipovima DT104 i U302 često rezistentna na ampicilin, hloramfenikol, streptomycin, sulfonamide i tetraciklin (ACSSuT resistance type) i predstavlja glavne zoonozne patogene. Povećana potrošnja gušćijeg mesa može da poveća rizik od prenošenja *S. enterica* serovar Typhimurium i drugih enteropatogena sa gusaka na ljude zbog konzumiranja mesa zaraženih gusaka ili nepravilno pripremljenog mesa. Izolati vrste *S. enterica* serovar Typhimurium koji su izolovani sa četiri farme gusaka (farme A, B, C i D) i jedane farme za uzgoj (farma E) ispitivani su u cilju utvrđivanja epidemijskih i genetskih razlika

među njima. Testovima antibiotezistencije i multipleks PCR metodom je potvrđeno da 77.6% (52/67) sojeva pripada ACSSu sojevima. Svi ACSSuT sojevi nosioci su 94.7-kb plazmida virulencije i sadrže jedan 1.1-kb konzerviran segment identičan *Salmonella* genomu Island 1. Četiri genotipa su determinisana među *S. enterica* serovar Typhimurium izolatima elektroforezom u polju jednosmerne struje sa XbaI-digested DNA fragmentima. Većina izolata (85.29%; *S. enterica* serovar Typhimurium mogla bi poticati sa farmi za uzgoj, od membrana jaja guščjeg perja nakon izleganja. Autori su identifikovali više vrsta fagotipova: 8, 12, U283, DT104 i U302 i zaključili su da su guske rezervoar različitih multirezistentnih (ACSSuT) sojeva *S. enterica* serovar Typhimurium, a da je svaka farma kolonizovana genetski blisko povezanim sojevima *S. enterica* serovar Typhimurium.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu podatke iz citirane literature kao i sopstvena preliminarna iskustva o navedenoj problematici koja je aktuelna i u Crnoj Gorii, cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje prisustva bakterija iz roda *Salmonella* na određenom broju farmi živine na teritoriji Crne Gore, što podrazumeva njihovu izolaciju i identifikaciju, molekularnu karakterizaciju kao i ispitivanje njihove osetljivosti na antibiotike i hemioterapeutike.

Radi ostvarenja postavljenog cilja, definisani su sledeći zadaci:

1. Izolacija i identifikacija serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* podvrste *enterica* koje su prisutne u uzorcima poreklom od živine na području Crne Gore primenom klasičnih bakterioloških metoda kultivisanja preporučenih od strane OIE (World Organisation for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2015), kao i prema standardu MEST EN ISO; 6579:2008:Annex D.

2. Molekularna karakterizacija izolata vrste *Salmonella enterica* podvrste *enterica* primenom metode molekularne biologije multiplex PCR, a prema referenci Zhu, C., Yue, M., Rankin, S., Weill, F. X., Frey, J., & Schifferli, D. M. (2015). One-step identification of five prominent chicken *Salmonella* serovars and biotypes. *Journal of clinical microbiology*, 53(12), 3881-3883., kao i primenom metode elektroforeze u pulsirajućem polju struje (PFGE), a prema CDC protokolu „Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*“.

3. Ispitivanje osetljivosti izolata salmonela na antibiotike koji se koriste u kliničkoj praksi primenom disk difuzione metode preporučene od strane CLSI (Clinical and laboratory standards Institute, USA), kao i određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) antibiotika primenom VITEK 2 Systems Version:07.01

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1.MATERIJAL ISTRAŽIVANJA

Uzorkovanje je vršeno na farmama koka nosilja i brojlera iz tri epizootiološke jedinice (sever, centralni deo Crne Gore i primorje). U svim regionima uzeti su uzorci sa tri farme (kloakalni brisevi, fecesi, uginula pilad) Nakon primoizolacije salmonela iz navedenog materijala, odabrani su izolati salmonela za dalja planirana ispitivanja . Kao materijal za ispitivanje korišćeni su uzorci fecesa, kloakalni brisevi, transportna uginuća, celi leševi, nazuvci, prostirke, brisevi površina. Izolacija je vršena i iz kliničkog materijala dostavljenog u Specijalističku Veterinarsku Laboratoriju u Podgorici.

4.1.2. Hranljive podloge i reagensi

Za izolaciju i identifikaciju ispitivanih sojeva korišćen je veći broj hranljivih podloga - BPW- (Buffered pepton water) - Puferizovana peptonska voda (Oxoid), Modified semi-solid Rappaport-Vasiliadis MSR/V medium (Oxoid), XLD agar (Oxoid), Hranljivi agar (Oxoid), Brilljant zeleni agar (Oxoid), TTC polutečni agar sa dodatkom 2,3,5 trifenil-tetrazolium hlorida, Hugh-Leifson podloga (Merck) , Kriglerov trostruki šećer (Oxoid). Tokom identifikacije, ispitivan je veliki broj biohemijskih reakcija i drugih konvencionalnih laboratorijskih testova i za te svrhe predviđenih podloga i reagensa (Oxidasa trake – Oxoid, Indol, Metil crveno, Voges-proskauer-Oxoid Simmons citrat agar- Merck, Christensen urea agar-Oxoid, Hranljivi želatin –Oxoid, itd..). Osim toga kao potvrda identifikaciji korišćen je i automatski identifikacioni sistem API 20 E proizvođača bioMérieux. Za serološku tipizaciju Salmonella vrsta upotrebljeni su specifični polivalentni serumi proizvođača Stetens Serum Institut - Denmark.

Radi ispitivanja osetljivosti izolovanih sojeva bakterija na antibiotike primenjivan je Mueller Hinton agar (Oxoid). Za ispitivanje osetljivosti bakterija primenom disk difuzione metode korišćeni su antibiogram diskovi (Oxoid). Serovarijetetima

Salmonella ispitivana je osetljivost na ampicilin, amoksicilin sa klavulonskom kiselinom, ceftriakson, cefuroksim, ciprofloksacin, kloksacilin, imipenem, tetraciklin, trimetoprim sa sulfametoksazolom, cefotaksim, streptomycin i enrofloksacin.

Provera prisustva β laktamaze proširenog spektra delovanja u ESBL testu, korišćeni su diskovi ceftazidima, cefotaksima i amoksicilina sa klavulanskom kiselinom.

Tokom ispitivanja korišćeni su i kontrolni referentni sojevi *Salmonella enterica* serovarijetet Enteritidis ATCC 13076 i *Salmonella enterica* serovarijetet Typhimurium 14028 (Termo Scientific, Lenexa-USA).

4.2. METODE ISTRAŽIVANJA

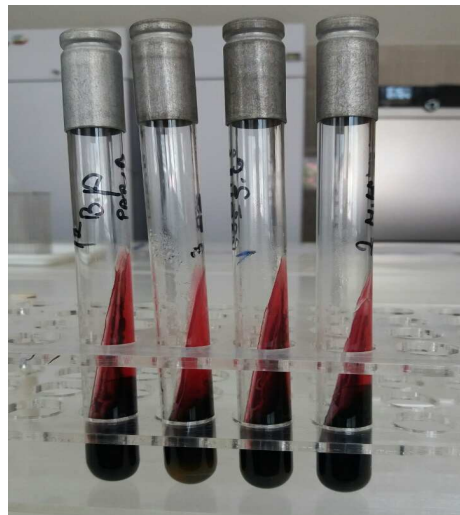
4.2.1. Izolacija, identifikacija i serološka tipizacija

Ispitivani materijal je odmah po prijemu u laboratoriju zasejavan na neselektivnu tečni podlogu Puferizovanu peptonsku vodu, zagrejanu na ambijentalnoj temperaturi a zatim su podloge inkubirane $18h \pm 2 h$ na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubiranja uzorci su zasejavani na polutečnu podlogu sa obogaćenjem MSR_V (Modified semi-solid Rappaport-Vasiliadis medium). Sterilnom pipetom iz puferizovane peptonske vode se ekstrahuje iz dubine tečnosti inokulum i tri kapi (0,1 ml) se nanose na MSR_V tako da se rasporede na podjednaku udaljenost jedna od druge. Ploče se inkubiraju $24h \pm 3h$ na temperaturi od $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ aerobno. Negativne ploče se inkubiraju produženo još $24h \pm 3h$. Na pozitivnim pločama će se videti sivo bele mutne zone koje se protežu oko inokulacionih kapi. Makroskopski treba odrediti najdalju tačku neprozirnog rasta i sterilnom ezom promera 1 μ l unutar granice neprozirnog rasta uzeti uzorak presejati na čvrste diferencijalne podloge (XLD, Brillijant zeleni agar), a potom podloge inkubirati 24h na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Kolonije izrasle na čvrstim diferencijalnim podlogama koje morfološki odgovaraju vrstama

salmonela presejavane su ezom na Kriglerov trostruki šećer koji se potom inkubira 24 h ± 3h na temperaturi od 37°C±1°C. Ukoliko na XLD agaru nisu dobijene čiste kulture kolonije se presejavaju na hranljivi agar i odatle rade biohemijske reakcije (sposobnost stvaranja indola, reakcija sa metil crvenim, Voges-Proskauer reakcija, sposobnost korišćenja citrata, prisustvo enzima ureaze, želatinaze, fenilalanin deaminaze i β galaktozidaze (ONPG test), sposobnost produkcije vodonik sulfida, sposobnost fermentacije ugljenih hidrata, test pokretljivosti u TTC podlozi. Ukoliko biohemijski profil ispitivanog soja odgovara profilu prikazanom u tabeli 2. kao i identifikacija izolata potvrđena automatskim API 20E sistemom izolati se ispituju dalje serološki tj vrši se tipizacija upotrebom specifičnih dijagnostičkih seruma.

Tabela 2. Biohemijski profil *Salmonella* vrsta

	Indol	M. red	VP	Citrat	Laktoza	H2S	Pokretljivost	Fenil alanin	Urea	Želatin	ONPG	Lizin
Salmonella Subgenus I	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Salmonella Subgenus II	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+



Slika 2. Izgled zasejane podloge TSI izolovanim serov. S Enteritidis

4.2.2. Serološka tipizacija izolata *Salmonella*

Za serološku identifikaciju poželjno je osigurati upotrebu odgovarajućih antiseruma što je moguće šireg raspona serotipova *Salmonella*.

Prisustvo O, H, Vi antigena *Salmonella* određuje se aglutinacijom na pločici sa odgovarajućim antiserumima iz čistih bakterijskih kultura i nakon eliminacije auto-aglutinirajućih sojeva.

Eliminacija auto-aglutinirajućih sojeva

U jednu kap fiziološkog rastvora koja se stavlja na pločicu ubacuje se sumnjiva kolonija koja se kružnim pokretima eze suspenduje u kapi. Rotiranjem pločice na obje strane naizmjenično 30 do 60 sekundi odvijanje reakcije se posmatra na tamnoj podlozi. Ukoliko su se bakterije grupisale u manje ili veće jasno vidljive pahuljice, soj se smatra auto-aglutinirajućim i dalja identifikacija ispitivanog antigena smatra neizvodljivom. Moguće je dispergovati koloniju u kapi vode, a zatim ovu suspenziju pomiješati sa jednom kapi fiziološkog rastvora.

Serotipizacija *Salmonella* vrsta se zasniva na ispitivanju O somatskog antigena, H flagelarnog antigena i kapsularnog Vi antigena koji je prisutan samo kod malog broja serovarijeteta. Ova ispitivanja se izvode testom brze aglutinacije na pločici, uz primenu hiperimunih seruma koji u sebi sadrže specifična antitela protiv O,H i Vi antigena. U prvoj fazi serološke tipizacije salmonela ispituje se O somatski antigen i utvrđuje serološka grupa *Salmonella*. Zatim se ispituje u dve faze prisustvo flagelarnih antigena i određuje serotip *Salmonella*. Somatski O antigeni na osnovu kojih su serovarijeteti podeljeni u grupe obeležavaju se brojevima 1,2,3 i tako dalje, antigeni H-1 faze malim slovima a, b, c, d i tako dalje, a antigeni H-2 faze brojevima 1,2 i tako dalje.



Slika 3. Prikaz pozitivne(levo) i negativne (desno) reakcije aglutinacije *Salmonella* na pločici

Antigeni karakteristični za određene serovarijetete salmonela prikazani su u tabeli br. 3.

Tabela 3. Prikaz važnijih grupa i serovarijeteta *Salmonella* i njihovih antigenskih formula

Grupa <i>Salmonella</i>	Naziv serovarijeteta	O antigen	H-1 antigen	H-2 antigen
A	S. Paratyphi A	1,2,12	a	-
B	S. Paratyphi B	1,4,5,12	b	1,2
B	S. Typhimurium	1,4,5,12	i	1,2
C1	S. Cholerasuis	6,7	c	1,5
C1	S. Cholerasuis biotip Kunzendorf	6,7	[c]	1,5
D1	S. Enteritidis	1,9,12	g,m	1,7
D1	S. Dublin	1,9,12,[Vi]	g,p	-
D1	S. Gallinarum	1,9,12	-	-
D1	S. Pullorum	9,12	-	-
E1	S. Anatum	3,10	e,h	1,6

4.2.3. Ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike disk difuzionom metodom po Kirbi-Baueru (Kirby-Bauer)

Referentna podloga koja je korišćena za ovu vrstu ispitivanja je Mueller Hinton agar. Razlozi su višestruki: podloga sadrži optimalnu koncentraciju jona kalcijuma i magnezijuma od 50 mg/l i 25 mg/l, nizak nivo timina i timidina do 0,03 mg/l i pH 7,2 do 7,4. Podloga se u dehidrovanom stanju može kupiti od velikog broja proizvođača i priprema se prema uputstvu. Nakon autoklaviranja podloga je razlivana u plastične petrijeve ploče prečnika 100 mm, pri čemu je debljina agara iznosila oko 3,5 - 4 mm. Petri pločle sa razlivenim Mueller Hinton agarom čuvane su u frižideru do upotrebe na temperaturi od 4°C. a moraju da se iskoriste u roku od tri dana ukoliko nisu odmah bile upotrebljene. U slučajevima kada podloge imaju kondenzovanu vodu posle vađenja iz frižidera, pre upotrebe, potrebno je da se osuše u termostatu u trajanju od 10 do 30 minuta. Za pripremu inokuluma soja bakterije koji se ispituje koristi se Mueller Hinton bujon i komercijalne tablete ili diskovi impregnirani antibioticima ili hemioterapeuticima različitih proizvođača.

Standardizacija inokuluma

Priprema i standardizacija inokuluma izvodi se iz stacionarne faze rasta bakterija, tako što se nekoliko identičnih kolonija soja bakterija koji se ispituje resuspenduje u 5 ml Mueller Hinton bujona. Primenom McFarland standarda 0,5 ili fotometra, podešava se koncentracija bakterija u 1 ml suspenzije. McFarland standard 0,5 se priprema mešanjem 0,05 ml 1% BaCl₂ i 9,95 ml 1% H₂SO₄.

Posle dobijanja željenog broja bakterija u primarnoj suspenziji od 1 do 3 x 10⁸ bakterija u mililitru, suspenzija se razređuje Mueller Hinton bujonom u odnosu 1:100 i tako dobija krajnji inokulum od 1 do 3 x 10⁶ bakterija u mililitru za ispitivanje osetljivosti bakterija disk difuzionom metodom. Ovaj način pripreme inokuluma koristi se za brzorastuće aerobne bakterije, familiju *Enterobacteriaceae* i druge gram negativne bakterije.

Inokulacija ispitivanog soja na Mueller Hinton agar

Inokulacija izolovanih sojeva bakterija na Mueller Hinton agar može se izvoditi na dva načina.

- a) Metodom uz primenu brisa koji se posle potapanja u pripremljenu podlogu za inokulaciju materijala koji se ispituje ravnomerno prevlači preko površine podloge u više pravaca.
- b) Metodom direktnog nanošenja izolovane kulture bakterija koja predstavlja inokulum u količini od 2 do 4 ml na Mueller Hinton agar i čiji se višak odlije posle ravnomernog razlivanja po površini podloge.

Aplikacija diskova ili tableta

Pre postavljanja diskova ili tableta na zasejanu podlogu, neophodno je da se proveri da nema viška inokuluma na površini podloge kako bi se podloga još malo prosušila.

Aplikacija diskova ili tableta se obavlja ručno sterilnom pincetom ili automatskim dispenzerom. Pri postavljanju antibiogram tableta ili diskova mora se voditi računa da udaljenost između njih bude najmanje 30 mm, a od ivice petrijeve ploče više od 10 mm.

Inkubisanje inokulisanih Mueller Hinton agara

Inkubacija inokulisanih ploča vršena je u termostatu na temperaturi od 35 do 37°C tokom 18 časova.

Očitavanje i procena rezultata

Rezultati osetljivosti bakterija na antibiotike i hemioterapeutike očitavaju se merenjem prečnika bez rasta bakterija (zone inhibicije rasta) oko diskova ili tableta.

Određivanje terapijske kategorije S, R i I sojeva koji se ispituju na antibiotike i hemioterapeutike izvodi se poređenjem očitanih zona inhibicije sa referentnim vrednostima diskova koje daju proizvođači i nacionalne komisije. Za kontrolu kvaliteta izvođenja ove metode, kao i kvaliteta antibiogram diskova korišćeni su i referentni sojevi *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Termo Scientific, Lenexa-USA).

4.2.4. Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove izolovanih serovarijeteta *Salmonella enterica* primenom automatskog sistema VITEK 2 Compact

Automatski sistem VITEK 2 Compact koristi se za brzu identifikaciju bakterija, kao i za brzu izradu testa osetljivosti na antimikrobne lekove na bazi MIC, a namenjen je za rutinski rad u mikrobiološkim laboratorijama. Rezultati identifikacije i antibiograma dobijaju se za 4 do 8 sati. Automat poseduje sistematsko praćenje vrednosti identifikacije i antibiograma, sa standardizovanom reproducibilnom metodologijom kao i stalnom kontrolom kvaliteta identifikacije i antibiograma i izveštaja u svakom trenutku procesa rada. Praćenje celog procesa rada i uzoraka vrši se putem bar-koda. Priprema uzoraka je vrlo jednostavna i obavlja se za par minuta. Očitavanje je kolorimetrijsko, svakih 15 minuta na 3 talasne dužine.

Izrada antibiograma bazirana je na vrednostima MIC-ova. Rezultat sadrži informaciju i odmah upozorava na prisustvo bilo kog tipa rezistencije. Sva validirana znanja o mehanizmima rezistencije u mikrobiologiji nalaze se u softveru ovog aparata, kao i mogućnost dopune sa novinama iz ove oblasti. Interpretacija rezultata prema važećem vodiču (EUCAST, CLSI, i lokalnim direktivama za tumačenje antibiograma). Zahvaljujući AES ("Advanced Expert System") softvera sistem vrši ekspertizu i daje komentare u smislu predviđanja reakcija *IN VIVO* za rezultate dobijene *in vitro*.

Aparat je jedinstven i po tome što omogućava nezavisan rad svakog dela mikrobiološke laboratorije u smislu odvojene pripreme uzoraka u zavisnosti od potreba svake laboratorije, zahvaljujući tzv. nosačima koji se koriste odvojeno od

aparata. Priprema kartica za testiranje se vrši na nosaču a podaci o uzorku i pacijentu unose se na glavnom kompjuteru, zatim se nosač kartica ubacuje u aparat i nastavlja se automatsko praćenje uzoraka i rezultati se prate na glavnom monitoru. Uzorci se ubacuju nezavisno jedni od drugih u svako doba. ID i AST se mogu raditi u paru i nezavisno jedno od drugog. Mogućnost kontaminacije uzoraka i sredine svedena je na minimum zbog automatskog zavarivanja kartica nakon ubacivanja uzorka u test. Za identifikaciju *Salmonella* korišćene su identifikacione kartice za gram negativne- GN - AST- XNO5 koje uključuju otkrivanje i prisustvo ESBL.

