

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**Fakultet veterinarske medicine**  
**Katedra za mikrobiologiju**

**Mr Ivan Bošnjak, dr vet.med.**

**Ispitivanje prisustva, serotipske pripadnosti i  
rezistencije prema antimikrobnim sredstvima  
*Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2016**

## **Komisija za odbranu Doktorske disertacije**

Mentor : **Dr Dejan Krnjić**, vanredni profesor  
Fakultet Veterinarske medicine, Beograd

Članovi:

**dr Nikola Popović**, redovni profesor  
Fakultet veterinarske medicine

**dr Zoran Stanimirović**, redovni profesor  
Fakultet veterinarske medicine

**dr Milanko Šekler**, viši naučni saradnik VSI Kraljevo

**dr Kazimir Matović**, naučni saradnik VSI Kraljevo

## Ispitivanje prisustva, serotipske pripadnosti i rezistencije prema antimikrobnim sredstvima *Salmonella spp.* kod gmizavaca i vodozemaca

### Kratak sadržaj

Salmonele predstavljaju veoma važne patogene mikroorganizme ljudi i životinja koji su odgovorni za 93,8 miliona infekcija i 155.000 smrtnih slučajeva ljudi godišnje u svetu. Uzročnik većine slučajeva salmoneloze ljudi je hrana, ali su i brojne infekcije posledica direktnog ili indirektnog kontakta sa životinjama. Gmizavci predstavljaju značajni rezervoar velikog broja podvrsta i serovarijeteta *Salmonella spp.*, a brojni radovi potvrđuju mogućnost prenošenja ovih bakterija sa gmizavaca na ljude. Cilj ove disertacije je bio da se ustanovi prisustvo i raširenost serovarijeteta *Salmonella spp.* i njihove rezistencije prema antimikrobnim sredstvima. Od aprila 2012. do aprila 2016. godine bakteriološki su ispitivani brisevi i feces 317 gmizavaca i vodozemaca, slobodnih u prirodi, držanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci (152 kornjače, 76 guštera, 73 zmije i 16 žaba) poreklom od 42 različite vrste i izolovano je ukupno 57 sojeva *Salmonella enterica* (18,93%) od 301 gmizavca, za razliku od vodozemaca gde su svi uzorci bili negativni. *Salmonella enterica* je izolovana kod 24 kornjače (15,79%), 14 guštera (18,42%) i 19 zmija (26,03%), a nakon serotipizacije 41 soj je identifikovan kao *S. enterica* subsp. *enterica* (I) i 16 kao *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb). Ukupno je serotipizacijom utvrđeno prisustvo 24 različita serovarijeteta *Salmonella enterica*, od kojih po prvi put u Srbiji 10 serovarijeteta, a jedan determinisani serovarijetet se ne nalazi u White-Kauffmann-Le Minor tabeli. Kod sojeva *Salmonella* nije utvrđena rezistencija prema ispitivanim antimikrobnim sredstvima. *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Hadar i *Salmonella* Thompson koje su otkrivene kod gmizavaca spadaju u serovarijetete *Salmonella* koje dovode do infekcija ljudi. Dobijeni rezultati nedvosmisleno ukazuju da gmizavci, kako slobodni u prirodi tako i u zoološkom vrtu ili držani kao kućni ljubimci, mogu predstavljati rezervoar *Salmonella spp.*, što je od velikog epidemiološkog značaja usled zoonoznog potencijala uzročnika. Otkrivanje retkih i egzotičnih serovarijeteta *Salmonella spp.* ukazuje na neophodnost sprovođenja daljih sveobuhvatnih istraživanja i sistematskog pristupa u razjašnjenju uloge gmizavaca u epidemiologiji salmoneloze.

Ključne reči: gmizavci, prevalencija, rezistencija prema antimikrobnim sredstvima, *Salmonella*, serovarijeteti, vodozemci

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

UDK broj: 579.62:543.645.7:636.95/98

## **Investigation of the presence, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in reptiles and amphibians**

### Summary

*Salmonella* represents an important human and animal pathogen which causes 93.8 million human cases of gastroenteritis and 155,000 deaths annually worldwide. Most human salmonellosis cases are foodborne, but numerous infections are also caused by direct or indirect animal contact. Reptiles are considered as a reservoir of a wide variety of *Salmonella* subspecies and serovars, and there are reports on reptile associated *Salmonella* transmission to humans. This study aims at detecting and quantifying the presence of serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in reptiles and amphibians. From April 2012 to April 2016, the swabs and faeces from 317 wild and captive reptiles and amphibians (152 tortoises, 76 lizards, 73 snakes and 16 frogs) from 42 different species found in Serbia were bacteriologically examined, and *Salmonella* spp. were isolated from 57 (18,93%) of 301 reptiles, whereas all the examined amphibians were negative. These strains were isolated from 24 tortoises (15.79%), 14 lizards (18.42%) and 19 snakes (26.03%), and 41 were subtyped as *S. enterica* subsp. *enterica* (I) and 16 as *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb). 24 different serovars were identified including 10 new to Serbia and 1 serovar not listed in the White-Kauffmann-Le Minor scheme. No resistance to antimicrobials of very high human health importance was detected. *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Hadar and *Salmonella* Thompson isolated from reptiles belonged to serovars which are related to human cases of salmonellosis. The results indicate huge burden of *Salmonella* spp. carriage by wild and captive reptiles, and indicate possible zoonotic and epidemiological impact. Identification of rare and diverse *Salmonella* serovars proves a need for in-depth studies and systematic approach to reveal the role of reptiles in epidemiology of salmonellosis.

Key words: amphibians, antimicrobial resistance, reptiles, prevalence, *Salmonella*, serovars

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific discipline: Microbiology

UDC: 579.62:543.645.7:636.95/98

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b>	3
<b>3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA</b>	34
<b>4. MATERIJAL I METODE</b>	35
<b>5. REZULTATI</b>	40
<b>6. DISKUSIJA</b>	71
<b>7. ZAKLJUČCI</b>	85
<b>8. LITERATURA</b>	87

## 1. UVOD

Bakterije iz roda *Salmonella* predstavljaju veoma značajne uzročnike infekcija ljudi i životinja i spadaju u najznačajnije zoonoze u svetu. Infekcije protiču u različitim formama, od asimptomatske, gde dolazi samo do kolonizacije creva bez simptoma bolesti, preko gastroenteritisa, do generalizovanih ekstraintestinalnih infekcija praćenih tifusnom groznicom, septikemijom, osteomijelitisom i meningitisom.

Salmonele mogu kontaminirati tlo, pašnjake, vodu i generalno se nalaze u različitim prirodnim staništima. Životinje kao rezervoari i mogući vektori prenošenja salmonela predstavljaju potencijalni izvor zaraze, ne samo za jedinke svoje vrste, nego i za druge vrste životinja i ljude. U gastrointestinalnom traktu mnogih gmizavaca i vodozemaca nalaze se salmonele, koje se izlučuju u okolnu sredinu i posledično mogu izazvati salmonelozu ljudi i životinja.

Prema našim saznanjima, u Republici Srbiji do sada nije ispitivano prisustvo i raširenost vrsta, podvrsta i serovarijeteta *Salmonella* kod gmizavaca i vodozemaca, kako kod kornjača, zmija, guštera i žaba slobodnih u prirodi, tako i kod onih koji se drže u zoološkom vrtu ili se čuvaju kao kućni ljubimci. Dobijeni podaci ukazivali bi na prisustvo određenih serovarijeteta *Salmonella* spp. kod kornjača, zmija, guštera i žaba i omogućili procenu rizika po zdravlje ljudi i životinja.

Masovna, neracionalna i neadekvatna upotreba antimikrobnih sredstava u humanoj i veterinarskoj medicini doprinela je sve učestalijoj pojavi rezistencije bakterija na određene antibiotike. Prisustvo i širenje rezistentnih bakterija ili gena rezistencije je prisutno i na lokalnom i na globalnom nivou, čime doprinosi upotreba istih ili hemijski sličnih antimikrobnih sredstava kod ljudi, životinja i biljaka. Pojava rezistentnih i multirezistentnih sojeva *Salmonella* vrsta dovela je do izostanka očekivane efikasnosti primenjene antimikrobne terapije i posledično težeg lečenja i životne ugroženosti obolelih ljudi i životinja. Bakterije poreklom od životinja, pored infekcija ljudi koje mogu da izazovu u slučaju da su agensi zoonoznog potencijala, predstavljaju rizik po zdravlje ljudi usled mogućeg transfera gena rezistencije u patogene bakterije ljudi i povećanja prevalencije rezistencije praćene terapijskom neuspešnošću.

Pojava i raširenost rezistencije kod sojeva *Salmonella* izolovanih od gmizavaca i vodozemaca, na osnovu naših saznanja, nije do sada ispitivana u Republici Srbiji. Ispitivanjem osetljivosti izolata utvrdila bi se prevalencija rezistencije *Salmonella* kod kornjača, zmija, guštera i žaba, kao i prisustvo gena rezistencije prema određenim antibioticima i hemoterapeuticima, a na ovaj način da li ove vrste životinja predstavljaju rezervoar i potencijalni izvor za širenje rezistencije. Imajući u vidu širom sveta sve češću pojavu rezistentnih sojeva *Salmonella* prema hinolonima i fluorohinolonima posebna pažnja je usmerena prema ovim antimikrobnim sredstvima.



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Rod *Salmonella* najvažnije vrste i podvrste

Bakterije iz roda *Salmonella* se ubrajaju među najznačajnije patogene familije *Enterobacteriaceae*, a ime su dobile po američkom bakteriologu Daniel Elmer Salmon-u koji je zajedno sa Theobald Smith-om prvi izolovao i okarakterisao ovaj mikroorganizam 1884. godine. Prvobitno se smatralo da je u pitanju uzročnik svinjske kuge, tako da je ova novootkrivena bakterija dobila ime *Bacillus choleraesuis* koje je 1890. godine Lignieres promenio u *Salmonella choleraesuis*.

Od tada pa do današnjih dana, komplikovana filogenetska klasifikacija salmonela bila je predmet mnogih diskusija, a sve sa ciljem pronalaženja jedinstvene nomenklature koja bi na najbolji mogući način sistematizovala rod *Salmonella*.

Dugo vremena osnova za klasifikaciju i identifikaciju salmonela bila je serološka tipizacija koju je su ustanovili Kauffmann i White 1934. godine. Serološka tipizacija salmonela zasniva se na razlikama u polisaharidnom delu lipopolisaharidnog sloja ćelijskog zida (O ili somatski antigen) i u filamentoznom delu flagela (H ili flagelarni antigen), a do danas je otkriveno preko 2600 različitih serovarijeteta odnosno serotipova (Grimont i Weill 2007; Guibourdenche i sar. 2010).

Kauffmann je predložio da se svaki serovarijetet smatra posebnom vrstom, i salmonele otkrivene pre 1966. godine dobile su imena prema nazivu bolesti koju izazivaju, vrsti domaćina, odnosno geografskoj lokaciji gde su prvi put izolovane (Kauffmann 1966).

Jedno vreme bila je prihvaćena klasifikacija roda *Salmonella* koji je obuhvatao tri vrste *S. choleraesuis*, *S. typhosa* i *S. kauffmanni*. Promene nastale u okviru ove taksonomske grupe 1966. godine dovele su do formiranja tri vrste *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhi* i *Salmonella enteritidis* koja je obuhvatala sve ostale serovarijetete (Ewing i sar. 1972).