4.2.5. Ispitivanje prisustva beta laktamaza proširenog spektra delovanja primenom ESBL testa

Ime testa je izvedeno iz engleske skraćenice ESBL (extended spectrum β -Laktamases). Test se još naziva i "produženi antibiogram" ili "dupli disk difuzioni test" i služi za detekciju sojeva sa skrivenim mehanizmom rezistencije, odnosno sojeva koji produkuju beta-laktamaze proširenog spektra delovanja (BPLS). Ove enzime produkuju bakterije iz familije *Enterobacteriaceae* i to najčešće *Klebsiella pneumoniae* mada su nađene kod gotovo svih enterobakterija. Sojevi koji produkuju BLPS su otporni na sve beta-laktamske antibiotike izuzev karbapenema i u nekim slučajevima cefamicina. Pošto se standardnim disk difuzionim testom ovaj mehanizam rezistencije često ne može otkriti, predloženo je više pomoćnih metoda za njegovo otkrivanje mada optimalna metoda još nije razvijena. Sojevi bakterija koji produkuju BLPS klinički su rezistentni na peniciline, cefalosporine i aztreonam, uprkos osetljivosti na ove antibiotike u disk difuzionom testu. Zbog opasnosti po život pacijenata u slučaju nedetektovanih BLPS, ovaj test ima poseban značaj u humanoj medicini.

Sojevi ESBL geografski su veoma rašireni i otkriveni su i kod životinja. Najveću opasnost po život pacijenata predstavlja pozitivan rezultat fenomena osetljivosti ESBL produkujućih sojeva na mnoge beta-laktamske antibiotike dobijen standardnim disk difuzionim metodom jer u uslovima *in vivo* lečenjem

ovim antibioticima izostaje terapijski efekat. Stoga se pojava ESBL enzima naziva još i „skriveni mehanizam rezistencije“. Najvažniji faktori rizika za nastajanje ESBL produkujućih sojeva jesu prolongirana upotreba beta-laktamskih antibiotika, naročito u bolnicama. S obzirom da se cefalosporini III generacije upotrebljavaju i kod životinja, ESBL pozitivni sojevi lako se mogu pojaviti i na farmama kao i kod kućnih ljubimaca. Najviše zabrinjava pojava ESBL pozitivnih sojeva *Salmonella*. Do 1999. godine otkriveno je čak 3,4% ESBL pozitivnih *Salmonella* poreklom od ljudi i životinja u EU. Uprkos tome što su ESBL enzimi otkriveni pre 25 godina, ovom problematikom bavi se jako mali broj laboratorija.

Najzastupljeniji ESBL geni, CTX-M geni su široko rasprostranjeni zbog prisustva mobilnih genetičkih elemenata: insercionih sekvenci, transpozona, plazmida i integrona (Tacão i sar. 2012).

Geni odgovorni za proizvodnju ESBL smešteni su najčešće na plazmidima koji su uvek veći od 100 kb i putem kojih se lako prenose mehanizmima konjugacije i transdukcije na ostale enterobakterije u prirodi. Sojevi bakterija koji poseduju gene za proizvodnju ESBL najčešće ispoljavaju multirezistenciju, a nose i gene odgovorne za rezistenciju na većinu drugih antibiotika, uključujući i aminoglikozide, sulfametoksazol/trimetoprim i fluorohinolone. Stoga, praktično najveći klinički problem danas predstavljaju infekcije ljudi i životinja izazvane ESBL produkujućim sojevima *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella* i *Shigella* vrsta.

Produkcija BLPS dokazuje se duplim disk difuzionim testom (ESBL testom) na osnovu postojanja sinergizma između amoksicilina sa klavulanskom kiselinom, cefotaksima i ceftazidima. Suspenzije ispitivanih bakterija pripereme se isto kao za standardni disk difuzioni metod. Takođe je i za ESBL test korišćen Mueller Hinton agar. Na inokulisanu podlogu postavljani su diskovi ceftazidima, cefotaksima i amoksicilina sa klavulanskom kiselinom i to tako da je amoksicilin sa klavulanskom kiselinom postavljen u sredini podloge, a diskovi sa ostalim antibioticima na 3 centimetara udaljenosti. Nakon inkubacije od 18h na

temperaturi od 37°C očitavani su rezultati. Kada je zona cefotaksima i ceftazidima proširena na strani klavulanske kiseline, zaključuje se da soj proizvodi BPLS.

4.2.6. Ispitivanje izolata *Salmonella enterica* podvrste *enterica* molekularnom metodom multipleks PCR

Metoda multipleks PCR je izvođena prema protokolu koji su objavili Zhu i saradnici 2015. godine. Ekstrakcija genomske DNK je izvođena po modifikovanoj proceduri koji su opisali Hopwood i saradnici 1985. Čelije iz 1,5 mililitara kulture koje su inkubirane preko noći na temperaturi od 37°C uz aeraciju su oborene centrifugiranjem i resuspendovane u 500 µl TE pufera (50 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH8). U smešu ćelija je dodavano po 250 µl 2% rastvora SDS-a a zatim je smeša vorteksirana 30 sekundi ili do smanjenja viskoznosti. Dobijenom lizatu dodavano je 250 µl neutralnog rastvora fenol-hloroform, zatim je vršeno vorteksiranje 30 sekundi a nakon toga i centrifugiranje u trajanju od 10 minuta na maksimalnoj brzini. Bistar supernatant je prenošen u nove tube od 1,5 ml pazeći da se ne uzburka interfaza koja sadrži ćelijske proteine i membrane. Postupak prečišćavanja neutralnim fenol-hloroformom je ponovljen još tri puta do gubitka interfaze. Na kraju je prečišćenom supernatantu dodavana 1/10 volumena 3 M natrijum acetata i 1 volumen izopropanola, promešano intenzivno i totalna DNK precipitirana iz rastvora centrifugiranjem na maksimalnoj brzini tokom 10 minuta. Supernatant je odliven i talog nukleinskih kiselina opran u 1ml 70% etanola. Totalna DNK je osušena i resuspendovana u 100 µl vode sa RNK-azom i inkubirana 15 minuta na temperaturi od 37°C da bi se u potpunosti razgradila izolovana RNK. Kvalitet i kvantitet izolovane totalne DNK je proveravan elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Po 1µl totalne DNK je korišćen za amplifikaciju fragmenata.

U tabeli 1 su prikazane sekvence prajmera, ciljani geni i ciljane DNK i veličine amplikona.

Tabela 4. Lista prajmera i njihovih sekvenci sa ciljanim genima i DNK i veličinama amplikona

Prajmeri	Sekvence 5'-3'	Ciljani geni ili lokusi	Ciljana DNK (vrsta, serovarijete ti)	Veličina amplikona (bp)
bcfC-F bcfC-R	GGGTGGGCGGAAACTATTTTC CGGCACGGCGGAATAGAGCAC	<i>bcfC</i>	<i>S. enterica</i>	993
heli-F heli-R	ACAGCCCGCTGTTTAATGGTG CGCGTAATCGAGTAGTTGCC	orf (pretpostavljena helikaza)	Heidelberg	782
steB-F steB-R	TGTCGACTGGGACCCGCCCCGCGC CCATCTTGTAGCGCACCAT	<i>steB</i>	Gallinarum biotip Gallinarum ¹	636
rhs-F rhs-R	TCGTTTACGGCATTACACAAGTA CAAACCCAGAGCCAATCTTATCT	rhs lokus	Gallinarum	402
sdf-F sdf-R	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAG CGTTCTTCTGGTACTTCAGATGAC	sdf lokus	Enteritidis	293
gly-F gly-R	TTCCAATTGAAACGAGTGCGG ACTAACCGCTTGGGTTGTTGCTGT	orf "gly" (hipotetični protein)	Kentucky	170

¹ Nije prisutan kod biotipa Pullorum, ali je prisutan kod serovarijeteta Enteritidis, Heidelberg, Kentucky i grupe 1 serovarijeteta, kako je prikazano u tabeli 5.

Za izvođenje navedene metode korišćeni su prajmeri proizvođača (Invitrogen, USA) u finalnoj koncentraciji 0.2 µM. Sve ostale korišćene ingredience bile su od istog proizvođača: Finalna koncentracija svakog dNTP u smeši je iznosila 50µM (KAPA, Biosystems), finalna koncentracija MgCl₂ je iznosila 1.5 mM (KAPA,

Biosystems). Taq polimeraza (KAPA, Biosystems, 1U po reakciji), pufer 10x (KAPA, Biosystems), totalna DNK 10 ng, dH₂O (KAPA, Biosystems) i ukupna zapremina PCR reakcije iznosila je 50 µl.

Umnožavanje DNK fragmenata (PCR reakcije) je rađeno u aparatu 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems.

Uslovi PCR metode su bili identični kao u radu Zhu i koautora 2015 :

- inicijalna denaturacija odvijala se na temperaturi od 94⁰C tokom 5 minuta
 - denaturacija na temperaturi od 94⁰C tokom 30s
 - vezivanje prajmera na temperaturi od 56⁰C tokom 45s
 - ekstenzija na temperaturi od 72⁰C tokom 1 minuta
 - finalna ekstenzija na temperaturi od 72⁰C tokom 7 minuta
- } 25 ciklusa

Elektroforeza je izvođena na 1,5% agaroznim gelovima u 1xTAE puferu (40 mM Tris (pH 7.6), 20 mM acetic acid i 1 mM EDTA). Bojenje DNK je vršeno etidijumbromidom (EtBr) čija je koncentracija u gelu iznosila 500 µg/ml, a gelovi su vizuelizovani na CCD kameri (Biometra, Gottingen, Germany).

U tabeli 2 koja sledi dati su serovarijetei salmonela upotrebljeni za potvrdu specifičnosti metode multipleks PCR

Tabela 5. Serovarijeteti salmonela upotrebljeni za potvrdu specifičnosti metode multipleks PCR

Serovarijeteti i biotipovi koji pripadaju vrsti <i>Salmonella enterica</i> ¹	Multipleks PCR pozitivan za					
	<i>bcfC</i>	<i>heli</i>	<i>steB</i>	<i>rhs</i>	<i>sdf</i>	<i>gly</i>
Heidelberg (2)	+	+	+	-	-	-
Enteritidis (11)	+	-	+	-	+	-
Kentucky (4)	+	-	+	-	-	+
Gallinarum biotip Gallinarum (16)	+	-	+	+	-	-
Gallinarum biotip Pullorum (7)	+	-	-	+	-	-
Ostale: Grupa 1(68) ²	+	-	+	-	-	-
Ostale: Grupa 2 (20) ³	+	-	-	-	-	-
Izolati koji ne pripadaju rodu <i>Salmonella</i> (5) ⁴	-	-	-	-	-	-

¹ U zagradama je prikazan broj izolata.

² Drugi serovarijeteti vrste *S. enterica* (grupa 1) koji daju identičan profil primenom metode PCR: Paratyphi A (4 izolata), Paratyphi B var. Java (1), Agona (4), Abortusequi (2), Abortusovis (2), Saintpaul (3), Stanleyville (1), Typhisuis (2), Braenderup (5), Choleraesuis (24), Ohio (1), Thompson (1), Hadar (2), Muenchen (2), Newport (6), Berta (2), Dublin (2), Panama (1), Typhi (1), Agoueve (1), Cerro (1).

³ Drugi serovarijeteti vrste *S. enterica* (grupa 2) koji daju identičan profil primenom metode PCR: Schwarzengrund (3), Typhimurium (2), Bareilly (1), Hartford (1), Montevideo (2), Oranienburg (3), Javiana (6), Mississippi (1), Pomona (1).

⁴ Tri izolata vrste *E. coli* i dva izolata roda *Yersinia*.

Kontrola PCR metode je vršena upotrebom dva referentna soja *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 i *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

4.2.7. Ispitivanje izolata *Salmonella enterica* podvrste *enterica* elektroforezom u pulsnom polju (PFGE)

Princip ove metode je da se kompletna hromozomska DNK podvrgne sečenju tzv. restrikcionim enzimima (RE) koji seku DNK na specifičnim mestima prepoznajući kratke sekvence nukleotida u hromozomu. Upotrebom RE dobija se manji broj fragmenata i manje kompleksan profil. Elektroforeza u pulsnom polju omogućava razdvajanje velikih fragmenata i dobijanje stabilnih profila za pojedine izolate, koje je onda moguće porediti da bi se odredile razlike među njima. Razlika u tri fragmenta u profilu je dovoljna da se dva izolata proglašavaju različitim sojevima. Prednost ove metode je mogućnost primene na sve bakterijske vrste, odlična reproducibilnost i visoka diskriminatorna moć. Kombinovanjem različitih RE povećava se i moć diskriminacije, tj. broj detektovanih tipova.

Danas se ovaj postupak smatra standardom u genotipizaciji bakterija. On omogućava uspešno izdvajanje visokomolekularne genomske DNK iz bakterija pomoću elektroforeze u pulsnom polju. Radi sprečavanja cepanja visokomolekularna DNK, bakterijske ćelije se uklapaju u agarozne blokove i u njima liziraju. Visokomolekularna DNK oslobođena u agaroznim blokovima ostaje cela. Zatim se DNK pročišćava tako što se bakterijski proteini razgrade proteazama, a ostatak bakterijske ćelije ispere iz agaroznog gela. Na taj način u agaroznim blokovima ostaje pročišćena DNK koja se obrađuje restrikcionom endonukleazom koja cepa DNK kod određenih sledova baza. *Salmonelle* se najčešće obrađuju Xba1 restrikcionim enzimom.

Tako obrađena DNK u agaroznim blokovima prebacuje se u novi agarozni gel tako da se blok stavi u udubljenja sa gelom. Stalna izmena električnog polja među odvojenim elektrodama menja orijentaciju velikih molekula i olakšava njihovu pokretljivost kroz gel. Tim postupkom se obično razdvajaju manji broj fragmenata veličine od 10.000 do 900.000 parova baza. Genotipizacija dobijena kao rezultat ove metode označava se kao PFGE profil bakterija.

Izvođenje same metode

Bakterijske ćelije izolata *Salmonella* spp iz logaritamske faze rasta su inkorporirane u 1% In Cert agarozu rastvorenu u EET puferu (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10mM Tris, pH8). Agarozni blokčići su iz modlica pebačeni u epruvete i tretirani proteinazom K (0.5 mg/ml u EET puferu sa 0,5% SDS-om) preko noći na 50°C. Nakon inaktivacije proteinaze K 0,1 mM P MSF-om agarozni blokčići su oprati 2 puta po 30 minuta u sterilnoj vodi (5 ml vode po blokčiću), a zatim su isečeni na po 4 dela i podvrgnuti *in situ* digestiji *SpeI* restrikcionim enzimom. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem STOP pufera (1 M saharoza, 100 mM EDTA, pH8) i uzorci su čuvani na +4°C do nanošenja na gel. Dobijeni restrikcioni fragmenti su razdvajani na 1,2% agaroznim gelovima u pulsirajućem električnom polju koje je trajalo: pulsevi 8 sekundi (N/S i E/W) 8 časova i pulsevi 18 sekundi (N/S i E/W) u trajanju od 10 časova; ukupno 18 časova. Redosled sojeva/izolata na gelu je nanošen po mestu izolacije radi direktnog međusobnog poređenja. Kao marker veličina nanošen je λ konkatemer (umnošci genoma λ faga) firme Biolabs.

5. REZULTATI ISPITIVANJA

Veterinarska uprava je u saradnji sa Specijalističkom veterinarskom laboratorijom sprovedila monitoring na salmonelu do 2012. god. Nakon toga svi uzorci su dostavljani od strane veterinarskih ambulanti i na lične zahteve vlasnika živinarskih objekata. Kontrola salmoneloze je veoma bitna, posebno ako se uzme u obzir zoonotski karakter bakterija iz roda *Salmonella*. Osnovni preventivni cilj ove vrste ispitivanja je dobijanje rezultata koji bi doprineli pravovremenom reagovanju u sprovođenju korektivnih mera pre nego što zdravlje ljudi bude ugroženo. Ostvareni rezultati bi ukazivali na potrebu intenziviranja aktivnosti kada je kontrola ove bolesti u pitanju.

U tabelama od 3 do 6 je prikazan pregled slučajeva izolacije bakterija iz roda *Salmonella* za period od 2010. – 2015. god. u Crnoj Gori

Tabela 6. Pregled slučajeva izolacije bakterija iz roda *Salmonella* tokom 2010. god.

R/b	Lokalizacija sa kojih su poticali uzorci	Broj izolata	Vrsta uzorka	Vrsta uzročnika
1.	Danilovgrad	7	Feces tovnih piladi, uginula pilad	<i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> spp.
2.	Podgorica	1	Uginula pilad	<i>Salmonella</i> spp.
3.	Herceg Novi	10	Kloakalni brisevi	<i>Salmonella</i> spp.
4.	Bijelo Polje	9	Feces tovnih piladi, uginula pilad	<i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> spp.
5.	Mojkovac	1	Uginula pilad	<i>Salmonella</i> Enteritidis
Ukupno:		28		

Na potrebu kontinuirane i obimne kontrole ovakve vrste, upućuju rezultati dobijeni tokom ove godine koji su pokazali da je i pored smanjenog obima ispitivanja – kontrole, odnosno, manjeg obima obrađenih uzoraka, utvrđen značajan broj uzročnika – bakterija iz roda *Salmonella* tokom 2010. godine (ukupno 28 izolata).

Tabela 7. Pregled slučajeva izolacije bakterija iz roda *Salmonella* tokom 2011. god.

R/b	Lokaliteta sa kojih su poticali uzorci	Broj izolata	Vrsta uzorka	Vrsta uzročnika
1.	Podgorica	1	Uginula pilad	<i>Salmomella</i> spp.
2.	Bijelo Polje	6	Feces tovnih piladi, uginula pilad	<i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> spp.
Ukupno:		7		

Tokom 2011. godine ispitano je 25,75% više kloakalnih briseva živine na salmonele (ukupno 376), i znatno više uzoraka transportnih uginuća živine (ukupno 126 u odnosu na 88 uzoraka u 2010. godini), ali i 130 uzoraka fecesa živine na salmonele za potrebe farmera, proizvođača uvoznika što je 56,62% više u odnosu na prethodnu godinu. Dobijeni rezultati su pokazali da je utvrđen značajno manji broj izolata *Salmonella* tokom 2011. godine (ukupno 7 izolata u odnosu na 28 izolata tokom 2010. godine).

Tabela 8. Pregled slučajeva izolacije bakterija iz roda *Salmonella* tokom 2012. god.

<i>R/b</i>	<i>Lokaliteti sa kojih su poticali uzorci</i>	<i>Broj izolata</i>	<i>Vrsta uzorka</i>	<i>Vrsta uzročnika</i>
1.	Podgorica	8	Kloakalni brisevi, feces ćuraka, feces tovnih piladi	<i>Salmonella</i> Enteritidis
2.	Danilovgrad	11	Feces tovnih piladi, uginula pilad, trasportne podloske	<i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> spp.
3.	Bijelo Polje	8	Uginula pilad	<i>Salmomella</i> spp <i>Salmenella</i> Infantis
4	Mojkovac	6	Uginula pilad	<i>Salmonella</i> Infantis
Ukupno:		33		

Tokom 2012. godine ispitan je isti broj kloakalnih briseva živine na prisustvo salmonela (ukupno 376), i neznatno više uzoraka transportnih uginuća živine (ukupno 128 u odnosu na 126 uzoraka u 2011. godini), ali i 89 uzoraka fecesa živine i podloški što je 31,54% manje u odnosu na prethodnu godinu. Utvrđen je broj uzročnika salmoneloze tokom 2012. godine (ukupno 33 izolata u odnosu na 7 izolata tokom 2011. godine).

Tabela 9. Pregled slučajeva izolacije bakterija iz roda *Salmonella* tokom 2013. god.