Do 1973. godine klasifikacija salmonela zasnivala se na principu svaki serovarijetet (serotip) posebna vrsta, kada je Crosa sa saradnicima pomoću DNK-DNK hibridizacije dokazao da je većina serovarijeteta salmonela, sa nekoliko izuzetaka, blisko srodna (Crosa i sar. 1973).

Potom su na osnovu rezultata molekularnih analiza DNK, odnosno homologije i srodnosti genoma serovarijeteta, Le Minor i saradnici predložili da *Salmonella choleraesuis* bude jedinstveno ime za vrstu koja će imati šest podvrsta (Le Minor i sar. 1982). Nakon utvrđenih razlika u homologiji genoma 1989. godine, jedna podvrsta *S. choleraesuis* subsp. *bongori* izdvojena je kao posebna vrsta (Reeves i sar. 1989).

Posebna komisija međunarodnog komiteta za sistematiku bakterija (the Judicial Commission of the International Committee on the Systematic Bacteriology) razmatrala je 2002. godine različite predloge i došla do rešenja da se ime *Salmonella choleraesuis* zameni sa *Salmonella enterica*, jer naziv *enterica* do tada nije bio upotrebljen kao naziv ni za jedan od serovarijeteta.

Iste godine, napokon, usvojeno je da se rod *Salmonella* sastoji od dve vrste: *S. enterica* koja obuhvata šest podvrsta (*S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. enterica*, *S. houtenae*, *S. indica* i *S. salamae*) i *S. bongori* (Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Procarotes 2005). Osnivanje treće vrste *Salmonella subterranean* u okviru roda predloženo je 2005. godine, iako postoje mišljenja da ova vrsta ne pripada rodu *Salmonella*.

Klasifikacija salmonela na osnovu antigenskih karakteristika, koja se danas koristi, predstavlja rezultat višegodišnjih obimnih istraživanja i proučavanja interakcije antitela sa površinskim antigenima salmonela, a koja su pre skoro jednog veka započeli Kauffmann i White. Kako bi lista serovarijeteta salmonela uvek bila aktuelna Pasteur Institute u Parizu, referentni centar za salmonele Svetske Zdravstvene Organizacije (World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*), periodično objavljuje antigene formule novootkrivenih serovarijeteta - Antigenic Formules of the *Salmonella* serovars (Grimont i Weill 2007; Issenhuth Jeanjean i sar. 2014).

Prema zvaničnim podacima referentnog centra za salmonele Svetske Zdravstvene Organizacije iz 2014. godine u White – Kauffmann - Le Minor šemi nalazi se 2659 različitih serovarijeteta roda *Salmonella* (Issenhuth Jeanjean i sar. 2014).

*Salmonella bongori* obuhvata samo 22 serovarijeteta, a svi drugi uključujući i patogene serovarijetete za ljude i životinje, pripadaju vrsti *Salmonella enterica*, koja ima šest podvrsta:

1. *S. enterica* subsp. *enterica* (ili subspecies I) sa 1586 serovarijeteta,
2. *S. enterica* subsp. *salamae* (ili subspecies II) sa 522 serovarijeteta,
3. *S. enterica* subsp. *arizonae* (ili subspecies IIIa) sa 102 serovarijeteta,
4. *S. enterica* subsp. *diarizonae* (ili subspecies IIIb) sa 338 serovarijeteta,
5. *S. enterica* subsp. *houtenae* (ili subspecies IV) sa 76 serovarijeteta,
6. *S. enterica* subsp. *indica* (ili subspecies VI) sa 13 serovarijeteta.

Precizna karakterizacija izolata je ključna u otkrivanju izvora infekcije, kod primene kontrolnih mera i suzbijanja salmoneloze kod životinja i ljudi. Serotipizacija salmonela više od 70 godina predstavlja nezamenjiv metod u epidemiološkim studijama, koji je tehnički veoma zahtevan pre svega kod proizvodnje antiseruma i pri kontroli kvaliteta izvođenja reakcije aglutinacije. Prema podacima iz literature serotipizacija kod 2% izolata *Salmonella* nije uspešna, a kod 5 -10% komplikovana i moguće je ustanoviti samo delimičnu antigensku formulu.

Konvencionalne – klasične mikrobiološke metode izolacije i identifikacije *Salmonella* izuzetno dugo traju, na primer kod izvođenja standardnih metoda ISO 6579:2002 + A1:2007 ili Public Health England FNES16 od 3 do 5 dana, u zavisnosti da li je rezultat negativan ili je potrebno potvrđivanje pozitivnog rezultata. Krajem prošlog veka, napredak u tehnikama molekularne biologije doveo je do razvoja brze i specifične metode lančane reakcije polimeraze (Polymerase chain reaction - PCR metoda) koja je odmah našla svoju primenu pri identifikaciji odnosno karakterizaciji *Salmonella* (Soumet i sar. 1999). Kod PCR metode vrši se detekcija specifičnih sekvenci gena *Salmonella* i to *fimA* gena koji kodira glavnu subjedinicu fimbrija, *invA* gena koji kodira invazivni gen odnosno *spvC* gena virulencije (Cohen i sar. 1996; Swamy i sar. 1996; Malorny i sar. 2003). Nedavno je počela primena prajmera *Itsf* i *Its* koji doprinose umnožavanju specifične sekvence u nekodirajućoj regiji 16S–23S rRNA gena *Salmonella* (internal transcribed spacer region) (Park i sar. 2006).

U cilju prevazilaženja problema duge i tehnički komplikovane konvencionalne metode serotipizacije izolata *Salmonella*, McQuiston i saradnici su 2011. godine razvili PCR metodu koja se zasniva na karakterizaciji gena koji kodiraju flagelarne antigene *fliC* i *fljB* (McQuiston i sar. 2011). Ukupno je ispitivano 15 H antigena (H:a, -b, -c, -d, -d/j, -e,h, -i, -k, -r, -y, -z, -z10, -z29, -z35 i -z6), 5 glavnih epitopa kompleksnih antigena (H:G, -EN, -Z4, -1, i -L) i 16 sekundarnih epitopa kompleksnih antigena (H:2, -5, -6, -7, -f, -m/g,m, -m/m,t, -p, -s, -t/m,t, -v, -x, -z15, -z24, -z28 i -z51). Poređenjem dobijenih rezultata PCR metodom i rezultata klasične metode serotipizacije kod 461 od ukupno 500 ispitanih izolata odnosno kod 92,2% dobijeni su isti rezultati, što ukazuje na mogućnost primene PCR metode kod utvrđivanja antigenske građe *Salmonella* spp.

Pored konvencionalnog postupka serotipizacije, kod tipizacije *Salmonella* s velikim uspehom se primenjuje metoda elektroforeze u pulsirajućem električnom polju (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE) koja predstavlja i zlatni standard kod tipizacije drugih mikroorganizama. Poređenjem dobijenih rezultata serotipizacije sa rezultatima genotipizacije PFGE metodom ustanovljena je visoka korelacija, a sama PFGE metoda koja se primenjuje kod *Salmonella* spp. standardizovana je pre 15 godina od strane mreže vodećih laboratorija u SAD – PulseNet (the National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance; Swaminathan i sar. 2001). Bopp i saradnici su objavili 2016. godine retrospektivnu analizu sprovedenu između 2012. i 2014. godine u kojoj su poredili rezultate u tipizaciji *Salmonella* primenom konvencionalne serološke serotipizacije i PFGE metode (Bopp i sar. 2016). Autori su zaključili na osnovu ispitanih 4481 izolata *Salmonella* spp. da je primena PFGE metoda u determinaciji serotipa veoma uspešna kod preko 90% sojeva, ali i brža i jeftinija u odnosu na klasičnu serološku serotipizaciju.

## 2.2. Morfološke, tinktorijalne, kulturelne i metaboličke osobine roda *Salmonella*

Rod *Salmonella* spada u familiju *Enterobacteriaceae*, a salmonele predstavljaju Gram negativne štapiće, veličine 0.3-0.5 x 1-2.5  $\mu\text{m}$ , koje se na mikroskopskom preparatu obično nalaze pojedinačno a ređe u parovima ili grupama. Sve salmonele su peritriho obrasle flagelama, izuzev serovarijeteta Gallinarum (biotip Gallinarum i biotip Pullorum). Ne stvaraju spore, dok neki sojevi poseduju kapsulu koja nije vidljiva optičkim mikroskopom.

Pripadaju u nutritivno nezahtevne mikroorganizme. Sve podloge koje u sebi imaju dobar izvor ugljenika i azota, pogodne su za njihovo kultivisanje, na primer: hranljivi agar, brilijant zeleni agar, agar sa ksilozom, lizinom i dezoksiholatom (XLD agar), Wilson Blair agar (WB), endoagar i Hektoen agar (HE). Osobina salmonela da su tolerantne na određene materije poput joda, bizmuta i žučnih soli, koristi se u pripremi selektivnih podloga. Dodatkom navedenih materija, inhibira se rast drugih bakterija i omogućuje rast salmonela.

Rastu u aerobnoj i anaerobnoj sredini. Optimalna temperatura za kultivisanje salmonela je 37 °C, a temperaturni opseg njihovog rasta i razmnožavanja kreće se od 5 do 45 °C. S obzirom da salmonele 48 časova preživljavaju na temperaturi od 42 °C, ova karakteristika se primenjuje pri favorizovanju njihovog rasta u odnosu na druge bakterije uključujući i ostale rodove familije *Enterobacteriaceae*. Druge vrste bakterija na pomenutoj višoj temperaturi znatno sporije rastu. Optimalna pH vrednost za rast salmonela iznosi 7.0, a mogu rasti u sredini u kojoj se pH kreće od 4.0 do 9.0.

Kolonije se najčešće formiraju za 24 časa, ali je nekada potrebno produžiti vreme inkubiranja na 48 sati. Na hranljivom, kao i krvnom agaru, salmonele rastu u vidu okruglih, konveksnih, glatkih i sjajnih kolonija prečnika 2-3 mm. Na XLD agaru, agaru sa ksilozom, lizinom i dezoksiholatom, kolonije *Salmonella* se karakterišu crvenom bojom po pravilu sa crnim centrom. Na *Salmonella-Shigella* agaru rastu kao bezbojne, prozračne kolonije sa crnim centrom. Na MacConkey agaru, takođe rastu u vidu prozračnih bezbojnih kolonija, s tim da podloga ostaje žućkasta, usled njihove osobine da ne razlažu laktozu. Na brilijant zelenom agaru rastu u vidu crvenkastih prozračnih kolonija, dok na Hektoen agaru (HE) rastu u vidu plavičasto zelenih kolonija sa crnim centrom.