<i>R/b</i>	<i>Lokaliteti sa kojih su poticali uzorci</i>	<i>Broj izolata</i>	<i>Vrsta uzorka</i>	<i>Vrsta uzročnika</i>
1.	Podgorica	1	Feces tovnih piladi	<i>Salmonella</i> Infantis
2.	Pljevlja	2	Feces tovnih piladi	<i>Salmonella</i> Infantis
3.	Bijelo Polje	6	Uginula pilad, kloakalni brisevi	<i>Salmomella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Infantis
4.	Mojkovac	1	Uginula pilad	<i>Salmonella</i> Enteritidis
Ukupno:		10		

U 2013. godini ispitano je 527 kloakalnih briseva živine na prisustvo salmonela, što je 40,14% više nego u prethodnoj godini (376), i neznatno više uzoraka transportnih uginuća živine (ukupno 131 u odnosu na 128 uzorka u 2012. godini), ali i 54 uzorka fcesa živine i podloški, što je 39,33% manje u odnosu na prethodnu godinu (89 uzoraka). Rezultati su pokazali manji broj izolata tokom 2013. godine (ukupno 10 izolata u odnosu na 31 izolat tokom 2012. godine).

Tabela 10. Pregled izolacije bakterija iz roda *Salmonella* tokom 2014. god.

<i>R/b</i>	<i>Lokaliteti sa kojih su poticali uzorci</i>	<i>Broj izolata</i>	<i>Vrsta uzorka</i>	<i>Vrsta uzročnika</i>
1.	Podgorica	8	Feces tovnih piladi, feces ćuraka, transportne podloške	<i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Infantis
2.	Danilovgrad	5	Feces tovnih piladi	<i>Salmonella</i> Infantis
3.	Bijelo Polje	78	Kloakalni brisevi, uginula pilad	<i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Infantis, <i>Salmonella</i> Enteritidis
4.	Mojkovac	16	Uginula pilad, kloakalni brisevi, transportne podloške	<i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Infantis
5.	Rožaje	2	Uginula pilad	<i>Salmonella</i> Infantis
6.	Berane	1	Uginula pilad	<i>Salmonella</i> Infantis
Ukupno:		108		

Tokom 2014. godine ispitano je 546 kloakalnih briseva živine na prisustvo salmonela, što je 3.6% više od prethodne godine (527), 54,2% više uzoraka transportnih uginuća piladi (202 u odnosu na 131 uzorak u 2013. godini) i 83 uzorka fecesa živine i podloški što je 53,70% više od prethodne godine (54 uzorka). Dobijeni rezultati su pokazali da je u većem broju uzoraka utvrđen i znatno veći broj izolata iz roda *Salmonella* tokom 2014. godine (108 izolata u odnosu na 10 izolata u 2013. godini).

Tabela 11. Pregled izolacije bakterija iz roda *Salmonella* tokom 2015. god.

R/b	Lokaliteti sa kojih su poticali uzorci	Broj izolata	Vrsta uzorka	Vrsta uzročnika
1.	Podgorica	1	Feces koka nosilja	<i>Salmonella</i> Enteritidis,
2.	Herceg Novi	8	Feces koka nosilja	<i>Salmonella</i> Enteritidis
3.	Bijelo Polje	8	Kloakalni brisevi, uginula pilad	<i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Enteritidis
Ukupno:		17		

Dobijeni rezultati su pokazali da je usled znatno manjeg obima, odnosno manjeg obima ispitanih uzoraka, utvrđen i značajno manji broj izolata iz roda *Salmonella* tokom 2015. godine (17 izolata u odnosu na 108 izolata tokom 2014. godine).

Svim izolatima je ispitivana osetljivost, odnosno rezistencija primenom disk difuzione metode po Kirby-Baueru. Kod ispitivanih izolata salmonela nije zabeležena značajna rezistencija.

5.1. Rezultati izolacije i identifikacije bakterija iz roda *Salmonella*

Tokom izrade doktorske disertacije pored prethodno navedenih uzoraka prikupljeni su uzorci iz tri regiona Crne Gore (severni, centralni i južni) na kojima su smeštene farme živine. U svakom regionu uzorkovanje materijala na odabranim farmama je vršeno radi utvrđivanja prisustva vrste *Salmonella enterica* podvrste *enterica*. Izolacija i identifikacija je vršena primenom klasičnih bakterioloških metoda kultivisanja preporučenih od strane OIE (World Organisation for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2015), kao i prema standardu MEST EN ISO; 6579:2008:Annex D.

Salmonella Enteritidis (1,9,12 :[f],g,m, [p] : [1,7] ; druga faza može biti ili prisutna ili odsutna (izolat iz vlastite zbirke).



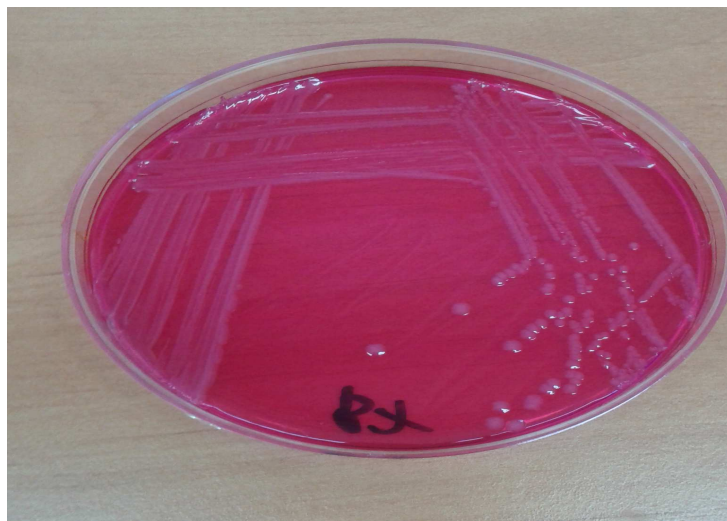
Slika 4.Karakterističan rast salmonela na polutečnom MSR agaru inkubiranom na temperaturi od 41,5°C.



Slika 5. Izgled kolonija *Salmonella* Enteritidis na XLD agaru



Slika 6. Izgled kolonija *Salmonella* Typhimurium na XLD agaru



Slika 7. Izgled kolonija *Salmonella* Typhimurium na BG agaru



Slika 8. Izgled kolonija *Salmonella Paratyphi B* na XLD agaru

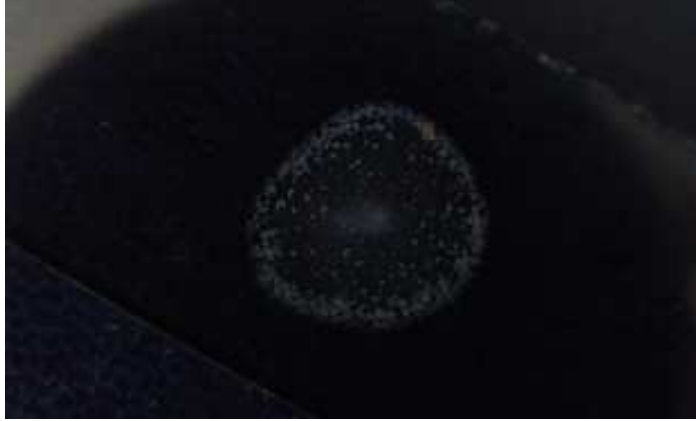


Slika 9. Izgled kolonija *Salmonella Gallinarum* na XLD agaru

Serološkom determinacijom ustanovljeno je prisustvo sledećih serovarijeteta:

- *Salmonella* Enteritidis
- *Salmonella* Typhymurium (odnosno salmonele gruoce 2)

- *Salmonella* Gallinarum biotip Gallinarum
- *Salmonella* Gallinarum biotip Pullorum



Slika 10. Prikaz rezultata serološke tipizacije salmonela-
brza aglutinacija na pločici.

U tabeli 12 prikazani su izolovani serovarijeteti i lokaliteti farmi sa kojih su poticali uzorci

Tabela 12. Prikaz serovarijeteta iz roda *Salmonella* poreklom od živine tokom 2016. god.

R/b	Lokaliteti sa kojih su poticali uzorci	Broj izolata	Vrsta uzorka	Serovarijeteti
1.	Podgorica	10	Feces koka nosilja, feces tovnihi piladi, Kloakalni brisevi	<i>Salmonella</i> Enteritidis
2.	Danilovgrad	17	Feces koka nosilja	<i>Salmonella</i> Enteritidis
3.	Herceg Novi	7	Feces koka nosilja	<i>Salmonella</i> Enteritidis
4.	Bijelo Polje	12	Feces tovnihi piladi	<i>Salmonella</i> Infantis, <i>Salmonella</i> Paratyphi B
5.	Mojkovac	3	Uginula pilad	<i>Salmonella</i> Infantis, <i>Salmonella</i> Paratyphi B
6.	Rožaje	1	Feces koka nosilja	<i>Salmonella</i> Enteritidis
Ukupno:		50		

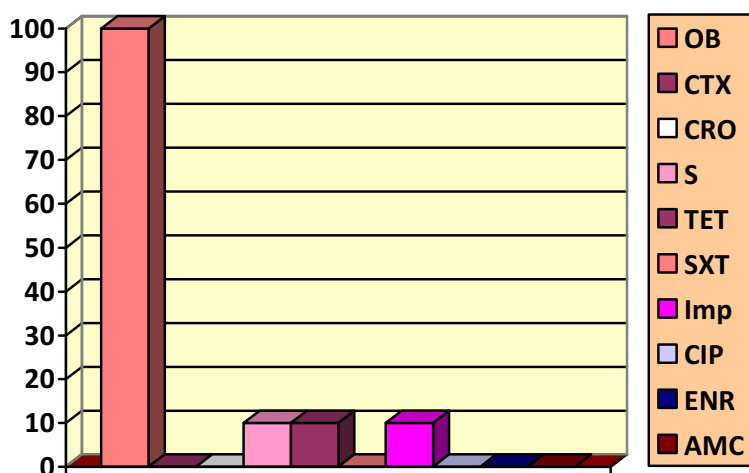
Referentni sojevi *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Termo Scientific, Lenexa-USA).

Tabela 13. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike koji se koriste u klinickoj praksi serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* izolovanih od živine sa farmi na različitim lokalitetu

Ispitivani sojevi	ISPITIVANI ANTIBIOTICI / REZULTATI OSETLJIVOSTI (zone inhibicije rasta)									
	OB	CTX	CRO	S	TET	SXT	Imp	CIP	ENR	AMC
1 PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2 PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10PG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17DG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1HN	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2HN	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3HN	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4HN	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5HN	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6HN	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7HN	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1RO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1MK	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2MK	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
3MK	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
1BP	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2BP	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3BP	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
4BP	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5BP	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6BP	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7BP	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8BP	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
9BP	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10BP	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11BP	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12BP	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S

Iz tabele 13. se može videti da je kod svih izolata utvrđena rezistencija na kloksacilin, kod dva izolata iz Mojkovca i tri iz Bijelog Polja na tetraciklin i imipenem. Na sve ostale antibiotike (cloxacillin, cefotaxime, ceftriaxone, streptomycin, tetracycline, sulphametoazole/trimethoprim, Imipenem, ciprofloxacin, enrofloxacin, amoxycillin / clavulanic acid) izolovani serovarijeteti salmonela su bili osetljivi.

Rezultati ispitivanja osetljivosti/ rezistencije odabranih serovarijeteta salmonela na navedene antibiotike prikazani su i grafikonom 1.



Grafikon 1. Prikaz rezist kod izolovanih serov. Salmonella

Legenda: OB – cloxacillin, CTX – cefotaxime, CRO – ceftriaxone, S – streptomycin, TET – tetracycline,

SXT – sulphametoazole / trimethoprim, Imp – Imipenem, CIP – ciprofloxacin, ENR – enrofloxacin,

AMC – amoxycillin / clavulanic acid.

Kod ispitivanih sojeva ustanovljena je rezistencija na neke penicilinske preparate kao što je kloksacilin, dok na amoksicilin sa klavulanskom kiselinom rezistencija nije utvrđena.

Rezistencija prisutna u niskom procentu od 10 % zabeležena je na tetraciklin, imipenem i streptomycin.

Svi sojevi su osjetljivi na fluorohinolone (ciprofloksacin), sulfopreparate (sulfametoksazol+trimetoprim), cefalosporine druge i treće generacije (cefuroksim i ceftriakson) i na fluorohinolonske preparate treće generacije (enrofloksacin i norfloksacin).

5.3. Rezultati osetljivosti *Salmonella* primenom Vitek aparata

Vrednosti MIK (minimalnih inhibitornih koncentracija) određenih antibiotika za odabrane sojeve serovarijeteta *Salmonella* Enteritidis primenom aparata VITEK 2 iznosile su za: ampicilin/sulbaktam $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ (S), piperacilin $\leq 4 - 64 \mu\text{g/ml}$ (S - R), cefuroksim $4 - 32 \mu\text{g/ml}$ (S - R), cefuroksim aksetil $4 - 32 \mu\text{g/ml}$ (S - R), cefiksime $\leq 0,25 - 2 \mu\text{g/ml}$ (S - I), ceftriakson $\leq 1 - 2 \mu\text{g/ml}$ (S - I), cefepim $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ (S), aztreonam $\leq 1 - 8 \mu\text{g/ml}$ (S), meropenem $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ (S), levofloksacin $\leq 0,12 - 0,25 \mu\text{g/ml}$ (S), moksifloksacin $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ (S), minociklin $\leq 1 - 4 \mu\text{g/ml}$ (S), tetraciklin $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ (S), tigeciklin $\leq 0,5 - 1 \mu\text{g/ml}$ (S), hloramfenikol $\leq 2 - 8 \mu\text{g/ml}$ (S), kolistin $\leq 0,5 - 1 \mu\text{g/ml}$ (S) i sulfametoksazol/trimetoprim $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (S).

5.4. Rezultati ispitivanja prisustva β laktamaza proširenog spektra delovanja kod *Salmonella* izolovanih od živine

Izolovani serovarijeteti *Salmonella enterica* podvrste *enterica* ispitivani su i ESBL testom. Diskovi ceftadizima, amoksicilina sa klavulanskom kiselinom i cefotaksima ređani su tako da je međusobna udaljenost od centrara svakog diska iznosila 3 cm. Primenom ESBL testa nije ustanovljeno prisustvo β laktamaza proširenog spektra delovanja ni kod jednog od ispitivanih sojeva.

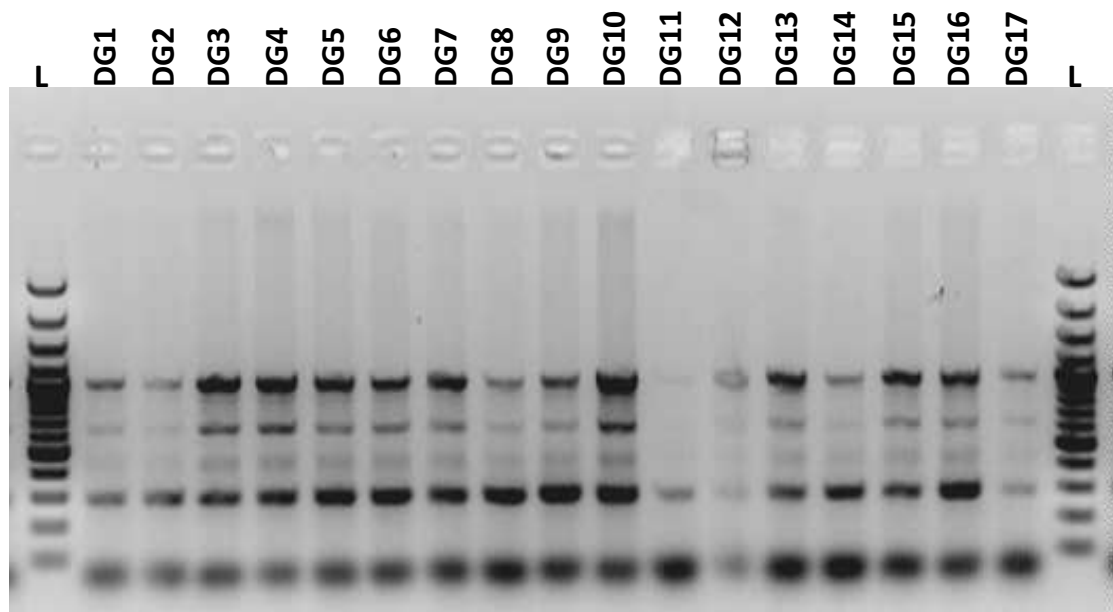
Od obrađenih uzoraka izolovano je 135 serovarijeteta *Salmonella enterica* podvrste *enterica* za detaljnija ispitivanja molekularnim metodama multipleks PCR i elektroforezom u polju jednosmerne struje (PFGE) odabrano je pedeset izolata srazmerno veličini farme i učestalosti nalaza pojedinih izolata.

5.5. Rezultati molekularne karakterizacije *Salmonella enterica* podvrste *enterica* dobijeni primenom metode multipleks PCR

U poslednjih nekoliko godina ,razvojem visoko osetljivih molekularnih metoda i dešifrovanjem genoma salmonele(McClelland i sar.,2001), omogućen je mnogo brži, jeftiniji i pouzdaniji način identifikacije, a time i potvrde ovog mikroorganizma. Multipleks PCR metoda se zasniva na izolovanju DNK iz salmonele, a potom se iz dobijenog izolata DNK, ciljano vrši amplifikacija određene sekvence serovar-specifičnih gena. Čitava procedura traje oko 6 časova, za razliku od standardnih metoda koje traju od tri do pet dana. Prednost navedene metode naročito dolazi do izražaja u situacijama pojavljivanja naglih epidemija i/ili epizootije salmoneloze, kada je i neophodna brza i pouzdana identifikacija uzročnika. U ovom ispitivanju želeli smo da izolovane salmonele sa nekoliko farmi živine koje su lokalizovane na severu, centralnom i južnom delu Crne Gore precizno identifikujemo kao i da diferenciramo njihove serovarijete.

Analizom rezultata dobijenih primenom metode multipleks PCR prikazanih u tabeli 13 i slici 7 može se videti da svih 17 izolata iz fecesa koka nosilja poreklom sa farme na teritoriji opštine Danilovgrad, ima identičan PCR profil, svi formiraju 3 DNK fragmenta u agaroznom gelu. Jedan DNK fragment od 993bp odgovara genu *bcfC*, drugi DNK fragment od 636bp odgovara genu *steB* i treći DNK fragment od 293bp odgovara genu *sdf* i svi pripadaju serovarijetetu *Salmonella* Enteritidis.

Kontrolni soj *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 je imao identičan profil kao i svih 17 izolata ispitanih primenom metode multipleks PCR.



L – 100bp DNA Ladder Fermentas, Thermo

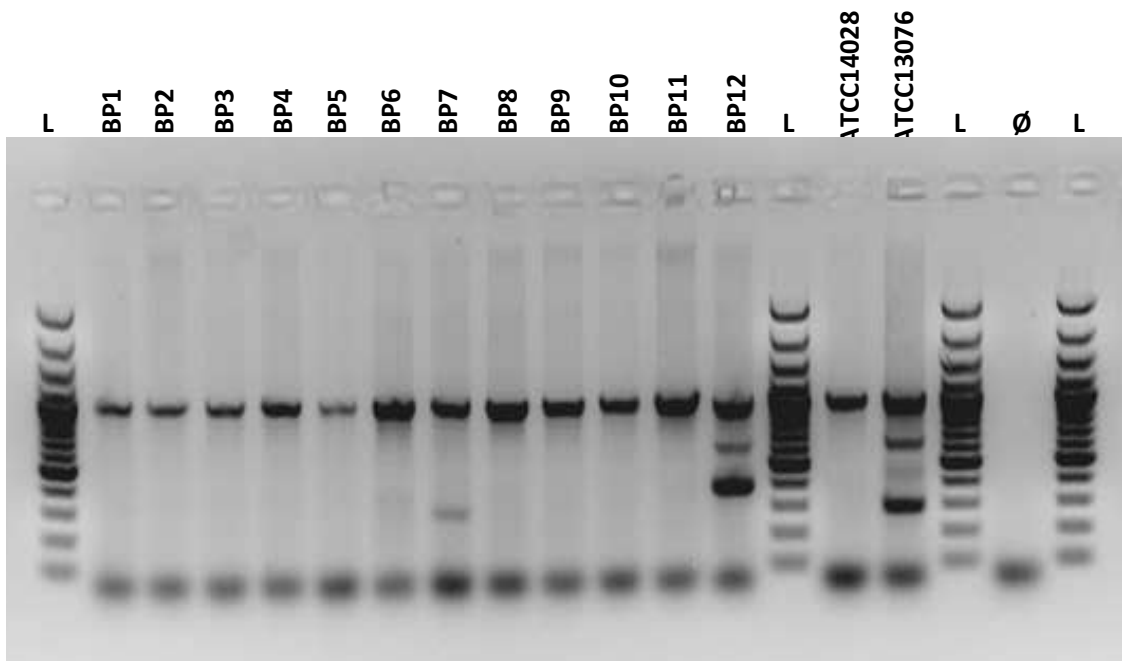
Slika 13. Prikaz agar gel elektroforezom dobijenih DNK fragmenata

Tabela 14. Rezultat molekularne karakterizacije serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* podvrste *enterica* sa farme na teritoriji opštine Danilovgrad metodom multipleks PCR

Izolati	Multipleks PCR pozitivan za						Serovar
	<i>bcfC</i> (993bp)	<i>heli</i> (782bp)	<i>steB</i> (636bp)	<i>rhs</i> (402bp)	<i>sdf</i> (293bp)	<i>gly</i> (170bp)	
DG (1-17)	+	-	+	+	+	-	<i>S</i> Enteritidis

Analizom rezultata dobijenih primenom metode PCR od 12 izolata iz fecesa tovnih piladi poreklom sa farme na teritoriji opštine Bijelo Polje prikazanih u tabeli 15 i slici 11, utvrđeno je da je 10 izolata imalo identičan PCR profil i prema tabeli koja je data u metodi multipleks PCR izolati su pripadali serovarijetetima grupe 2. (Mogli bi pripadati serovarijetetima *Salmonella* Typhimurium ili *Salmonella* Montevideo koji su registrovani u regionu).

Kontrolni soj *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 je imao identičan profil primenom metode PCR kao i 10 ispitivanih izolata. Jedan izolat, označen kao BP7 je imao drugačiji PCR profil koji prema korišćenoj metodi nije mogao biti svrstan ni u jedan prikazani serovarijetet, kao ni u grupu. Za drugi izolat označen kao BP12 koji je na osnovu analize imao različit PCR profil je utvrđeno da pripada serovarijetetu *Salmonella* Gallinarum biotip Gallinarum.



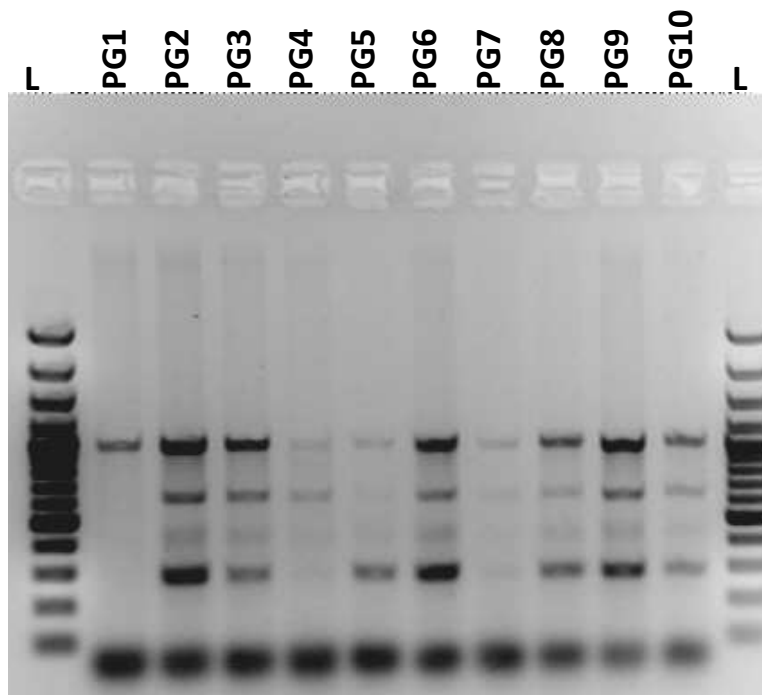
L – 100bp DNA Ladder Fermentas, Thermo Scientific

Slika 14. Prikaz DNK fragmenata ispitivanih serovar. *Salmonella*

Tabela 15. Rezultat molekularne karakterizacije serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* podvrste *enterica* sa farme na teritoriji opštine Bijelo Polje metodom multipleks PCR

Izolati	Multipleks PCR pozitivan za						Serovar
	<i>bcfC</i> (993bp)	<i>heli</i> (782bp)	<i>steB</i> (636bp)	<i>rhs</i> (402bp)	<i>sdf</i> (293bp)	<i>gly</i> (170bp)	
BP (1-6, 8-11)	+	-	-	-	-	-	Grupa 2
BP (7)	+	-	-	-	+	-	-
BP (12)	+	-	+	+	-	-	Gallinarum biotip Gallinarum

Analizom rezultata dobijenih primenom metode PCR od 10 izolata iz fecesa koka nosilja, fecesa tovne piladi i kloakalnih briseva poreklom sa farme na teritoriji opštine Podgorica prikazanih na slici 9 i tabeli 12, utvrđeno je da je 9 izolata imalo identičan PCR profil i da izolati pripadaju serovarijetetu *Salmonella* Enteritidis. Identičan profil dobijen primenom metode PCR imao je kontrolni soj *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Jedan izolat označen kao PG1 je imao PCR profil kao kontrolni soj *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 i pripadao je grupi 2.



L – 100bp DNA Ladder Fermentas, Thermo Scientific

Slika 15. DNK fragmenti u agaroznom gelu izolovanih serovarijeteta *Salmonella enterica* sa farme živine na teritoriji opštine Podgorica

Tabela 16. Rezultat molekularne karakterizacije metodom multipleks PCR serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* podvrste *enterica* sa farme na teritoriji opštine Podgorica

Izolati	Multipleks PCR pozitivan za						Serovar
	<i>bcfC</i> (993bp)	<i>heli</i> (782bp)	<i>steB</i> (636bp)	<i>rhs</i> (402bp)	<i>sdf</i> (293bp)	<i>gly</i> (170bp)	
PG 1	+	-	-	-	-	-	Grupa 2
PG (2-10)	+	-	+	+	+	-	<i>S.Enteritidis</i>

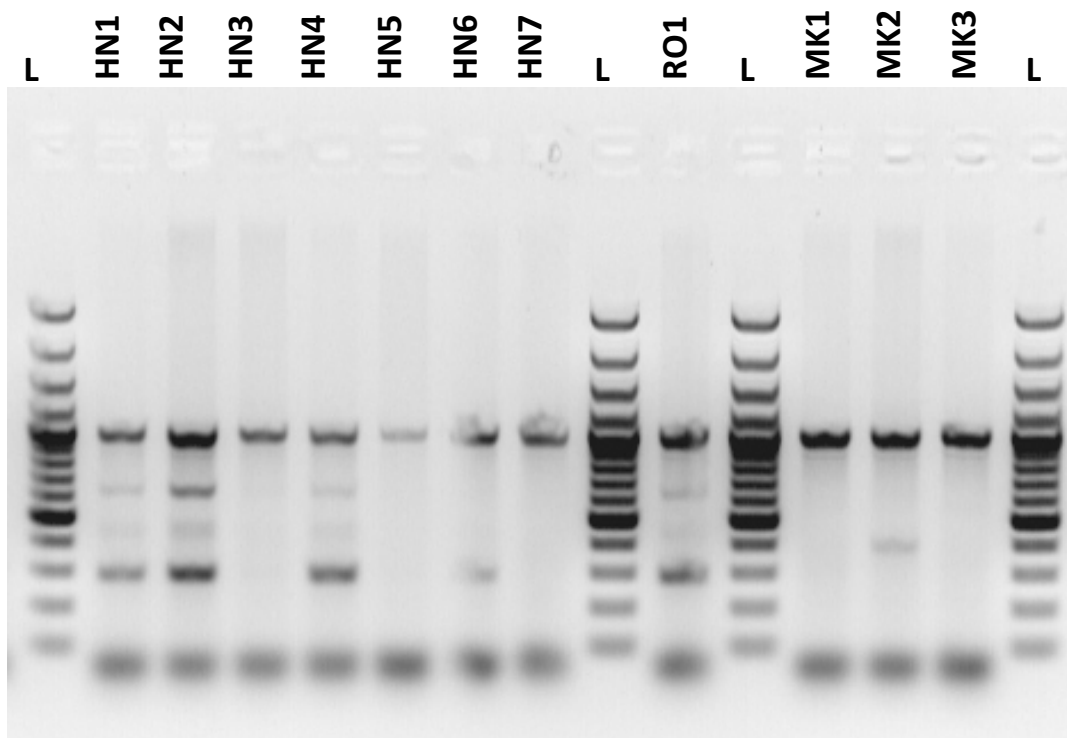
Analizom rezultata dobijenih primenom metode PCR od 7 izolata iz fecesa koka nosilja poreklom sa farme na teritoriji opštine Herceg Novi, utvrđeno je da su 3 izolata imala identičan profil kao kontrolni soj *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i da pripadaju serovarijetetu *Salmonella* Enteritidis, dok su 3 izolata imala identičan PCR profil kao kontrolni soj *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 i da pripadaju grupi 2. Izolat označen kao HN6 je imao jedinstven PCR profil u ovoj grupi izolata prema korišćenoj metodi nije mogao biti svrstan ni u jedan prikazani serovarijetet, kao ni u grupu.

Analizom rezultata dobijenih primenom metode PCR od 3 izolata iz organa uginule piladi poreklom sa farme na teritoriji opštine Mojkovac, utvrđeno je da su 2 izolata imala identičan PCR profil kao kontrolni soj *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 i da pripadaju grupi 2. Jedan izolat, označen kao MK2 je imao drugačiji PCR profil i utvrđeno je da pripada serovarijetetu *Salmonella* Gallinarum biotip Pullorum.

Analizom rezultata dobijenih primenom metode PCR za jedini izolat iz fecesa koke nosilje poreklom sa farme na teritoriji opštine Rožaje, utvrđeno je da ima identičan profil kao i kontrolni soj *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i da pripada serovarijetetu *Salmonella* Enteritidis.

Tabela 17. Usporedni prikaz serovarijeteta *Salmonella enterica* podvrste enterica sa tri farme detektovanih metodom multipleks PCR

Izolati	Multipleks PCR pozitivan za						Serovar
	<i>bcfC</i> (993bp)	<i>heli</i> (782bp)	<i>steB</i> (636bp)	<i>rhs</i> (402bp)	<i>sdf</i> (293bp)	<i>gly</i> (170bp)	
HN (1-2, 4)	+	-	+	+	+	-	<i>S. Enteritidis</i>
HN (3, 5, 7)	+	-	-	-	-	-	Grupa 2
HN (6)	+	-	-	-	+	-	-
MK (1, 3)	+	-	-	-	-	-	Grupa 2
MK (2)	+	-	-	+	-	-	<i>S. Gallinarum</i> biotip <i>Pullorum</i>
RO (1)	+	-	+	+	+	-	<i>S. Enteritidis</i>



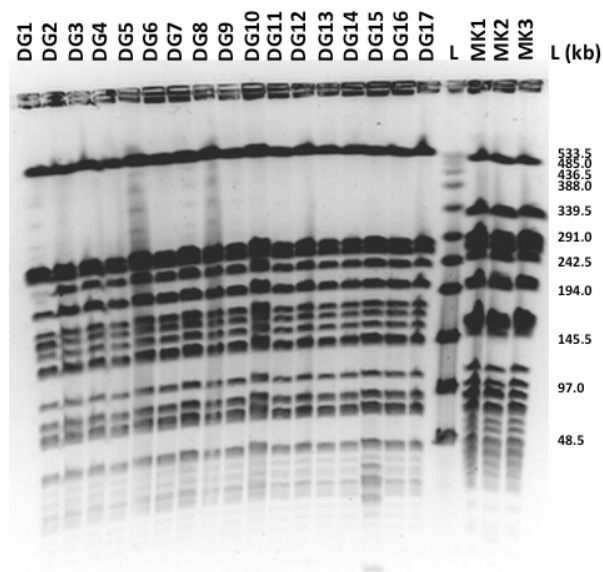
L – 100bp DNA Ladder Fermentas, Thermo Scientific

Slika 16. Uporedni prikaz DNK fragmenata u agaroznom gelu serovarijeteta salmonela
 Izolovanih od živine sa tri lokaliteta (HN-Herceg Novi, RO1-Rožaje i MK-Mojkovac)

5.6. Rezultati analize izolata *Salmonella enterica* podvrste *enterica* dobijeni primenom agar gel elektroforeze u polju jednosmerne struje (PFGE)

Bakterijske ćelije *Salmonella* spp iz logaritamske faze rasta su inkorporisane u 1% In Cert agarozu rastvorenu u EET puferu (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10mM Tris, pH8). Agarozni blokčići su iz modlica pebačeni u epruvete i tretirani proteinazom K (0.5 mg/ml u EET puferu sa 0,5% SDS-om) preko noći na 50°C. Nakon inaktivacije proteinaze K 0,1 mM PMSF-om agarozni blokčići su oprani 2 puta po 30 minuta u sterilnoj vodi (5 ml vode po blokčiću), a zatim su isečeni na po 4 dela i podvrgnuti *in situ* digestiji *SpeI* restrikcionim enzimom. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem STOP pufera (1 M saharoza, 100 mM EDTA, pH8) i uzorci su čuvani na +4°C do nanošenja na gel. Dobijeni restrikcioni fragmenti su razdvajani na 1,2% agaroznim gelovima u pulsirajućem električnom polju koje je trajalo: pulsevi 8 sekundi (N/S i E/W) 8 časova i pulsevi 18 sekundi (N/S i E/W) u trajanju od 10 časova; ukupno 18 časova. Kao marker veličina nanošen je λ konkatermer (umnošci genoma λ faga) firme Biolabs.

Dobijeni rezultati primenom PFGE dati su prema redosledu nanošenja izolata/serovarijeteta na gelu po mestu izolacije radi direktnog međusobnog poređenja

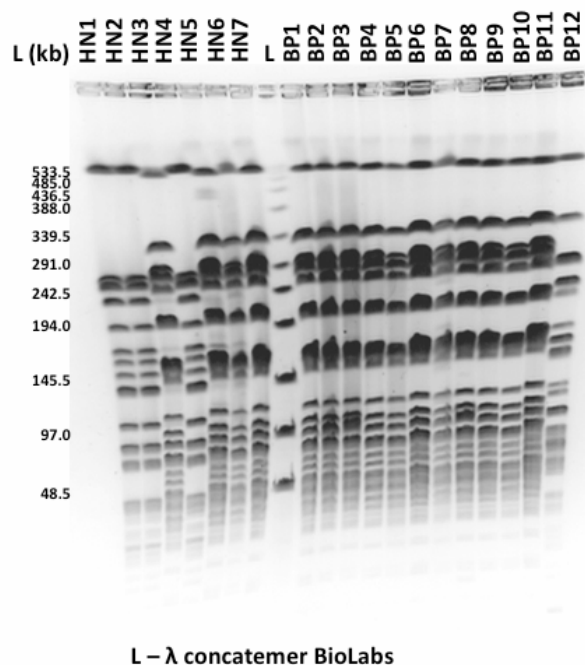


L – λ concatemer BioLabs

Slika 17. Rezultat PFGE analize u agaroznom gelu izolata Salmonela sa farme u Danilovgradu i Mojkovcu

Od 17 izolata sa farme na teritoriji opštine Danilovgrad, 16 izolata (2-17) je pripadalo istom *Spel* pulsotipu (PFGE tipu). Jedan izolat DG1 je pripadao drugačijem *Spel* pulsotipu. S obzirom da su svi ostali *Spel* fragmenti (sem fragmenta od 242 kb) isti može se zaključiti da se izolat DG1 najverovatnije razlikuje od ostalih izolata DG grupe po odsustvu mega plazmida veličine 242 kb, a da ima isto poreklo kao i ostali izolati.

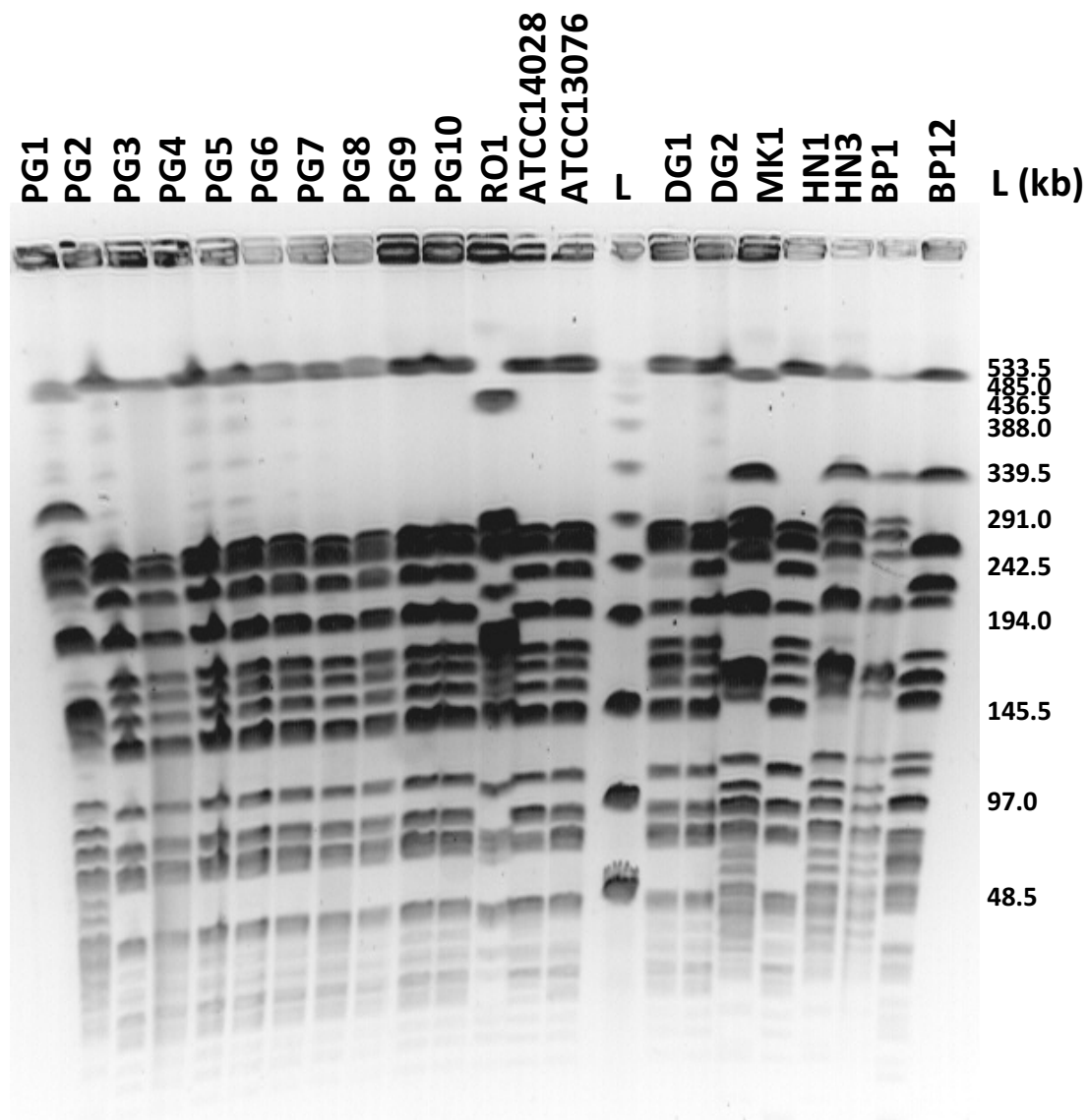
Sva 3 izolata sa farme na teritoriji opštine Mojkovac su pripadala istom *Spel* pulsotipu. Jedino u izolatu MK2 može se primetiti prisustvo dodatnog *Spel* fragmenta veličine oko 7 kb koji ukazuje da se možda ovaj izolat razlikuje od ostala dva po prisustvu plazmida od najmanje 7 kb.