*Salmonella* spp. poput velike većine drugih bakterije iz familije *Enterobacteriaceae* predstavljaju fakultativne anaerobe, sposobne da fermentuju glukozu i da redukuju nitrate u nitrite, katalaza su pozitivne i oksidaza negativne. Salmonele pored glukoze fermentuju dulcitol, manitol i maltozu stvarajući gas i kiseline, ali ne fermentuju laktozu, saharozu, malonat i salicin. Većina salmonela stvara H<sub>2</sub>S, iako postoje serovarijeteti koji ga ne stvaraju ili su slabo pozitivni (Janda i Abbott 1998). Ne stvaraju indol i ne otapaju želatin, izuzetak su *S. Eastborne* koja stvara indol i *S. Dar es salaam* koja otapa želatin. Koriste citrat kao izvor ugljenika, redukuju nitrate u nitrite, a ne hidrolizuju ureu. Metil crveno su pozitivne, Voges

Proskauer negativne, vrše dekarboksilaciju aminokiselina ornitina i lizina. Reakcija ONPG odnosno proizvodnja beta-galaktozidaze koristi se za razlikovanje *Salmonella* od *Citrobacter* vrsta, koji ponekad može imati identične ostale biohemijske osobine. Navedene biohemijske karakteristike su pretežno iste za sve vrste, podvrste i serovarijetete *Salmonella* sa malim odstupanjem kod nekih od njih. Biohemijske karakteristike familije Enterobacteriaceae kao i vrsta i podvrsta roda *Salmonella* prikazane se u tabeli broj 1. i tabeli broj 2.

Tabela broj 1. Biohemijske karakteristike najznačajnijih patogenih bakterija iz familije Enterobacteriaceae

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Ewingella americana</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i> *	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Other Shigella</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhi	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Citrobacter koseri</i> (ranije <i>diversus</i> )	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> (ranije)	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia odorifera</i> biotype 2	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Indol	+	-	-	+	-	∨	-	-	+	-	⊖	+	-	+	-	-	-	∨	-	∨	+	-	+	+	+	∨
Metil crveno	+	+	- ⊖	∨	+	+	+	+	+	+	+	+	∨	- ⊖	-	-	-	∨	∨	∨	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	∨	+	+	-	∨	-	-	-	-
Simmons-ov citrate	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	∨	+	+		+	-	+	+	-
H <sub>2</sub> S na trostrukom šećeru	-	-	-	-	-	-	+	+w	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	⊖	⊖	+	+	+	+	-	-	⊖	⊖	⊖	+	+	+	+	- ⊖	+
Pokretljivost	∨	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	∨	+	+	-
Lizin dekarboksilaza	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Arginin dihidrolaza	- ⊖	-	-	+	-	-	∨	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Ornitiin dekarboksilaza	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
Fenilalanin deaminaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Gas od D-glukoze	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
Laktoza	+	+	-	V	-	-	-	-	-	+	+	V	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
Sukroza	V	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	V	+
D-Manitol	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
Inozitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	V	+	-	-	-	+	+	-
D-Sorbitol	+	-	-	-	-	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
L-Arabinoze	+	-	+	-	+	V	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
Rafinoze	V	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnoze	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Rast u KCN	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Otapanje želatina (22°C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
Produkcija Dnaze	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	

V – varijabilna reakcija, + (v) preko 50% pozitivna, – (v) preko 50 % negativna, + preko 80% pozitivna, – preko 80% negativna, \*oxidase pozitivna



Tabela broj 2. Biohemijske karakteristike vrsta i podvrsta roda *Salmonella*

Vrsta <i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	<i>bongori</i>
podvrsta	<i>enterica</i> subspecies I	<i>salamae</i> subspecies II	<i>arizonae</i> subspecies IIIa	<i>diarizonae</i> subspecies IIIb	<i>houtenae</i> subspecies IV	<i>indica</i> subspecies VI	- <i>ranije</i> subspecies V
Flagele	Difazne	Difazne	Monofazne	Difazne	Monofazne	Difazne	Monofazne
Stanište	Toplokrvne životinje	Hladnokrvne životinje i priroda	Hladnokrvne životinje i priroda	Hladnokrvne životinje i priroda	Hladnokrvne životinje i priroda	Hladnokrvne životinje i priroda	Hladnokrvne životinje i priroda
ONPG(2 h)	-	-	+	+	-	D	+
Laktoza	-	-	(-) 75%	(+) 75%	-	(-)	-
Dulcitol	+	+	-	-	-	D	+
Malonat	-	+	+	+	-	-	-
Hidroliza želatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Rast KCN	-	-	-	-	+	-	+
L Tartarat	+	-	-	-	-	-	-
Galakturonat	-	+	-	+	+	+	+
$\gamma$ glutamil transferaza	+*	+	-	+	+	+	+
$\beta$ glukuronidaza	d	D	-	+	-	D	-
Mukat	+	+	+	(-) 70%	-	+	+
Salicin	-	-	-	-	+	-	-
Liza fag O1	+	+	-	+	-	+	d

Legenda: + 90-100% sojeva pozitivno, (+) 76-89% pozitivno, d 26-75% pozitivno, (-) 0-10% pozitivno, - 0% pozitivno, \* - *S. Typhimurium* d, *S. Dublin*

Salmonele poseduju tri vrste antigena: O antigen ili somatski, H antigen ili flagelarni i K antigen ili kapsularni (Grimont i Weill 2007), na osnovu kojih su klasifikovane u serovarijetete (serotipove).

Somatski ili O antigen je polisaharidne prirode, građen od tri međusobno spojena dela: spoljnog dugačkog lanca oligosaharida koji određuje antigensku specifičnost, centralnog polisaharida i lipida A - endotoksina. Somatski antigen je termostabilan i otporan na dejstvo alkohola. Na osnovu ovog antigena, salmonele se razvrstavaju u 67 grupa. U početku grupe su označavane sa slovima A, B, C, D... a kako nije bilo više slova počelo je njihovo obeležavanje brojevima. Sada se grupe označavaju samo brojevima i na primer ranije obeležavana grupa A je grupa 2, grupa B je 4, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> je 6,7, C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> je 8, D<sub>1</sub> je 9 ... (Grimont i Weill 2007). Pored broja grupe O antigena može se dodati u zagradi ranije korišćeno slovo grupe na primer O:4 (B). Somatski O antigen daje sitno zrnastu aglutinaciju na pločici, reakcijom koja se sporo odigrava.

Flagelarni ili H antigeni nalaze se u flagelama, proteinske su prirode, termolabilni i osetljivi na dejstvo alkohola. Na osnovu flagelarnih antigena, unutar grupa salmonela su razvrstane u serovarijetete odnosno serotipove, koji se obeležavaju malim slovima abecede i arapskim brojevima (npr. a, b, c, d ... z, z<sub>1</sub>, z<sub>2</sub>, z<sub>3</sub>...). Trenutno je poznato 114 različitih tipova H antigena. Kod *Salmonella* spp. 64 flagelarna H antigena se karakterišu samo jednim epitopom, na primer H:a, -b, -c i -d. Preostali H antigeni imaju različite multiple epitope i svrstani su kompleksne antigene odnosno antigenski srodne komplekse. Ukupan broj kompleksnih antigena je 45, i oni se sastoje od jednog glavnog i od jednog ili više sekundarnih epitopa. Obeležavanje kompleksnih antigena flagela vrši se na osnovu glavnog epitopa kao što su 1, EN, G, L i Z4 kompleks. Kako na primer H:1 kompleksni antigen pored glavnog H:1 ima i sekundarne epitope H:2, -5, -6, i -7, dodavanjem pored oznake glavnog i oznake sekundarnog epitopa obeležava se serotip, na primer H:1,2, -1,5, -1,6, ili -1,7. Osam različitih antigena - epitopa je prepoznato u okviru kompleksnog antigena - kompleksa 1 (H:1,2, -1,5...), četiri u Z4 kompleksu (H:z<sub>4</sub>,z<sub>23</sub>, -z<sub>4</sub>,z<sub>24</sub>. . .), tri u EN kompleksu (H:e,n,x, -e,n,z<sub>15</sub> i -e,n,x,z<sub>15</sub>), šest u L kompleksu (H:l,v, -l,w, -l,z<sub>13</sub>...), i dvadesetjedan u G kompleksu (H:f,g,t, -g,m. . .). U zavisnosti da li imaju samo jedan ili dva H flagelarna antigena salmonele se često i dele u monofazne odnosno difazne serovarijetete – serotipove.

Kapsularni ili K antigen (Vi antigen) je sačinjen od polisaharida ali ima i proteinsku komponentu, koja može da onemogući dokazivanje O antigena. Prisutan je kod tri serotipa (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* i *S. Dublin*).

Generalno, salmonele koji pripadaju podvrsti *S. enterica* subsp. *enterica* se obično izoluju kod ljudi i toplokrvnih životinja, dok se ostalih pet podvrsta *S. enterica* i *S. bongori* češće nalaze kod hladnokrvnih životinja i spoljnoj sredini nego kod ljudi (Pui i sar. 2011).

Salmonele mogu dugo preživeti u spoljnoj sredini, naročito ako se nalaze u vlažnom, toplom ili fecesom kontaminiranom okruženju, čak i do 12 meseci u zemljištu. Pod određenim uslovima mogu se umnožavati i u datim ekološkim nišama (Abulreesh 2012). Salmonele mogu preživeti u pijaćoj vodi do 89 dana, u barskoj vodi 115 dana, u suvom izmetu gmizavaca 6 meseci, a u akvarijumskoj vodi gde su boravile kornjače i do 6 nedelja. Salmonele su nađene u svim tipovima vodenih staništa, naročito onim koje su zagađene fekalijama (Bhatta i sar. 2007).

### **2.3. Dijagnostičke metode utvrđivanja *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca**

Danas se koristi veći broj dijagnostičkih metoda za utvrđivanje prisustva salmonela kod gmizavaca i vodozemaca. Iako je izolacija, identifikacija i serotipizacija najčešći primenjivani metod, svoje mesto u laboratorijskom radu našli su i enzimski imuno esej - ELISA test i PCR tehnika. Pored toga što je PCR tehnika izuzetno osetljiva metoda, koja može da otkrije prisustvo *Salmonella* spp. i kada njihov broj iznosi  $10^2$  - $10^4$  bakterija u uzorku, serotipizacija je ključna za epidemiološke odnosno epizootiološke analize, i zbog toga je neophodna izolacija uzročnika.

Pri izolaciji *Salmonella* upotrebljava se veći broj podloga za obogaćivanje rasta i to najčešće tetratonat bujon, Rappaport-Vassiliadis bujon i selenit bujon. Izbor podloge za obogaćivanje je ključan za uspešnu izolaciju salmonela. Tako na primer tetratonat bujon dovodi do inhibicije rasta određenih serovarijeteta *Salmonella* (Van Schothorst i sar. 1977). Rappaport-Vassiliadis bujon ili polutečni agar koji se upotrebljavaju tokom postupka izolacije salmonela kod živine nisu toliko uspešni prilikom izolacije *Salmonella enterica* podvrste IIIa i IIIb,

odnosno kod *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* i *diarizonae*, koji su često prisutni kod gmizavaca. Pored jednodnevnog u mnogim laboratorijama se koristi produženo obogaćivanje rasta *Salmonella* koje traje 3-5 dana (Waltman i sar. 1991).

I kod selektivnih i diferencijalnih podloga postoje razlike u njihovoj selektivnosti. Pored XLD agara i *Salmonella-Shigella* agara, kod izolacije salmonela od gmizavaca koriste se i bizmut sulfitni agar i agar sa ksilozom, lizinom i tergitolom 4 (XLT-4) (Mitchell – Chapter 68, Mader 2006).

Prilikom identifikacije roda *Salmonella* vrši se presejavanje kolonija na agar sa lizinom i gvožđem, podlogu sa ureom i trostruki šećer sa gvožđem. Pored konvencionalnih testova u laboratorijama se primenjuju i komercijalni biohemijski testovi najčešće bioMérieux API® Gram negative Identification API® 20E i Becton, Dickinson and Company BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit. Aglutinacija na pločici polivalentnim antiserumom za O antigene se može primenjivati u cilju identifikacije salmonela.