Slika 18. Rezultat PFGE analize u agaroznom gelu izolata Salmonela sa farmi u Herceg Novom i Bijelom Polju

Od 7 izolata sa farme na teritoriji opštine Herceg Novi, 3 izolata (HN1, 2, 4) su pripadala istom *Spel* pulsotipu, dok su ostala 4 izolata (HN2, 5-7) pripadala drugom *Spel* pulsotipu.

Od 12 izolata sa farme na teritoriji opštine Bijelo Polje, 11 izolata (BP1-11) je pripadalo istom *Spel* pulsotipu, dok je jedan izolat (BP12) pripadao drugom *Spel* pulsotipu.



L – λ concatemer BioLabs

Slika 19. Komparativni prikaz analize izolovanih serovarijeteta *Salmonella* od živine sa različitih lokaliteta primenom PFGE

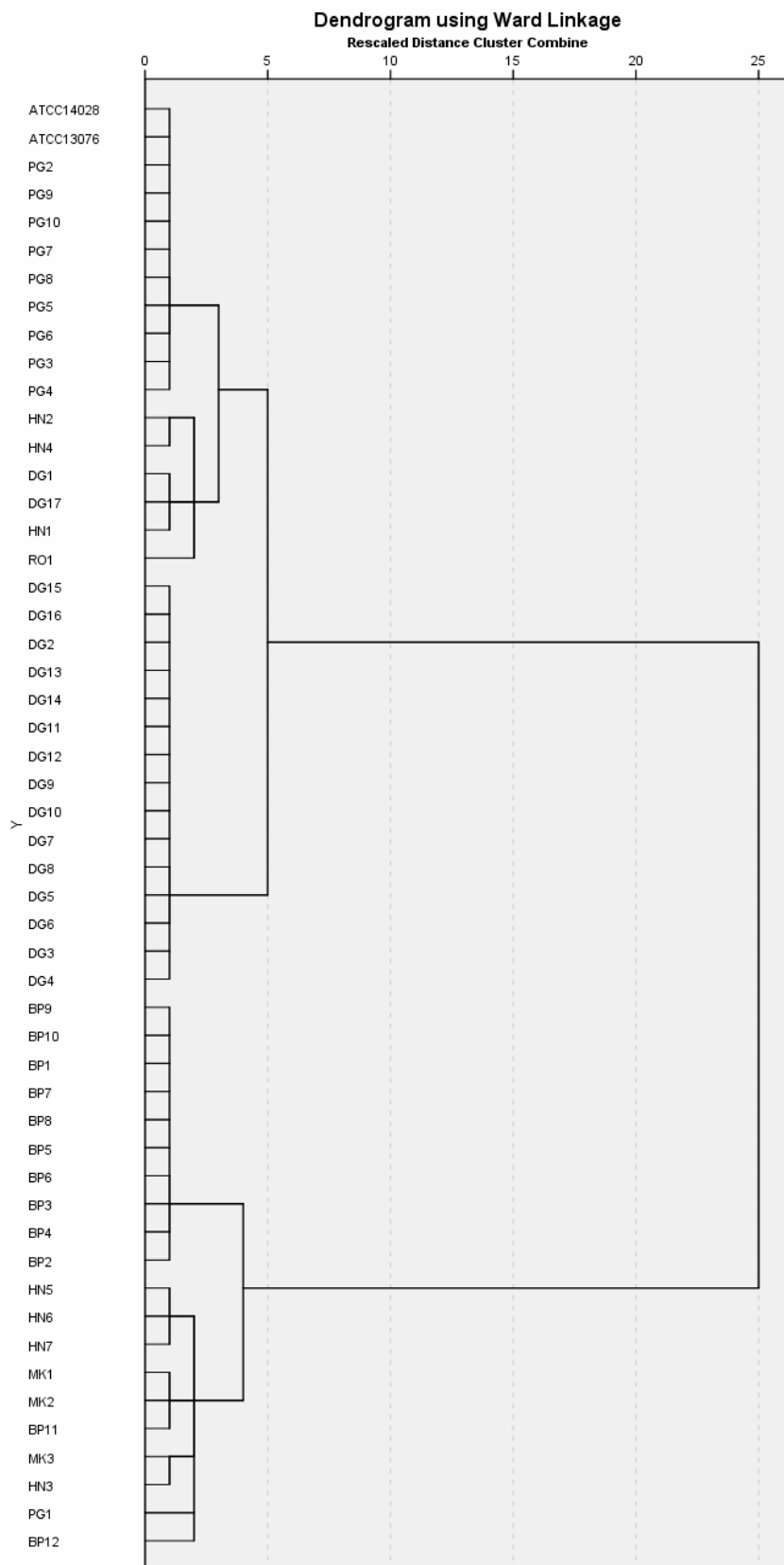
Od 10 izolata sa farme na teritoriji opštine Podgorica, 9 izolata (PG2-10) su pripadala istom *Spel* pulsotipu, dok je jedan (PG1) preostali izolat pripadao drugom *Spel* pulsotipu.

Jedini izolat sa farme na teritoriji opštine Rožaje (RO1) je imao jedinstven *Spel* pulsotip.

Izolati sa farme na teritoriji opštine Podgorica (PG2-10) pripadaju istom *Spel* pulsotipu kao i izolati sa farme na teritoriji opštine Danilovgrad (DG2-17) i izolati sa farme na teritoriji opštine Herceg Novi (HN 1, 2 i 4). Izolati sa farme na teritoriji opštine Herceg Novi (HN 3, 5, 6 i 7) pripadaju istom *Spel* pulsotipu kao i izolati sa farme na teritoriji opštine Bijelo Polje (BP 1-11), jedan izolat sa farme na teritoriji opštine Podgorica (PG 1) i izolati sa farme na teritoriji opštine Mojkovac (MK 1, 2 i 3). Po jedan izolat sa farmi na teritorijama opština Danilovgrad (DG1), Bijelo Polje (BP12) i Rožaje (RO1) su imali jedinstvene *Spel* pulsotipove.

Može se zaključiti da je nakon digestije 50 odabranih izolata *Salmonella enterica* podvrste *enterica* prema lokalitetima i zastupljenosti pomoću *Spel* restriktionog enzima i njihovom analizom pomoću PFGE utvrđeno 5 različitih *Spel* pulsotipova.

Zbirni rezultat za svih pedest izolata salmonela PFGE analize sa identifikovanim serovarijetetima i lokalitetima na kojima su ustanovljeni prikazani su i dendogramom (označen kao prilog 1) iz koga se može videti da postoji povezanost serovarijeteta salmonela na farmama živine koje su bile obuhvacene ispitivanjem.



Prilog 1. Dendrogram zastupljenosti izolovanih serovar. *S. enterica* analiziranih primenom PFGE

6. DISKUSIJA

Za pravilnu i uspesnu kontrolu svake infektivne bolesti pa i salmoneloze neophodno je dobro poznavanje epidemiologije i epizootiologije na terenu. Podaci o njenoj raširenosti, saradnja svih službi koje su odgovorne za kontrolu i nadzor takođe značajno mogu doprineti da se prevenira nastanak opasnih formi salmoneloze kod ljudi.

Salmoneloze su svrstane u alimentarne toksoinfekcije koje se prenose hranom i u najvećem broju zemalja su među vodećim uzročnicima trovanja. Na osnovu višegodišnjeg ispitivanja u zemljama EU ustanovljeno je da je najčešći uzročnik salmoneloze ljudi serovarijetet *S. Enteritidis* poreklom od živine. Zabeležene su sporadične infekcije sojevima *Salmonella* pojačane virulencije i patogenosti kao što je bio slučaj sa *S. Typhimurium* DT 204 i DT 193 koji su doveli do ozbiljnih kliničkih simptoma, kako kod ljudi, tako i kod životinja, tokom nekoliko epidemija u Evropi i SAD. Serovarijetet od kokošaka (*Gallus gallus*) *S. Infantis* je najčešće izolovani serovar u 2013. godini; u mesu brojlera najčešći serovari su bili *S. Infantis* i *S. Enteritidis* dok se iz hrane za kokoške najpre navodi *S. Senftenberg* pa za njom *S. Typhimurium*. Kod ćuraka je najčešće izolovana u 2013. *S. Saintpaul*, dok su u mesu ćuraka tri najčešća serovarijeteta bila *S. Derby*, *S. Typhimurium* i *S. Stanley*. Od 2008 do 2013 godišnji ukupni broj epidemija izazvanih Salmonelama u okviru EU se značajno smanjio za 38,1%, sa 1888 na 1168 epidemija. Kao i prethodnih godina jaja i proizvodi od jaja su u 44,9% pomenutih epidemija. bili najčešći prenosioci salmonele. Drugi po značaju za prenošenje salmonele navode se slatkiši i čokolade koji učestvuju u 10,5% epidemija (EFSA Journal 2015;13(1):3991).

U Crnoj Gori beleži se trend porasta incidence salmoneloza. Javlja se tokom čitave godine pokazujući sezonske varijacije. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su salmoneloze značajan ne samo javnozdravstveni, veterinarski i problem kliničke medicine, već i značajan ekonomski problem.

Potrebno je intenzivnije sprovođenje mera prevencije i suzbijanja salmoneloza, kao i bolja saradnja između svih subjekata koji učestvuju u proizvodnji, pripremi i distribuciji hrane. U Crnoj Gori ovom vrstom istraživanja bavi se mali broj stručnjaka uglavnom iz humane medicine. Prema izveštaju za period od 2001 do 2011. godine u Crnoj Gori najveći broj izolata, kao i u SAD, EU i Srbiji, odnosio se na *S. Enteritidis* (85,1%). Za razliku od većine prethodno pomenutih zemalja u kojima na drugom mestu po broju izolata dolazi *S. Typhimurium*, u Crnoj Gori na drugom mestu u 2011. godini nalazi se *Salmonella* grupe B, sa 5,9% izolata. Prema desetogodišnjem izveštaju prijavljene su 74 epidemije izazvane salmonelama sa 717 obolelih. U veterinarskoj medicini kontrola prisustva salmonela kod živine vrši se prema Pravilniku o načinu i mjerama kontrole salmonela kod živine i drugih specifičnih uzročnika zoonoza koji se prenose hranom (10.07.2015.).

U Specijalističkoj Vetrinarskoj Laboratoriji u Podgorici u periodu od 2010 – 2015.godine iz dostavljenih uzoraka izolovan je 201 serovarijetet *Salmonella*. Klasičnom identifikacijom i na osnovu serotipizacije sojevi *Salmonella* pripadali su grupama: B, C, C1, D i D1.

Danas je poznato preko 2600 serotipova salmonela prema izveštajima (EFSA and ECDC, 2012). Većina (59%) svih poznatih serovarijeteta pripada vrsti *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Serovarijeteti *Salmonella enterica* subsp. *enterica* najčešće pripadaju serološkim grupama A, B, C1, C2, D, i E. Sojevi iz pomenutih seroloških grupa uzrokuju približno 99% infekcija kod ljudi i toplokrvnih životinja (Brenner et al., 2000, Su LH et al.,2007). Najčešće izolovani serovarijeteti salmonela iz humanog materijala u periodu 2001-2007. godine širom sveta su *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* (Hendriksen et al., 2011).

U većini zemalja Evropske Unije, najčešći nalaz u slučajevima gastroenteritisa ljudi, čine *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*. Od ostalih serotipova koji se relativno često spominju kao uzročnici alimentarnih trovanja su: *S. Agona*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Newport*, *S. Panama*, *S. Saint-Paul*, *S. Thompson* i *S.*

Wirchow. Prema podacima iz Godišnjeg izveštaja Instituta za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u Srbiji je najzastupljenija *S. Enteritidis*, koja je u odnosu na ostale serotipove prisutna sa 80 %. Ovi podaci nisu vezani samo za sojeve izolovane iz kliničkog/humanog materijala nego i iz namirnica, radnih površina i dr. Ostali serotipovi imaju značajno manju procentualnu zastupljenost. Na drugom mestu se nalazi *S. Typhimurium*, zatim slede *S. Infantis* i *S. Hadar*, *S. Stanleyville*, *S. Agona*, *S. Tompson*, *S. Virchow*. Poslednjih godina, beleži se veći procenat nalaza *S. Infantis* kod brojlera.

Broj epidemija varira od države do države, i nije obavezno pokazatelj nivoa bezbednosti hrane. Smatra se da na ove razlike dobrim delom utiču i različiti sistemi nadzora i različita senzitivnost nacionalnih sistema za otkrivanje i istraživanje epidemija. Opadanje broja epidemija salmoneloza u zemljama EU praćeno je i opadanjem ukupnog obolevanja od salmoneloza. U 2012. godini prijavljeno je da je 91.034 osoba obolelo, što je za 4,7% manje u odnosu na prethodnu godinu. Još značajniji podatak je da se u zemljama EU od 2008. godine, beleži kontinuirani pad obolevanja od salmoneloza. U odnosu na 2008. godinu broj obolelih je smanjen za oko 25,0% (2008/120.760 obolelih) (EFSA and ECDC, 2014). Glavni razlozi opadajućeg trenda obolevanja su intenzivno sprovođenje programa suzbijanja salmoneloza kod živine i bolje sprovođenje higijenske prakse u lancu proizvodnje hrane (Lahuerta et al., 2011). U zemljama Evropske unije od 2011. godine, ovaj sistem je dodatno unapređen utvrđivanjem jačine epidemioloških i mikrobioloških dokaza o povezanosti hrane kao puta prenosa uzročnika epidemije. Obe grupe dokaza o povezanosti konzumiranja određene hrane sa nastankom epidemije, su prema izveštajima klasifikovani na jake i slabe (EFSA, 2011).

Dokazan je rastući trend u nivou kontaminacije prehrambenih proizvoda sa *Salmonella* spp., naročito u periodu 2006. i 2007., u Makedoniji. Najčešće kontaminirani prehrambeni proizvodi bili su: mehanički odvojeno pileće meso, mleko, mlečni proizvodi i slatkiši, a najčešće izolovana serogrupa bila je C (1).

U Hrvatskoj je evidentirano 90% sporadičnih slučajeva i 10% malih epidemija. Najčešći izvor zaraze su jaja (32%), živina (10%) i peciva (10%). Epidemije su uglavnom ograničene ni nivou porodica. Salmoneloze je glavni javno zdravstveni i ekonomski problem, kao i problem koji se odnosi na veterinarsku i humanu medicinu. Najbolji i najefikasniji način da se spreči širenje infekcije putem hrane je smanjenje salmoneloze u populaciji životinja koje su namenjene za ishranu ljudi.

Rezultati su pokazali da su koke nosilje najvažniji rezervoar salmoneloze ljudi u Evropi, sa 42.4% (7 903 000 slučajeva, 95% interval verodostojnosti 4 181 000-14 510 000) slučajeva, od kojih je 95.9% uzrokovano *S. Enteritidis*. U Finskoj i Švedskoj glavni izvori u većini slučajeva su vezana putovanja, a u drugim zemaljama koke ili svinje, naglašavajući razlike u epidemiologiji salmonela, sa fokusom na navike u ishrani širom Evropske Unije.

Lokalna cirkulacija bilo kojeg pokretnog serotipa salmonela živine i njen transfer kroz trgovinu živine i putovanja ljudi ima širi javni uticaj na zdravlje. Ispitivanjem je status pokretnih salmonela sa farmi brojlera i dobijena je prevalenca od 11% (95% sa varijacijama 5-17%). *S. Virchow* i *S. Kentucky* su dva glavna serovara izolovana sa farmi brojlera u objektima za uzgoj brojlera u Bangladešu Ovo je prvi izveštaj o bilo kom serovaru pokretnih salmonela iz objekata za uzgoj i komercijalnih farmi brojlera u Bangladešu.

Multirezistencija je evidentirana kod 92,8% izolata u Egiptu. Visok nivo kontaminacije pilećeg mesa multirezistentnim salmonelama može predstavljati problem za javno zdravlje.

Primenom PFGE otkriveno je više različitih pulstipova (39 Xbal, 48 BlnI, i 80 Xbal-BlnI), što ukazuje na nekoliko klonova koji kruže kroz lanac ishrane i više izvora transmisije. Uvidom u bazu podataka Pulse Net Europe može se zaključiti da je profil PFGE SENTXB.0001 najčešći profil PFGE u Evropi, kao i to dominira u Grčkoj sa 33,3%. Takođe, primenom MLST ustanovljeno je da svi ispitivani sojevi pripadaju istoj sekvenci (ST11), koja predstavlja najčešći ST u Evropi.

Primećene su visoke stope rezistencije na nalidiksinsku kiselinu među izolatima poreklom od ljudi i izolatima od živine (~ 25%), što ukazuje na potencijalno neuspešno lečenje fluorohinolonskim preparatima. Podaci prikupljeni tokom ovog istraživanja pokazuju da su sojevi poreklom iz više rezervoara u opticaju u Grčkoj, kroz lanac ishrane. Dominantni profili u Grčkoj se poklapaju sa profilima Pulse Net Europe, što ukazuje na sličnosti između *S. Enteritidis* populacije u Grčkoj i Evropi.

Postoji velika podudarnost između rezultata dobijenih metodom multipleks PCR i tradicionalnim metodama izolacije. Ova ispitivanja pokazuju da je multipleks PCR metoda pouzdana, korisna i isplativa. Metoda je jednako dobra kao i tradicionalne metode izolacije i omogućava osetljivu detekciju, kako u veštački, tako i u prirodno kontaminiranim uzorcima.

Za ove tri zemlje, učestalost rezistencije na antimikrobne lekove se značajno razlikuje za ampicilin ($P = 0.001$) i sulfametoksazol trimetoprim SXT ($P = 0.032$). Kod 83 (98.8%) od ukupno 84 izolata utvrđeno je 39 obrazaca multirezistencije.. Veličina farme značajno ($P = 0,032$) utiče na učestalost rezistencije na kanamicin širom zemlje. Generalno, među 14 testiranih serotipova salmonela ustanovljena je značajna rezistencija ($P < 0.05$) na kanamicin, ampicilin i sulfametoksazol-trimetoprim. Rezultati ukazuju da je relativno visoka učestalost rezistencije na šest testiranih antimikrobnih lekova (eritromicin, streptomycin, gentamicin, kanamicin, ampicilin i tetraciklin). Detektovana multirezistencija može predstavljati problem vezano za profilaksu i terapiju koka nosilja u ovim zemljama.

Serovarijeteti *Salmonella* su izolovani iz 26% uzoraka mesa. Skoro 98% testiranih izolata bilo je multirezistentno. Ceftiofur, enroflokacin, nalidiksinska kiselina i tetraciklin su antimikrobni lekovi na koje su najveći stepen rezistencije ispoljili izolati iz roda *Salmonella* i *E. coli*. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na potrebu za brзом realizacijom integrisanog programa za nadzor nad antimikrobnom rezistencijom od strane kolumbijskih vlasti u cilju praćenja

trendova, podizanja svesti i pomoći u promovisanju prakse u zaštiti kasnije generacije antimikrobnih lekova.

Trideset (71.4%) od 42 testirana izolata bilo je multirezistentno na najmanje dva antimikrobna sredstva. Ovo istraživanje je pokazalo da kontaminacija multirezistentnom salmonelom sirovog pilećeg mesa u ovoj oblasti Rumunije, može ozbiljno ugroziti zdravlje ljudi.

Salmonella Infantis je izolovana sa 28 farmi živine od 55 ispitivanih u severnom dijelu Srbije. Detektovana su tri rezistotipa tipa, ali najučestalija rezistencija bila je na nalidiksinsku kiselinu (NAL) i tetraciklin (TET) kod 18 izolata. Dva izolata su rezistentna samo na NAL i osam izolata je osjetljivo na antibiotike. Minimalna inhibitorna koncentracija MIC na TET ima raspon 1-256 mg/L. Trinaest izolata pokazalo je MIC na TET u rasponu 256 mg/L, četiri izolata MIC od 128 mg/L i jedan izolat je imao MIC 64 mg/L. Deset izolata je pokazalo MIC od 1mg/L. Bilo je očigledno da je *Salmonella* Infantis prisutna i kod brojlera i kod nosilja. Tokom ovog istraživanja, detektovani su tetA geni i odgovarajući tetR geni (encoding the repressor protein) i hromozomski segment Tn1721 koji je odgovoran za rezistenciju na TET. Prisustvo ne konjugovanog transposona iz ne konjugovanog plazmida omogućava širenje rezistencije na TET kod *Salmonella*. Autori su zaključili da bi bolje biosigurnosne mere na živinarskim farma živine u Srbiji bile najbolja opcija za eliminaciju infekcije koju izazivaju vrstama. Racionalna upotreba antibiotika je neophodna bi se sprečilo dalje širenje otpornih klonova *Salmonella* Infantis. U Crnoj Gori 2012. godine formirana je multidisciplinarna komisija (lekari, veterinari i mikrobiolozi) od strane Ministarstva zdravlja radi praćenja upotrebe antibiotika, kako u humanoj, tako i veterinarskoj medicini, ali zvaničnih podataka o rezistenciji bakterija još uvek nema.

Poznato je da se izolacija i identifikacija salmonela u mikrobiološkim laboratorijama odvija prema posebno koncipiranim protokolima. Najšire su prihvaćena dva osnovna protokola: protokol FDA-Food and drug Administration, (*Bacteriological Analytical Manual*, BAM, Chapter 5, *Salmonella*) i ISO 6579:2002 „*Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the*

detection of Salmonella spp. Izolacija i identifikacija salmonela se bitno razlikuje od izolacije i identifikacije drugih vrsta enterobakterija. Prema navedenim protokolima, izolacija salmonela obuhvata fazu neselektivnog predobogaćenja, zatim fazu selektivnog obogaćenja, zasejavanje na diferencijalne podloge, biohemijsku tipizaciju (dokazivanje da izolovani mikroorganizam pripada rodu *Salmonella*) i na kraju, serološku tipizaciju radi određivanja serovarijeteta. Ova poslednja faza u identifikaciji salmonela zasniva se na primeni metode brze aglutinacije na pločici uz primenu specifičnih dijagnostičkih seruma. Brza aglutinacija na pločici je metoda stara više od 80 godina. Pored toga što predstavlja osnovu za određivanje serovarijeteta salmonela, ova metoda je lako primenljiva u većini laboratorija, tako da se i danas široko koristi u rutinskoj dijagnostici kao i u programima nadzora salmoneloze. Ipak, već dugo je poznato da karakterizacija izolata ovom metodom za potrebe epidemioloških i epizootioloških istraživanja nije dovoljno precizna. Uvođenjem metode gel elektroforeze u pulsirajućem strujnom polju-PFGE (eng. *pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) za identifikaciju salmonela, došlo je do značajnog napretka u ovoj oblasti, a u literaturi su se pojavile prve publikacije koje su ukazivale na bitne nedostatke aglutinacije kao metode za određivanje serovarijeteta salmonela. Rezultati dobijeni PFGE metodom značajno su se razlikovali od rezultata dobijenih primenom metode brze aglutinacije. Tokom poslednjih dvadeset godina došlo je do intenzivnog razvoja molekularnih metoda baziranih uglavnom na analizi molekula DNK ili u manjoj meri na analizi molekula RNK. Ove metode, u poređenju sa klasičnim metodama, imaju značajnih prednosti, kako sa aspekta tačnosti i brzine dobijanja rezultata, tako i sa ekonomskog aspekta. S obzirom da je metoda lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction* - PCR) dostupna sve većem broju mikrobioloških laboratorija, u svetu se intenzivno radi na razvijanju i uvođenju novih protokola baziranih na PCR metodologiji za brzu identifikaciju pojedinih serotipova salmonela, odnosno baziranih na detekciji gena od značaja u klasifikaciji bakterija ovog roda. U ovoj disertaciji bile su primenjene molekularne metode novijeg datuma u ispitivanjima autohtonih izolata salmonela. Dobijeni rezultati su

omogućili adekvatno i potpunije poređenje sa publikovanim podacima o prisutnosti, geografskoj rasprostranjenosti i epizootiološkom značaju različitih genotipova vrste *Salmonella enterica* kao i validaciju i uvođenje nove multipleks PCR metode u rutinske procedure identifikacije salmonela.

Salmoneloza je zoonoza i spada u najčešće bolesti koje se prenose hranom. Za razliku od mnogih drugih infektivnih bolesti koje su iskorenjene ili su suzbijene i više nemaju veliki značaj, salmoneloza je, uprkos svim medicinskim i naučnim dostignućima savremene civilizacije, i dalje neprekidno prisutna u svim državama sveta, bez obzira na geografske, kulturološke i druge karakteristike podneblja. Iako se u svim državama na svim kontinentima redovno sprovodi kontinuirani monitoring mikrobiološke ispravnosti namirnica, svake godine milioni ljudi u razvijenim zemljama obole od salmoneloze inficirajući se preko kontaminirane hrane. Sa aspekta ulaska ovog uzročnika u lanac ishrane, od posebnog značaja je prisustvo i održavanje *Salmonella* u jatima živine, tako da su proizvodi od živine, meso i jaja, već tradicionalno glavni izvori infekcije za ljude. Kod domaće živine, najčešća je inaparentna (asimptomatska) infekcija salmonelama što je epidemiološki i epizootiološki najopasniji i najnepovoljniji oblik infekcije jer uzročnik ostaje prikriven. Stoga se salmonele statistički vrlo često nalaze u živinskom mesu i proizvodima od živinskog mesa kao i na ljusci jaja (horizontalno prenošenje salmonela), ali i u samim jajima odnosno u žumancetu (vertikalno prenošenje). Porast obima intenzivnog uzgoja živine tokom poslednjih godina, srazmerno je praćen visokom incidencijom salmoneloze kod živine i ljudi kao i problemima vezanim za proizvodnju zdravstveno bezbedne hrane. Samo u SAD je tokom 2009. godine proizvedeno 9 milijardi brojlera i preko 77 milijardi jaja. Prema podacima Evropske Komisije za bezbednost hrane (*European Food Safety Authority-EFSA*) u periodu od 2007. do 2011. godine, samo na području evropskih država evidentirano je 95548 epidemija salmoneloze čiji su izvor bila jaja ili pileće meso. Na osnovu procene američke renomirane institucije CDC (*Centers for disease control and prevention, USA*), na jedan prijavljeni odnosno registrovani slučaj salmoneloze kod ljudi, 38 slučajeva ostaje neprijavljeno. Zbog toga se smatra da realno, godišnje u svetu od salmoneloze oboli 1 milijarda ljudi,

a 3 miliona slučajeva se završi fatalnim ishodom. Prema navodima EFSA u izveštaju iz 2015.godine, u svetu se za lečenje ljudi od salmoneloze godišnje izdvaja 3 milijarde dolara. Pored hrane animalnog porekla, koja se tradicionalno smatra glavnim izvorom *Salmonella* za ljude, novija epidemiološka istraživanja sve češće identifikuju hranu biljnog porekla kao izvor salmoneloze. Kako se epidemije salmoneloze redovno završavaju određenim brojem smrtnih slučajeva ljudi, svaka nova epidemija praćena je i sudskim procesima, ozbiljnim ekonomskim troškovima, kako za lečenje i hospitalizaciju obolelih ljudi, tako i za suzbijanje i iskorenjivanje salmoneloze kod zaraženih životinja, ali i velikim tržišnim gubicima zbog propadanja kontaminiranih namirnica. U 2008.godini došlo je do jedne od najvećih epidemija salmoneloze u 21. veku kada je u 43 države SAD, Kanadi i Kolumbiji obolelo oko 1500 ljudi inficiranih preko ljutih papričica koje su bile kontaminirane serovarijetetom *S.Saintpaul*. Iste godine zbog nalaza *S.Typhimurium* u kikirikiju u SAD, sa tržišta je moralo da bude povučeno oko 4000 proizvoda koji su sadržali kontaminirani kikiriki, a korporacija koja je bila odgovorna za plasman kontaminiranog kikirikija na tržište je bankrotirala (*The Peanut Corporation of America*). S obzirom na to da se u svetu u svakom trenutku na svakom kontinentu dešavaju epidemije i epizootije salmoneloze, intenziviran je pritisak javnosti i proizvođača na naučnike da se što pre osmisle i inoviraju metode za brzu detekciju salmonela u uzorcima. Prema već navedenim protokolima, klasična izolacija salmonela traje 5 dana. Kako se životinje sumnjive na salmonelozu ne smeju otuđivati ili plasirati na tržište dok se čekaju rezultati mikrobiološke analize, proizvođači trpe velike ekonomske gubitke. Osim ovog problema, u poslednjih nekoliko godina se intenzivirala i problematika taksonomske klasifikacije salmonela i precizne identifikacije serovarijeteta kojih ima preko 2600. Prema aktuelnoj taksonomskoj klasifikaciji i stavovima, rod *Salmonella* obuhvata dve vrste: *S. enterica* i *S. bongori*. Vrsta *S. enterica* se dalje deli na 6 podvrsta, koje su na osnovu velike raznolikosti lipopolisaharidnih (O) i flagelarnih proteinskih antigena (H) svrstane u serovarijetete prema White–Kauffmann Le-Minor šemi. Broj serovarijeteta prema najnovijim podacima prelazi cifru od 2600, pri čemu približno 1600 pripada vrsti

S. enterica podvrsti *enterica* koja obuhvata serovarijetete od najvećeg značaja za zdravlje ljudi i domaćih životinja. Najnovija taksonomska podela salmonela značajna je i zbog toga što su nekada dva odvojena serovarijeteta Gallinarum i Pullorum, koji su visoko adaptirani na ptice i ne izazivaju bolest kod ljudi, sada preklasifikovani u jedan serovarijetet Gallinarum koji ima dva biotipa: biotip Gallinarum i biotip Pullorum. Biotip Gallinarum je invazivna vrsta, uzročnik tifusa živine, a biotip Pullorum, takođe invazivna vrsta, uzročnik belog proliva pilića. Ova oboljenja imaju izrazito veliki ekonomski značaj u živinarskoj proizvodnji, ali su u većini država iskorenjena zahvaljujući primeni zoohigijenskih mera. Ipak, posmatrano sa aspekta međusobnih asocijacija mikroorganizama, nestanak biotipa Gallinarum iz mnogih ekoloških niša doveo je do paradoksalnog prodora drugih serovarijeteta, naročito Enteritidis, Hadar, Infantis i Senftenberg, koji su danas prisutni u značajno većem procentu kod živine nego pre 30 i više godina. Precizna identifikacija serovarijeteta salmonela bitna je i sa tog aspekta što različiti serovarijeteti koji pripadaju vrsti *S. enterica* podvrsti *enterica*, nisu od podjednakog značaja kao zoonotski agensi. Neki od njih su specifični za vrstu životinje i retko se javljaju kao uzročnici salmoneloze kod ostalih vrsta. Oni koji su u stanju da zaraze više vrsta domaćih životinja i čoveka znatno se razlikuju po virulenciji i po sposobnosti da nadvladaju kompetitivni pritisak crevne mikroflore i da kolonizuju digestivni trakt. Ove razlike u virulenciji kod različitih serovarijeteta salmonela uzete su u obzir prilikom donošenja zakonskih regulativa kako u zemljama evropske unije, tako i u Crnoj Gori. Na osnovu tih zakonskih propisa, u suzbijanju salmoneloze kod živine posebne mere se primenjuju kod pojave serovarijeteta od posebnog značaja za zdravlje ljudi. U Pravilniku R.Crne Gore izvršena je podela salmonela na salmonele prve, druge i treće kategorije

U salmonele prve kategorije spadaju serovarijeteti *S.Enteritidis* i *S.Typhimurium*, u drugoj kategoriji su serovarijeteti *S. Hadar*, *S.Virchow* i *S.Infantis*, a u trećoj kategoriji je serovarijetet *S.Gallinarum*. Zbog toga je precizna identifikacija serovarijeteta izolata salmonela od ključnog značaja za adekvatnu procenu epizootiološke i epidemiološke situacije i rizika za javno zdravlje. Prethodnih godina su izvedeni pokušaji implementacije PCR metode u rutinsku

mikrobiološku dijagnostiku za direktno utvrđivanje prisustva određenih serovarijeteta salmonela u uzorcima fecesa, organa i hrane za životinje, bez prethodne izolacije. Najveća prednost primene PCR metode je brzina dobijanja rezultata, pa bi procedura detekcije salmonela mogla biti skraćena sa 5 ili više dana na samo 1 dan. Osnovni problem koji se javlja kod primene PCR u direktnoj detekciji salmonela u uzorcima jeste inhibitorno delovanje proteina i drugih komponenata iz uzoraka na samu PCR reakciju. Veoma je bitan način obrade uzoraka organa i fecesa i greške su česte (lažno negativni nalazi), tako da, iako se na tržištu mogu kupiti PCR kitovi za direktnu detekciju salmonela u uzorcima, ova metoda nije našla širu primenu u ovoj oblasti. Osim lažno negativnih rezultata, radi efikasne ekstrakcije molekula DNK iz salmonela eventualno prisutnih u uzorcima, zahteva se korišćenje komercijalnih ekstrakcionih sistema koji su skupi i stoga neekonomični. Zbog svega iznetog, još uvek se daje prednost klasičnim mikrobiološkim metodama koje su dugotrajne i stoga veoma nepodesne, ali su, za sada, u detekciji salmonela u uzorcima, najtačnije. Međutim, iako PCR nije našao širu primenu u direktnoj detekciji salmonela u uzorcima, sve je veća dominacija ove metode u tipizaciji serovarijeteta izolata, o čemu svedoče rezultati naučnih istraživanja u poslednjih 10 godina. Precizne epidemiološke i epizootiološke studije o rasprostranjenosti i značaju pojedinih serovarijeteta salmonela, isključivo se baziraju na rezultatima molekularnih metoda ispitivanja. Nisu, međutim, sve molekularne metode podjednako zastupljene i kvalitetne. Već spominjana PFGE je izrazito precizna metoda, ali veoma skupa, teška za izvođenje i dugotrajna (do 7 dana) zbog čega je nepopularna. Za razliku od PFGE, PCR je značajno lakša metoda za izvođenje. Međutim, PCR protokoli za određivanje serovarijeteta salmonela su do skoro bili neadekvatni zbog niske specifičnosti. Problem je bilo mapiranje genoma svih 2600 serovarijeteta salmonela koji su genomski vrlo srodni. Bilo je potrebno pronaći karakteristične gene koji se razlikuju u samo jednom paru nukleotida kod različitih serovarijeteta salmonela. U odnosu na klasične metode, uključujući serološku tipizaciju, prednost se daje PCR metodi ne samo zbog brzine izvođenja i preciznosti dobijenih rezultata, nego i zbog ekonomskih faktora-

dijagnostički serumi za aglutinaciju salmonela izuzetno su skupi (ako se nabavljaju od renomiranih proizvođača), a brzo se troše, za razliku od cene koštanja jedne reakcije PCR koja je vrlo niska ako se preračuna na nivo potrošnje za jedan uzorak. Za potrebe ekstrakcije DNK u ovoj oblasti rada (određivanje serovarijeteta), ne zahteva se primena komercijalnih ekstrakcionih DNK kitova, moguće je ekstrahovati DNK iz salmonela veoma jednostavnom i ekonomski izuzetno povoljnom metodom kuvanja.

Prema rezultatima publikovanim 2015. godine, a dobijenim primenom multipleks PCR-a, na teritoriji SAD najčešće zastupljeni serovarijeteti salmonela kod živine su *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* i *S. Kentucky*. *Salmonella Heidelberg* se u SAD sve češće javlja kao uzročnik salmoneloze ljudi koji su konzumirali kontaminirano živinsko meso. U naučnoj literaturi se ističe procena da će na teritoriji SAD u živinarskoj proizvodnji, serovarijetet *S. Enteritidis*, koji je trenutno najzastupljeniji, uskoro biti potisnut serovarijetetom *Heidelberg*. U EU je distribucija salmonela kod živine potpuno drugačija. Na osnovu izveštaja EFSA iz 2011. godine, najzastupljeniji serovarijetet kod živine u EU 2008. godine bio je *Infantis*, a zatim *Enteritidis*, *Kentucky* i *Typhimurium*. Ovo su rezultati prikazani na nivou EU kao jedne celine. Ako se analiziraju rezultati svake države članice EU, slika o procentualnoj zastupljenosti serovarijeteta salmonela se vrlo razlikuje od države do države. Najzastupljeniji serovarijetet kod živine u Mađarskoj bila je *S. Infantis* sa preko 96% zastupljenosti i zbog takve dominacije u Mađarskoj, *S. Infantis* je u ukupnom procentualnom obračunu dominantna kod živine na nivou cele EU. Najzastupljeniji serovarijetet u Litvaniji i Republici Češkoj 2008. godine bila je *S. Agona*, za razliku od toga u Švedskoj je *S. Agona* iste godine nađena samo u jednom uzorku i nalazi se na poslednjem mestu po zastupljenosti. U Irskoj je najzastupljeniji serovarijetet 2008. godine bio *S. Kentucky*. U većini ostalih država EU kod živine i dalje dominira serovarijetet *S. Enteritidis*. Za razliku od živine, na osnovu poslednjeg izveštaja EFSA, u državama EU kod ljudi je i dalje najčešći uzročnik salmoneloze serovarijetet *S. Enteritidis*, odmah iza njega *S. Typhimurium*. Međutim, očekuje se da će ova epidemiološka slika biti promenjena narednih godina jer je nemoguće da se ljudi u Mađarskoj najčešće inficiraju

serovarijetetom *S. Enteritidis* ako je sa skoro 100% zastupljenosti kod živine prisutan serovarijetet *S. Infantis*. Ovi podaci zapravo ukazuju na izuzetan značaj preciznog određivanja serovarijeteta salmonela kod procene rizika za zdravlje ljudi. U tom smislu, molekularne metode u određivanju serovarijeteta salmonela dobijaju sve veći značaj.