Poslednjih godina je masena spektrometrija kao analitička metoda kvalitativnog i kvantitativnog otkrivanja nastalih jona našla mesto u identifikaciji mikroorganizama. Na tržištu je dostupan sistem za automatizovanu mikrobiološku identifikaciju koji koristi inovativnu masenu spektrometrijsku tehnologiju MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight) i koji omogućava otkrivanje proteina direktno iz intaktnih bakterija, odnosno gljivica, a time identifikaciju u roku od nekoliko minuta. Umesto ispitivanja biohemijskih osobina suspektih kolonija Romero sa saradnicima je pri identifikaciji *Salmonella* spp. izolovanih od gmizavaca primenio sa uspehom sistem MALDI-TOF MS Microflex LT proizvođača Bruker Daltonics iz Nemačke (Romero i sar. 2016).

Nakon identifikacije roda, vrste i podvrste salmonela, pristupa se utvrđivanju antigenske građe izolata i prisustva određenog somatskog, flagelarnih i kapsularnog antigena.

Pored izolacije, identifikacije i serotipizacije veći broj autora je koristio i druge dijagnostičke metode u otkrivanju salmonela kod gmizavaca i vodozemaca, i to ELISA test i PCR tehniku. U prethodnih 25 godina imunoenzimski antigen vezujući test (AC-ELISA) se primenjuje u otkrivanju salmonela kako u kliničkom materijalu tako i u hrani odnosno hrani za životinje. Pelton i saradnici ispitivali su mogućnost primene AC-ELISA testa u detekciji *Salmonella* u

fecesu konja, živine i gmizavaca (Pelton i sar. 1994). Autori su istakli da je metoda izolacije i identifikacije *Salmonella* upotrebom selektivnih podloga za obogaćivanje rasta kao i ispitivanje biohemijskih i antigenih osobina veoma senzitivna i specifična, ali s druge strane duga i komplikovana. AC-ELISA metoda skraćuje za 1 do 3 dana vreme potvrđivanja prisustva *Salmonella*, a test se izvodio iz podloge za obogaćivanje rasta, selenit bujona. Dobijeni rezultati su ukazali na visoku specifičnost AC-ELISA metode ali i nisku senzitivnost, prisustvo salmonele je otkriveno u samo 24 uzorka u odnosu na 35 paralelnih pozitivnih izolata. Prema autorima minimalan broj *Salmonella* koji u ispitivanom uzorku može otkriti AC-ELISA metoda, odnosno limit detekcije metode, iznosi između  $1 \times 10^6$  i  $1 \times 10^8$  CFU/ml.

Tan i saradnici su izvršili poređenje uspešnosti dve dijagnostičke metode u otkrivanju prisustva *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*, i to kompetitivne ELISA metode (c-ELISA) i metode kultivisanja sa obogaćivanjem rasta u polutečnoj Rappaport Vassiliadis podlozi (Tan i sar. 1997). Kod ispitanih 3928 uzoraka c-ELISA metoda je imala osetljivost od 92,9% i specifičnost od 96,7%. Limit detekcije c-ELISA testa iznosio je  $10^2$  do  $10^3$  salmonela u gramu fecesa odnosno  $10^6$  bakterija u ml podloge za obogaćivanje, što je bilo više u odnosu na metodu kultivisanja sa obogaćivanjem rasta čiji je limit detekcije bio niži i iznosio je  $10^2$  CFU/g.

Postoji mišljenje da je PCR metoda sa prethodnom fazom obogaćivanja rasta isto osetljiva ako ne i osetljivija u odnosu na postupak izolacije i identifikacije salmonela sa prethodnim obogaćivanjem rasta. Za PCR metodu bez obogaćivanja limit detekcije iznosi  $10^3$ - $10^4$  CFU u gramu fecesa, dok kod metode izolacije i identifikacije nakon obogaćivanja rasta limit detekcije je  $10^1$ - $10^2$  CFU u gramu fecesa (Cohen i sar. 1993). Uvođenje faze obogaćivanja rasta u selenit bujonu pre izvođenja PCR testa dodatno snižava limit detekcije, odnosno doprinosi još boljoj analitičkoj osetljivosti metode. Pored toga, PCR metoda je brža od metode kultivisanja, i traje od 10 do 12 časova u odnosu na najmanje 2 do 4 dana (Mitchell – Chapter 68, Mader 2006).

PCR metoda je našla svoje mesto i u konfirmaciji salmonela. Tako su Abatcha i saradnici nakon izolacije i preliminarne biohemijske identifikacije sojeva *Salmonella spp.* izolovanih od zmija potvrdu vršili PCR metodom upotrebom prajmera specifičnih za rod *Salmonella*, i to za *invA* gen 5'-3': GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA i 5'-3': TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C (Abatcha i sar. 2013).