Za sada je dostupno vrlo malo podataka o rezultatima primene molekularnih metoda u identifikaciji salmonela poreklom od živine na teritoriji Republike Crne Gore. Drugačije rečeno, gotovo celokupna, rutinska mikrobiološka dijagnostika salmoneloze kod životinja u R. Crnoj Gori bazira se isključivo na primeni klasičnih metoda mikrobiologije, a time i većina publikovanih radova sadrži podatke bazirane samo na klasičnim metodama. Ako se uzme u obzir da je serološka identifikacija salmonela relativno neprecizna metoda sa velikim procentom grešaka koje mogu da se jave kao posledica neodgovarajućeg kvaliteta dijagnostičkih seruma, ali i zbog ukrštene antigenske reaktivnosti tj. velike antigenske sličnosti različitih serovarijeteta, jasno je da primena klasičnih metoda u ovoj oblasti može da ima za posledicu potpuno pogrešan uvid u epidemiološku/epizootiološku situaciju salmoneloze. To se već dogodilo 2012. godine u SAD kada je zabeležen slučaj da je soj salmonele serološkom tipizacijom identifikovan kao serovarijetet *S. Meleagridis*, a koji je kasnije na osnovu rezultata PCR metode preklasifikovan u *Salmonella Enteritidis* (*Salmonella enterica* supsecies *enterica* serovar. *Enteritidis*). Serovarijetet *S. Enteritidis*, zajedno sa serovarijetetom *S. Typhimurium*, pripada najznačajnijim salmonelama za zdravlje ljudi i životinja, dok serovarijetet *S. Meleagridis* nema naročiti značaj (ne pripada salmonelama prve, druge i treće kategorije i dovodi do salmoneloze samo sporadično, u pojedinačnim slučajevima). Dakle, ovakva greška u identifikaciji salmonela može da ima nesagledive posledice u epidemiologiji i epizootiologiji salmoneloze, jer opasan i značajan serovarijetet može biti pogrešno identifikovan kao beznačajan i ne tako opasan. Takođe, zabeležene su greške pri serološkoj tipizaciji salmonela koje su korišćenjem metode klasične aglutinacije identifikovane kao serovarijetet *S. Pullorum* koji je patogen samo za živinu i koji je u većini zemalja iskorenjen, a za koje je

primenom PCR metode utvrđeno da pripadaju serovarijetetu *S. Enteritidis*, koji je, kako je već rečeno, patogen za sve vrste životinja i za ljude. Ovo su ozbiljne razlike u rezultatima koje onemogućavaju pravilan pristup iskorenjivanju salmoneloze kod životinja i ljudi. Nesporno je da pravi podaci o rasprostranjenosti i učestalosti različitih serovarijeteta *Salmonella* u Republici Crnoj Gori, nedostaju. Regionalne mikrobiološke laboratorije u humanoj, a posebno u veterinarskoj medicini, nemaju na raspolaganju sve serume neophodne za identifikaciju velikog broja potencijalno prisutnih serovarijeteta salmonela. Osnovni problem i uzrok ovakvog stanja stvari je činjenica da jedini proizvođač specifičnih seruma za aglutinaciju *Salmonella* u regionu, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, na listi svojih proizvoda uopšte i nema serume za sve serovarijetete, već samo za neke. Serumi stranih proizvođača su, kako je već rečeno, veoma skupi i kao takvi nepristupačni su za većinu laboratorija.

U Crnoj Gori nema jedinstvenog nacionalnog monitoringa ni preciznog uvida u epidemiološko/epizootiološku situaciju salmoneloze. Iz tog razloga je primena molekularnih metoda i genotipska tipizacija autohtonih izolata salmonela izolovanih na području Crne Gore, što je predmet ove doktorske disertacije, bila od izuzetnog značaja. U ovoj disertaciji nađene su samo *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. Infantis*. U pregledu slučajeva salmoneloze kod živine u periodu od 2011-2015 godine u R. Crnoj Gori vidljiva je visoka zastupljenost serovarijeteta *S. Infantis* koji je u gotovo identičnom procentu zastupljen kao i serovarijetet *S. Enteritidis*.

Ovi rezultati su gotovo potpuno identični odnosno, uklapaju se u epizootiološku sliku salmoneloze kod živine u državama EU gde je, kako je već rečeno *Salmonella Infantis* zastupljena više nego *S. Enteritidis*, a to je najvidljivije u Mađarskoj. Sa druge strane, rezultati multipleks PCR reakcije u ovoj disertaciji su pokazali da je među uzorcima ispitivanih *Salmonella* bio prisutan i serovarijetet *S. Gallinarum* i to dva soja. Jedan soj je pripadao serovarijetetu *S. Gallinarum*, biotip *Pullorum* a drugi soj je pripadao serovarijetetu *S. Gallinarum*, biotip

Gallinarum. Serološkom tipizacijom izolovanih salmonella, ovi su sojevi bili identifikovani kao S.Enteritidis što ukazuje na relativno visoku nespecificnost brze aglutinacije na pločici u identifikaciji salmonella. Drugačije rečeno, ovakve se greške u epizootiološkim istraživanjima ne bi smele događati, s obzirom na to da serovarijeteti S.Enteritidis i S.Gallinarum imaju potpuno različit značaj kod ljudi i životinja.

7. Zaključci

Na osnovu sprovedenih istraživanja i dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Na svim ispitivanim farmama živine u Republici Crnoj Gori ustanovljeno je prisustvo samo 4 serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* subspecies *enterica* i to: Enteritidis, Infantis, Typhimurium i Gallinarum.
2. Od dva detektovana soja *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovarijetet Gallinarum, jedan je pripadao biotipu Gallinarum, a drugi biotipu Pullorum.
3. Sojevi *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovarijetet Gallinarum, biotip Gallinarum i biotip Pullorum nisu bili detektovani primenom serološke reakcije aglutinacije na pločici, već samo primenom metode multiplex PCR.
4. Kod soja *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovarijetet Gallinarum biotip Gallinarum nađena su tri amplifikovana genska fragmenta od kojih jedan od 993bp odgovara genu *bcfC*, drugi od 636bp odgovara genu *steB* i treći od 402 bp odgovara genu *rhs*.
5. Kod soja *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovarijetet Gallinarum biotip Pullorum nađena su dva amplifikovana genska fragmenta od kojih jedan od 993bp odgovara genu *bcfC*, a drugi od 402 bp odgovara genu *rhs*.
6. Kod svih sojeva *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovarijetet Enteritidis metodom multipleks PCR nađena su tri amplifikovana genska fragmenta od kojih jedan od 993bp odgovara genu *bcfC*, drugi od 636bp odgovara genu *steB* i treći od 293bp odgovara genu *sdf*.

7. Nakon digestije 50 izolata *Salmonella enterica* podvrste *enterica* odabranih prema lokalitetima i zastupljenosti pomoću *SpeI* restrikcionog enzima i njihovom analizom pomoću PFGE utvrđeno je 5 različitih *SpeI* pulsotipova.

8. Kod ispitivanih sojeva salmonela nije ustanovljeno prisustvo β laktamaza proširenog spektra delovanja (ESBL).

9. Kod 10% ispitivanih sojeva ustanovljena je rezistencija na tetraciklin i streptomycin.

10. Svi ispitivani serovarijeteti salmonela bili su osetljivi na amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, enrofloksacin, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim, cefuroksim, ceftriakson i norfloksacin.

8. SPISAK LITERATURE

1. Abd-Elghany SM, Sallam KI, Abd-Elkhalek A, Tamura T. 2015. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol. Infect.* 143(5):997-1003.
2. Adesiyun A, Webb L, Musai L, Louison B, Joseph G, Stewart-Johnson A, Samlal S, Rodrigo S. 2014. Resistance to antimicrobial agents among *Salmonella* isolates recovered from layer farms and eggs in the Caribbean region. *J Food Prot.* 77(12):2153-60.
3. Ahmed AM, Shimamoto T, Shimamoto T. 2014. Characterization of integrons and resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from meat and dairy products in Egypt. *Int J Food Microbiol.* 189:39-44.
4. Antunes P, Mourão J, Campos J, Peixe L. 2016. Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect.* 22(2):110-21.
5. Argüello H, Sørensen G, Carvajal A, Baggesen DL, Rubio P, Pedersen K. 2014. Characterization of the emerging *Salmonella* 4,[5],12:i:- in Danish animal production. *Foodborne Pathog Dis.* 11(5):366-72.
6. Ban B, Vodopija R, Petrović MZ, Matica B. 2011. Epidemiological characteristics of salmonellosis in New Zagreb during the 1990-2009 period. *Acta Med Croatica.* 65(1):41-7.
7. Barco L, Ramon E, Cortini E, Longo A, Dalla Pozza MC, Lettini AA, Dionisi AM, Olsen JE, Ricci A. 2014. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- DT193 ASSuT strains from two outbreaks in Italy. *Foodborne Pathog Dis.* 11(2):138-4

8. Barua H, Biswas PK, Olsen KE, Shil SK, Christensen JP. 2013. Molecular characterization of motile serovars of *Salmonella enterica* from breeder and commercial broiler poultryfarms in Bangladesh. *PLoS One*. 8(3):e57811.

9. Betancor L, Yim L, Martínez A, Fookes M, Sasias S, Schelotto F, Thomson N, Maskell D, Chabalgoity JA. 2012. Genomic Comparison of the Closely Related *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Dublin. *Open Microbiol J*. 6:5-13.

10. Biljana Miljković-Selimović, Tatjana Babić i Predrag Stojanović. 2010. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Enteritidis – aktuelnosti i značaj, *Acta Medica Medianae* Vol.49(3),71-75

11. Boris Habrun, Borka Šimpraga, Gordan Kompes, Fani Krstulović. 2012. Antimicrobial resistance and serotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from poultry in Croatia *VETERINARSKI ARHIV* 82 (4), 371-381

12. Bugarel M, Granier SA, Weill FX, Fach P, Brisabois A. 2011. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *BMC Microbiol*. 27;11:151

13. Busani L, Graziani C, Battisti A, Franco A, Ricci A, Vio D, Digiannatale Paterlini F, D'Incau M, Owczarek S, Caprioli A, Luzzi I. 2004. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from humans infections, foodstuffs and farm animals in Italy. *Epidemiol. Infect.* 132 (2): 245-51

14. Camarda A, Pugliese N, Pupillo A, Oliva M, Circella E, Dionisi AM, Ricci A, Legretto M, Caroli A, Pazzani C. 2013. Resistance genes, phage types and pulsed field gel electrophoresis pulsotypes *Salmonella enterica* strains from laying hen farms in southern Italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Aug 6;10(8):3347-62.

15. Cardinale E, Perrier Gros-Claude JD, Rivoal K, Rose V, Tall F, Mead GC, Salvat G. 2005. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *J Appl Microbiol.* 99(4):968-77.
16. Chaisatit C, Tribuddharat C, Pulsrikarn C, Dejsirilert S. 2012. Molecular characterization of antibiotic-resistant bacteria in contaminated chicken meat sold at supermarkets in Bangkok, Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 65(6):527-34.
17. Chen J, Tang J, Liu J, Cai Z, Bai X. 2012. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *J Appl Microbiol.* 112(4):823-30.
18. Chotinun S, Rojanasthien S, Unger F, Tadee P, Patchanee P. 2014. Prevalence and antimicrobial resistance of salmonella isolated from carcasses, processing facilities and environment surrounding small scale poultry slaughterhouses in Thailand Southeast Asian *J Trop Med Public Health.* 45(6):1392-400.
19. Cortez AL, Carvalho AC, Ikuno AA, Bürger KP, Vidal-Martins AM. 2006. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Res Vet Sci.* 81(3):340-4.
20. Costa RG, Festivo ML, Araujo MS, Reis EM, Lázaro NS, Rodrigues DP. 2013. Antimicrobial susceptibility and serovars of salmonella circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. *J Food Prot.* 76(12):2011-7.
21. Dahshan H, Abd-Elall AM, Megahed AM, Abd-El-Kader MA, Nabawy EE. 2015. Veterinary antibiotic resistance, residues, and ecological risks in environmental samples obtained from poultry farms, Egypt. *Environ Monit Assess.* 187(2):2.

22. Danièle Meunier, David Boyd, Michael R. Mulvey, Sylvie Baucheron, Caterina Mammina, Antonino Nastasi, Elisabeth Chaslus-Dancla, Axel Cloeckaert. 2002. Salmonella enterica Serotype Typhimurium DT 104 Antibiotic Resistance Genomic Island I in Serotype Paratyphi B Emerging Infectious Diseases Vol. 8, No. 4
23. de Freitas CG, Santana AP, da Silva PH, Gonçalves VS, Barros Mde A, Torres FA, Murata LS, Perecmanis S. 2010. PCR multiplex for detection of Salmonella Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. Int J Food Microbiol.139(1-2):15-22.
24. DE Knecht LV, Pires SM, Hald T.2015. Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. Epidemiol Infect. 2015 Apr;143(6):1175-86.
25. Diarra MS, Delaquis P, Rempel H, Bach S, Harlton C, Aslam M, Pritchard J, Topp E.2014. Antibiotic resistance and diversity of Salmonella enterica serovars associated with broiler chickens. J Food Prot. 77(1):40-9
26. Dione MM, Geerts S, Antonio M. 2012. Characterisation of novel strains of multiply antibiotic-resistant Salmonella recovered from poultry in Southern Senegal. J Infect Dev Ctries. 6(5):436-42.
27. Dolapçı I, Tekeli A, Şahin F, Erdem B. 2015. Molecular characterization of Salmonella enterica serovar Typhimurium strains isolated from humans in Turkey. Mikrobiyol. Bul. 49(4):502-12.
28. Donado-Godoy P, Byrne BA, León M, Castellanos R, Vanegas C, Coral A, Arevalo A, Clavijo V, Vargas M, Romero Zuñiga JJ, Tafur M, Pérez-Gutierrez E, Smith WA.2015 Prevalence, resistance patterns, and risk factors for antimicrobial resistance in bacteria from retail chicken meat in Colombia. J Food Prot. 78(4):751-9

29. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012, European Food Safety Authority, EFSA Journal 2014;12(2):3547 [312 pp.].
30. Fakhr MK, Sherwood JS, Thorsness J, Logue CM. 2006. Molecular characterization and resistance profiling of *Salmonella* isolated from retail Turkey meat products. *Foodborne Pathog Dis.*3(4):366-74
31. Filipović Irina, Mišić Dušan, Ašanin Ružica. 2007. Investigation of the presence of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in multiresistant strains of *E. coli* and *Salmonella* species originated from domestic animals. *Acta Veterinaria (Beograd)*, Vol. 57, No. 4, 369-379
32. Firoozeh F, Zahraei-Salehi T, Shahcheraghi F. 2014. Molecular clonality and detection of class 1 integron in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from animal and human in Iran. *Microb Drug Resist.* 20(6):517-24.
33. Fitch FM, Carmo-Rodrigues MS, Oliveira VG, Gaspari MV, Dos Santos A, de Freitas JB, Pignatari AC. 2016. β -Lactam Resistance Genes: Characterization, Epidemiology, and First Detection of blaCTX-M-1 and blaCTX-M-14 in *Salmonella* spp. Isolated from Poultry in Brazil-Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. *Microb Drug Resist.* 22(2):164-71
34. Gharieb RM, Tartor YH, Khedr MH. 2015. Non-Typhoidal *Salmonella* in poultry meat and diarrhoeic patients : prevalence, antibiogram, virulotyping, molecular detection and sequencing of class I integrons in multidrug resistant strains. *Gut Pathog.* 23;7:34.

35. Ghazaey S, Mirmomeni MH. 2012. Microbial resistant *Salmonella* enteritidis isolated from poultry samples . Rep Biochem. Mol Biol. 1(1):9-13.
36. Gong J, Wang C, Shi S, Bao H, Zhu C, Kelly P, Zhuang L, Lu G, Dou X, Wang R, Xu B, Zou J. 2016. Highly Drug-Resistant *Salmonella* enterica Serovar Indiana Clinical Isolates Recovered from Broilers and Poultry Workers with Diarrhea in China. Antimicrob Agents Chemother. 60(3):1943-7
37. Gosling RJ, Davies RH. 2015. Investigation of laboratory testing issues in the context of the *Salmonella* National Control Programme in Great Britain. Br Poult Sci. 56(3):315-9
38. Min Yue, Shelley C. Rankin, Ryan T. Blanchet, James D. Nulton Robert A. Edwards, Dieter M. Schifferli Diversification of the *Salmonella* Fimbriae: A Model of Macro- and Microevolution, 2012, PLoS ONE 7(6): e38596. doi:10.1371/journal.pone.0038596
39. Haim Levy, Souleymane Diallo, Sharon M. Tennant, Sofie Livio, Samba O. Sow, Milagritos Tapia, Patricia I. Fields, Matthew Mikoleit, Boubou Tamboura, Karen L. Kotloff, Rosanna Lagos, James P. Nataro, James E. Galen, and Myron M. Levine: PCR Method To Identify *Salmonella enterica* Serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* Isolates from the Blood of Patients with Clinical Enteric Fever , J Clin Microbiol. 2008 May; 46(5): 1861–1866.
40. Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, Berghaus R, Maurer J. 2009. A rapid screen of broth enrichments for *Salmonella enterica* serovars enteritidis, Hadar, Heidelberg, and Typhimurium by Using an allelotyping multiplex PCR that targets O- and H-antigen alleles. J Food Prot. 72(10):2198-201.

41. Hopwood, D.A., Bib, J.M., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, J.D., Smith, C.P., Ward, J.M., Schempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. Norwich, UK, The John Innes Foundation.
42. Hu Y, He Y, Wang Y, Cui S, Chen Q, Liu G, Chen Q, Zhou G, Yang B, Huang J, Yu H, Li F. 2015. Epidemic condition and molecular subtyping of ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *Salmonella* Indiana isolated from retail chicken carcasses in six provinces, China. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 49(8):716-21.
43. Hur J, Kim JH, Park JH, Lee YJ, Lee JH. 2011. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. *Vet J*. 189(3):306-11.
44. Hyeon JY, Chon JW, Hwang IG, Kwak HS, Kim MS, Kim SK, Choi IS, Song CS, Park C, Seo KH. 2011. Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Salmonella* serovars in retail meat products. *J Food Prot*. 74(1):161-6.
45. Im MC, Jeong SJ, Kwon YK, Jeong OM, Kang MS, Lee YJ. 2015. Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp. isolated from commercial layer farms in Korea. *Poult Sci* 94(7):1691-8
46. Ivic Kolevska S, Kocic B. Food contamination with salmonella species in the Republic of Macedonia. *Foodborne Pathog Dis*. 2009 Jun;6(5):627-30
47. Karabasil Neđeljko , Nataša Galić, Jelena Petković, Jelena Krasić , Jelena Petrović, Mirjana Dimitrijević , Nataša Kilibarda .2014. *Salmonella* Infantis u lancu proizvodnje mesa živine, Simpozijum – Bezbednost i kvalitet namirnica animalnog porekla str.4-5.
48. Karami A, Ahmadi Z, Safiri Z, Pourali F. 2011. Detection of *Salmonella* strain by rapid-cycle multiplex PCR. *Jundishapur J Microbiol*. 2011; 4(2):91-8

49. Katie L. Hopkins, Davies HR, Threlfall JE. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25 (5):358-373.
50. Katoh R, Matsushita S, Shimojima Y, Ishitsuka R, Sadamasu K, Kai A. 2015. [Serovars and Drug-Resistance of *Salmonella* Strains Isolated from Domestic Chicken Meat in Tokyo (1992-2012)] *Kansenshogaku Zasshi*. 89(1):46-52.
51. Kottwitz LB, Scheffer MC, Dalla-Costa LM, Farah SM, Moscalewski WS, Magnani M, de Oliveira TC. 2011. Molecular characterization and resistance profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 strains isolated in Brazil. *J Med Microbiol*. 60(Pt 7):1026-31
52. Kozoderović G, Velhner M, Jelesić Z, Stojanov I, Petrović T, Stojanović D, Golić N. 2010. Molecular typing and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry, food, and humans in Serbia. *Folia Microbiologica* 2011, Volume 56, Issue 1, pp 66-71
53. Krawiec M, Kuczkowski M, Kruszewicz AG, Wieliczko A. 2015. Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. *BMC Vet Res*. 31;11:15.
54. Kristinsson KG, Georgsson F. 2015. Infection risks associated with importation of fresh food in Iceland]. *Laeknabladid*. 101(6):313-9.
55. Kuang X, Hao H, Dai M, Wang Y, Ahmad I, Liu Z, Zonghui Y. 2015. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from farm animals in China. *Front Microbio* 22;6:602

56. Lee SK, Chon JW, Song KY, Hyeon JY, Moon JS, Seo KH. 2013. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Gallinarum isolated from eggs produced in conventional or organic farms in South Korea. *Poult Sci.* 92(10):2789-97
57. Li Q, Hu Y, Wu Y, Wang X, Xie X, Tao M, Yin J, Lin Z, Jiao Y, Xu L, Jiao X. 2015. Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Pullorum Multidrug Resistance Strain S06004 from China. *J Microbiol Biotechnol.* 25(5):606-11.
58. Löfström C, Hintzmann AS, Sørensen G, Baggesen DL. 2015. Outbreak of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT41 in Danish poultry production. *Vet Microbiol.* 178(1-2):167-72
59. Lu Y, Zhao H, Sun J, Liu Y, Zhou X, Beier RC, Wu G, Hou X. 2014. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovars Indiana and Enteritidis from chickens in Eastern China. *PLoS One.* 2;9(5):e96050
60. Maja Milanović, Boban Mugoša, Goran Nikolić, Agima Ljaljević. 2014. Epidemiološke karakteristike salmoneloza u Crnoj Gori od 2001. do kraja 2011. *Medical Journal Of Montenegro* DOI: 10.5937/cma2-5967
61. Mahon J, Murphy CK, Jones PW, Barrow PA. 1994. Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin. *Lett Appl Microbiol.* 1994 Sep;19(3):169-72.

62. Malkawi HI, Gharaibeh R. 2003. Multiplex PCR for the direct detection of *Salmonella enterica* from chicken, lamb and beef food products. *J Basic Microbiol.* 43(4):328-36.
63. Mandilara G, Lambiri M, Polemis M, Passiotou M, Vatopoulos A. 2013. Phenotypic and molecular characterisation of multiresistant monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) in Greece, 2006 to 2011. *Euro Surveill.* 18(22). pii: 20496.
64. Maslić-Strižak Danka, Spalević Ljiljana, Rašeta Mladen, Branković Lazić Ivana 2012. Uzgoj brojlerskih pilića u industrijskom živinarstvu Tehnologija mesa 53 (2012) 1 ,1-7, Beograd, UDK: 636.52/.58.08 ID: 190840588
65. Matthews TD, Schmieder R, Silva GG, Busch J, Cassman N, Dutilh BE, Green D, Matlock B, Heffernan B, Olsen GJ, Farris Hanna L, Schifferli DM, Maloy S, Dinsdale EA, Edwards RA. 2015. Genomic Comparison of the Closely-Related *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis, Dublin and Gallinarum. *PLoS One.* 2015, 3;10(6):e0126883
66. Mattiello SP, Drescher G, Barth VC Jr, Ferreira CA, Oliveira SD. 2015 Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* strains isolated from Brazilian poultry production. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 108 (5):1227-38
67. McCarthy N, Reen FJ, Buckley JF, Frye JG, Boyd EF, Gilroy D. 2009. Sensitive and rapid molecular detection assays for *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Heidelberg. *J Food Prot.* 72(11):2350-7.
68. Mercado E, Guglilemone F, Hecsel W. 1984. Sensitivity to 11 antimicrobials in strains of *Salmonella* isolated from products of animal origin. *Rev Argent Microbiol.* 16 (2): 101-5

69. Meunier D, Boyd D, Mulvey MR, Baucheron S, Mammina C, Nastasi A, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. 2002. *Salmonella enterica enterica* serotype Typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island I in serotype paratyphi. *Emerg Infect Dis.* 8(4):430-3.
70. Mezal EH, Sabol A, Khan MA, Ali N, Stefanova R, Khan AA. 2014. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. *Food Microbiol.* 38:67-74
71. Min Yue, Shelley C. Rankin, Ryan T. Blanchet, James D. Nulton, Robert A. Edwards, Dieter M. Schifferli, 2012, Diversification of the *Salmonella* Fimbriae: A Model of Macro- and Microevolution PLoS ONE www.plosone.org. Vol.,7 , Issue 6, e38596
72. Mohamed T, Zhao S, White DG, Parveen S. 2014. Molecular characterization of antibiotic resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky isolated from pre-and post-chill whole broilers carcasses. *Food Microbiol.* 38:6-15.
73. Mølbak K, Simonsen J, Jørgensen CS, Krogh KA, Falkenhorst G, Ethelberg S, Takkinen J, Emborg HD. 2014. Seroincidence of human infections with nontyphoid *Salmonella* compared with data from public health surveillance and food animals in 13 European countries. *Clin Infect Dis.* 59(11):1599-606
74. Naik VK, Shakya S, Patyal A, Gade NE, Bhoomika. 2015. Isolation and molecular characterization of *Salmonella* spp. from chevon and chicken meat collected from different districts of Chhattisgarh, India. *Vet World.* 8(6):702-706.
75. Nielsen BB, Clausen B, Elvestad K. Nord. 1981. The incidence of *Salmonella* bacteria in wild-living animals from Denmark and in imported animals. *Vet Med.* 33(9-11):427-33.

76. O'Regan E, McCabe E, Burgess C, McGuinness S, Barry T, Duffy G, Whyte P, Fanning S. 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple Salmonella serotypes in chicken samples. *BMC Microbiol* 21;. 8:156.
77. Paião FG, Arisitides LG, Murate LS, Vilas-Bôas GT, Vilas-Boas LA, Shimokomaki M. 2013. Detection of Salmonella spp, Salmonella Enteritidis and Typhimurium in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. *Braz J Microbiol.* 19;44(1):37-41
78. Pande VV, Gole VC, McWhorter AR, Abraham S, Chousalkar KK. 2015. Antimicrobial resistance of non-typhoidal Salmonella isolates from egg layer flocks and egg shells. *Int J Food Microbiol.* 203:23-6.
79. Park HJ, Chon JW, Lim JS, Seo KH, Kim YJ, Heo EJ, Wee SH, Sung K, Moon JS. 2015, Prevalence Analysis and Molecular Characterization of Salmonella at Different Processing Steps in Broiler Slaughter Plants in South Korea. *J Food Sci* 80(12):M2822-6.
80. Parry CM. 2003. Antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica. *Curr Opin Infect Dis.* 16 (5): 467-22
81. Papadopoulos T, Petridou E, Zdragas A, Mandilara G, Nair S, Peters T, Chattaway M, de Pinna E, Passiotou M, Vatopoulos A. 2016. Comparative study of all Salmonella enterica serovar Enteritidis strains isolated from food and food animals in Greece from 2008 to 2010 with clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 35(5):741-6.
82. Parvej MS, Nazir KH, Rahman MB, Jahan M, Khan MF, Rahman M. 2016. Prevalence and characterization of multi-drug resistant Salmonella Enterica serovar Gallinarum biovar Pullorum and Gallinarum from chicken. *Vet World.* 9(1):65-70.

83. Pavlović N, Maris S, Zlatar B, Purtić-Kljajić D 2014 Hrana izvor zaražavanja u epidemijama salmoneloza-istraživanje jačine dokaza; Simpozijum – Bezbednost i kvalitet namirnica animalnog porekla str.6-18
84. Pope C, Martin LC, Gyles CL, Reid-Smith R, Boerlin P, McEwen SA, Prescott JF, Forward KR. 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 71 (3):1184-92.
85. Pulido-Landinez M, Washington P, Thornton JK, Zhang Y, Sanchez-Inzunza R, Banda A, Guard J, Nascimento VP, Magee DL, Mauel MJ.2014. Serotype and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolates from commercial birds and poultry environment in Mississippi.*Avian Dis.*58(1):64-70.
86. Radojičić Sonja, Valčić M., Đuričić Bosiljka, 2011. Infektivne bolesti životinja - specijalni deo, Naučna KMD, Beograd.
87. Ribeiro SA, de Paiva JB, Zotesso F, Lemos MV, Berchieri Júnior A. 2009. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum.*Braz J microbiol.*40(1):184-8
88. Rodriguez R, Fandiño C, donado P, Guzman L, Verjan N. 2015. Characterization of *Salmonella* from Commercial Egg-Laying Hen Farms in a Central Region of Colombia *Avian dis.*59(1):57-63.
89. Rowlands RE, Ristori CA, Ikuno AA, Barbosa ML, Jakabi M, Franco BD.2014. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 56(6):461-7.
90. Sajid SU, Sajid M, Hashmi RI.2015. Isolation studies on the prevalence of *Salmonellae* in chicken organs, eggs and feed components. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 27(3):530-3.

91. San Martin B, Lapierre L, Toro C, Bravo V, Cornejo J, Hormazabal JC, Borie C. 2005. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. From poultry farms. *Veterinary Microbiology* 110 (3-4): 239-244.
92. Sanad YM, Johnson K, Park SH, Han J, Deck J, Foley SL, Kenney B, Ricke S, Nayak R. 2016. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serovars Isolated from a Turkey Production Facility in the Absence of Selective Antimicrobial Pressure. *Foodborne Pathog Dis.* 13(2):80-7.
93. Sapkota AR, Kinney EL, George A, Hulet RM, Cruz-Cano R, Schwab KJ, Zhang G, Joseph SW. 2014. Lower prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella* on large-scale U.S. conventional poultry farms that transitioned to organic practices. *Sci Total Environ.* 476-477:387-92
94. Schwarz S i Chaslus-Dancla E 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* 32 (3-4).
95. Secundo de Souza AI, Freitas Neto OC, Batista DF, Estupinan AL, Almeida AM, Barrow PA, Berchieri A Junior. 2015 ERIC-PCR genotyping of field isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum* *Avian Pathol.* 44(6):475-9.
96. Shanen N, Fatima N, Sajid SU, Gandapur AS. 2004. *J Ayub Med Coll Abbottbad.* 16 (4):55-9.
97. Singh P, Mustapha A. 2013. Multiplex TaqMan® detection of pathogenic and multi-drug resistant *Salmonella*. *Int J food Microbiol.* 166(2):213-8.
98. Singer JT, Opitz HM, Gershman M, Hall MM, Muniz IG, Rao SV. 1992. Molecular characterization of *Salmonella enteritidis* isolates from Maine poultry and poultry farm environments. *Avian dis.* 36(2):324-33.

99. Siriken B, Türk H, Yildirim T, Durupinar B, Erol I..2015.Prevalence and characterization of Salmonella isolated from chicken meat in Turkey.J food Sci.80(5):M1044-50
100. Singh P, Mustapha A.2013.Multiplex TaqMan® detection of pathogenic and multi-drug resistant Salmonella. Int J food Microbiol.166(2):213-8.
101. Singer JT, Opitz HM, Gershman M, Hall MM, Muniz IG, Rao SV. 1992. Molecular characterization of Salmonella enteritidis isolates from Maine poultry and poultry farm environments. Avian dis. 36(2):324-33.
102. Siriken B, Türk H, Yildirim T, Durupinar B, Erol I..2015.Prevalence and characterization of Salmonella isolated from chicken meat in Turkey.J food Sci.80(5):M1044-50
103. Singh P, Mustapha A.2013.Multiplex TaqMan® detection of pathogenic and multi-drug resistant Salmonella. Int J food Microbiol.166(2):213-8.
104. Singer JT, Opitz HM, Gershman M, Hall MM, Muniz IG, Rao SV. 1992. Molecular characterization of Salmonella enteritidis isolates from Maine poultry and poultry farm environments. Avian dis. 36(2):324-33.
105. Siriken B, Türk H, Yildirim T, Durupinar B, Erol I..2015.Prevalence and characterization of Salmonella isolated from chicken meat in Turkey.J food Sci.80(5):M1044-50
106. Steven L. Foley,Rajesh Nayak,Irebe B. Hanning, Timothy J Johnson,Jing Han and Steven C .Ricke. 2011. Population Dynamics of Salmonella enterica Serotypes in Commercial Egg and Poultry Production .Applied and Environ.Microbiol.,Vol 77, 13, p.4273/4279.
107. STOJANOV I, MILOŠ KAPETANOV, ALEKSANDAR MAŠIĆ. 2005. Osetljivost na antibiotike *Salmonella* enterica izolovanih iz živinskih materijala savremena poljoprivreda" VOL. 55, 3-4 (2006) STR. 152-156. NOVI SAD.

108. Tao ZY, Zhu CH, Shi ZH, Song C, Xu WJ, Song WT, Zou JM, Qin AJ..2015.Molecular characterization, expression, and functional analysis of NOD1 in Qingyuan partridge chicken. Genet mol Res.14(1):2691-701.

109. Thai TH, Yamaguchi R.2012. Molecular characterization of antibiotic-resistant Salmonella isolates from retail meat from markets in Northern Vietnam. J Food Prot.Vol.75(9): p1709.

110. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. This scientific output published on 10 March 2016, replaces the earlier versions published on 28 January 2014 and 13 October 2015 (see page 2 for details).

111.Țiriziu E, Lazăr R, Sala C, Nichita I, Morar A, Seres M, Imre K.2015. Salmonella in raw chicken meat from the Romanian seaside: frequency of isolation and antibiotic resistance. J Food Prot.78(5):1003-6.

112. TODOROVIĆ D, VELHNER M, MILANOV D, VIDANOVIĆ D, SUVAJDŽIĆ Lj, STOJANOV I, KRNJAIĆ D. 2015. Characterization of tetracycline resistance of *Salmonella* enterica subspecies enterica serovar Infantis isolated from poultry in the Northern part of Serbia, Acta Veterinaria, Beograd, 2015, 65 (4), 548-556.

113. Tu LT, hoang NV, Coung NV, Campbell J, Bryant JE, Hoa NT, Kiet BT, Thompson C, Duy DT, Phat VV, hien VB, Thwaites G, Baker S, Carrique-mas JJ., 2015. High levels of contamination and antimicrobial-resistant non-typhoidal Salmonella serovars on pig and poultryfarms in the Mekong Delta of Vietnam. Epidemiol Infect.143(14):3074-86.

114. Turki Y, Mehr I, Ouzari H, Khessairi A, Hassen A., 2014. Molecular typing, antibiotic resistance, virulence gene and biofilm formation of different Salmonella enterica serotypes. J Gen Appl Microbiol.60(4):123-30.

115. Ungemach RF, Muller-Bahrtdt D, Abraham G. 2006. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology* doi:10.1186/1746-6148-2-7.
116. Velebit B, M. Mirilović, Snežana Saičić. 2007. Primenljivost metode multipleks lančane reakcije polimeraze u otkrivanju i identifikaciji vrsta salmonela, *Tehnologija mesa*, Beograd, 49, 3-4, 174-182.
117. VELHNER M, KOZODEROVIĆ G, JELESIĆ Z. 2007. Molekularna karakterizacija *Salmonella enterica* serotip enteritidis: priznate metode i njihova primena u određivanju klonalnog diverziteta ;„Savremena Poljoprivreda" Vol.. 56, 1 Str. 112-121, Novi Sad.
118. Velhner M, Kozoderović G, Grego E, Galić N, Stojanov I, Jelesić Z, Kehrenberg C. 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.
119. Wang Y, Yang B, Wu Y, Zhang Z, Meng X, Xi M, Wang X, Xia X, Shi X, Wang D, Meng J..2015. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on retail raw poultry in six provinces and two National cities in China. *Food Microbiol* 46:74-80.
120. Wedel SD, Bender JB, Leano FT, Boxrud DJ, Hedberg C, Smith KE. 2005. Antimicrobial-drug susceptability of human and animal *Salmonella* Typhimurium, Minesota, 1997-2005. *Emerg Infect Dis.* 11 (12): 1899-906
121. Wierup M.2000.The control of microbial diseases in animals: alternatives to the use of antibiotics.*International Journal of Antimicrobial Agents* 14 (4): 315-319

122. Yang B, Wang Q, Cui S, Wang Y, Shi C, Xia X, Xi M, Wang X, Shi X, Wang D, Zhang Z, Meng J.2014. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Salmonella* strains isolated from retail foods in Shaanxi and Henan Province, China. *Food Microbiol.*42:14-8.

123. Yasser M. Sanad, Kelly Johnson, Si Hong Park, Jing Han, Joanna Deck, Steven L. Foley, Brett Kenney, Steven Ricke, and Rajesh Nayak.2016. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serovars Isolated from a Turkey Production Facility in the Absence of Selective Antimicrobial Pressure, *Foodborne Pathog Dis.*, 2016;13(2):80-7.

124. .Yoon RH, Cha SY, Wei B, Roh JH, Seo HS, Oh JY, Jang HK. 2014. Prevalence of *Salmonella* isolates and antimicrobial resistance in poultry meat from South Korea. *J Food Prot.*77(9):1579-82.

125. Yu CY, Chou SJ, Yeh CM, Chao MR, Huang KC, Chang YF, Chiou CS, Weill FX, Chiu CH, Chu CH, Chu C.2008. Prevalence and characterization of multidrug-resistant (type ACSSuT) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains in isolates from four gosling farms and a hatchery farm.*J Clin Microbiol.* 46(2):522-6.

126. Zahraei T Salehi, Mahzounieh M, Saeedzadeh A. 2005. Detection of *InvA* Gene in Isolated *Salmonella* from Broilers by PCR Method *International Journal of Poultry Science* 4 (8): 557-559.

127. Zhu C, Yue M, Rankin S, Weill FX, Frey J, Schifferli DM. 2015 One-Step Identification of Five Prominent Chicken *Salmonella* Serovars and Biotypes. *J Clin Microbiol.* 53(12):3881-3.

Rođena je 16.11.1969.godine u Podgorici. Srednju školu završila u Podgorici 1988. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala 1988. godine i na istom diplomirala 1997. godine sa prosječnom ocjenom 8,00. Po završenom fakultetu zaposlila se u veterinarskoj stanici u Pljevljima kao terenski veterinar. Posle godinu dana, odnosno od 1998. do 2001.godine radila je u veterinarskoj ambulanti u Tuzima, takođe kao terenski veterinar.

Od 2001. godine prelazi u Biotehnički Institut kao istraživač saradnik. Od 2004. godine radi u Specijalističkoj Veterinarskoj Laboratoriji u Podgorici u kojoj se nalazi na funkciji načelnika Opšte mikrobiologije i parazitologije.

Postdiplomske magistarske studije upisala je školske 1998/99.godine na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Nskon odslušana četiri semestra sve ispite predviđene planom i programom položila je sa prosječnom ocjenom 8,6. Magistarske studije završila je odbranom magistarske teze pod naslovom:„ Ispitivanje rezistencije nekih patogenih bakterija izolovanih od domaćih životinja na području Crne Gore“ 20. 10.2006 godine. Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavila devet naučno-stručnih publikacija. Služi se ruskim i engleskim jezikom.

Mr Irina Mijatović

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани/а мр Ирина Мијатовић

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Молекуларна карактеризација и антимикуробна осетљивост сероваријетета *Salmonella enterica* подврста *enterica* изолованих од живине са подручја Црне Горе“

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

У Новом Саду, 12.07.2016.г.

Потпис

мр Ирина Г. Мијатовић

Ирина Мијатовић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора мр Ирина Г. Мијатовић

Наслов рада „Молекуларна карактеризација и антимикуробна осетљивост сероваријетета *Salmonella enterica* подврста *enterica* изолованих од живине са подручја Црне Горе“

Ментор др Александар Поткоњак, доцент

Потписани/а

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигитална библиотека дисертација Универзитета у Новом Саду.

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

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама Дигиталне библиотеке дисертација, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Новом Саду.

У Новом Саду, 12.07.2016. г.

Потпис

мр Ирина Г. Мијатовић



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Централну библиотеку Универзитета у Новом Саду да у Дигиталну библиотеку дисертација Универзитета у Новом Саду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Молекуларна карактеризација и антимиљробна осетљивост сероваријетета *Salmonella enterica* подврста *enterica* изолованих од живине са подручја Црне Горе“

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталну библиотеку дисертација Универзитета у Новом Саду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

У Новом Саду, 12.07.2016.

Потпис

мр Ирина Г. Мијатовић

1. **Ауторство** – Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.