Kako su po pravilu različiti serovarijeteti prisutni kod viših kičmenjaka u odnosu na gmizavce i vodozemce, s pravom se postavlja pitanje da li je postupak izolacije i identifikacije koji se primenjuje kod ptica i sisara adekvatan i kod ovih vrsta životinja. Istorijski, metoda kultivisanja smatra se zlatnim standardom za otkrivanje bakterijskih infekcija kičmenjaka. Imajući u vidu čestu latenciju salmonela kod domaćina i samo povremeno izlučivanje bakterija putem fecesa nije lako odabrati dijagnostičku metodu ispitivanja zadovoljavajuće osetljivosti i specifičnosti. Tako je Mitchell sa saradnicima pokušao da utvrdi koji se od primenjivanih testova kod otkrivanja salmonela kod gmizavaca može preporučiti kao zlatni standard (Mitchell – Chapter 68, Mader 2006). Uporedo su izvođene tri metode izolacija sa obogaćivanjem rasta u selenit bujonu i na XLT-4 agaru, ELISA Bioline *Salmonella* test i PCR tehnika. Utvrđena osetljivost i specifičnost PCR iznosila je 0.92 odnosno 0.94, ELISA testa 0.81 i 0.86 a izolacije sa obogaćivanjem rasta 0.67 i 0.99. Na osnovu dobijenih rezultata Mitchell je sa saradnicima zaključio da je PCR metoda najosetljivija, a postupak izolacije sa obogaćivanjem rasta najspecifičniji, tako da je PCR preporučeni dijagnostički test a dodatna ukupna osetljivost i specifičnost primenjenog dijagnostičkog postupka se povećava izolacijom i serotipizacijom salmonela.

U identifikaciji mikroorganizama poslednjih godina sve širu primenu je našla masena spektrometrija, hemijska analiza koja se koristi za merenje mase nepoznatih molekula jonizacijom, razdvajanjem i detekcijom jona prema njihovom odnosu mase i naelektrisanja. Jonizacija ispitivanog uzorka je potpomognuta laserskom desorpcijom iz matriksa (MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), a maseni spektri se mogu utvrditi primenom masenog spektrometra – analizatora sa vremenom preleta (TOF – Time Of Flight). Primenom MALDI-TOF masenog spektrometra, nakon laserom izazvane jonizacije proteina dolazi do njihovog razdvajanja u električnom polju i u vakuum cevi, i to prema odnosu mase i električnog naboja. Proteini stižu u detektor obrnuto proporcionalno njihovoj masi stvarajući profil odnosno maseni spektar proteina koji je specifičan za svaki mikroorganizam. MALDI-TOF masenu spektrometriju, kao hemotaksonomsku metodu u identifikaciji *Salmonella spp.* koristio je veći broj autora (Dieckmann i Malorny 2011; Kuhns i sar. 2012; Deng i sar. 2014).

## 2.4 Prisustvo *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca

*Salmonella* spp. se često mogu izolovati i od zdravih i obolelih gmizavaca i vodozemaca, kako kod kućnih ljubimaca tako i onih slobodnih u prirodi ili držanih u zoološkom vrtu. Teško je precizno odrediti njihovu ulogu u izazivanju oboljenja gmizavaca i vodozemaca, a svakako predstavljaju najpoznatije zoonoze koje prenose ove životinje.

Salmonele kod gmizavaca se nalaze u distalnom delu tankih creva i kolonu, a po svemu sudeći kolonizacija digestivnog trakta retko dovodi do primarnog oboljenja i ove bakterije predstavljaju sastavni deo normale mikroflore creva (Mitchell 2001).

Klinička manifestacija salmoneloze koja se retko pojavljuje kod gmizavaca može proteći u vidu septikemije, osteomielitisa, salpingitisa, nefritisa, dermatitisa i apcesa. Mnoga istraživanja su sprovedena, ali i dalje je nedovoljno razjašnjena patogenezna salmoneloze kod gmizavaca. Nakon ekspozicije uzročniku najčešće dolazi do supkliničke infekcije praćene povremenim izlučivanjem salmonela fecesom iz organizma. Kliconoštvo, intermitentno širenje salmonela i rizik od reinfekcije dodatno komplikuju razumevanje patologije i epizootologije salmoneloze gmizavaca (Page 1966; Mermin i sar. 2004).

Pojava oboljenja je povezana sa vrstom kornjače, guštera ili zmije kao i sa faktorima sredine, pre svega spoljnom temperaturom. Izolacija *Salmonella* spp. od klinički zdravih gmizavaca i vodozemaca ukazuje da razvoj i manifestacija bolesti zavisi od vrste životinja, individualne osetljivosti, stresa i načina ishrane.

Prema podacima iz literature podvrste i serovarijeteti *Salmonella enterica* koji mogu prouzrokovati oboljenja praćena uginućem gmizavaca i vodozemaca su (Onderka i sar. 1985; Frye i sar. 1991):

- *S. enterica* subsp. *enterica* – serovarijeteti *S. Agioboo*, *S. Anatum*, *S. Carrau*, *S. Chameleon*, *S. Durham*, *S. Infantis*, *S. Krefeld*, *S. Montevideo*, *S. Muenchen*, *S. Oslo*, *S. Pomona*, *S. Saint-Paul*, *S. Thompson*, *S. Typhimurium*.
- *S. enterica* subsp *salamae*,
- *S. enterica* subsp *houtenae*.

Iako većina istraživanja ukazuje na visoku prevalenciju brojnih podvrsta i serovarijeteta *Salmonella enterica* kod gmizavaca i vodozemaca, infekcije protiču inaparentno, a kod veštačkih infekcija zmija, kornjača i guštera utvrđeno je samo izlučivanje salmonela putem fecesa bez kliničkih simptoma oboljenja.

Postoji mišljenje da salmonele koje pripadaju podvrsti *S. enterica* subsp. *enterica* se mnogo češće pojavljuju kod sisara i ptica nego kod gmizavaca (Briones i sar. 2004), a sa druge strane potvrđeno je da se ove salmonele mogu uneti u gmizavce putem njihove ishrane glodarima koji su inficirani salmonelama (Pfleger i sar. 2003). Ipak, treba istaći da se serovarijeteti *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* vrlo retko otkrivaju kod gmizavaca, iako je dobro poznato da je serovarijetet *S. Typhimurium* široko rasprostranjen kod pacova i miševa (Murray 2000).

*Salmonella* spp. je prvi put ustanovljena kod guštera 1939. godine, kod zmija 1944. godine, a kod kornjača 1946. godine (Caldwell i Ryerson 1939; Hinshaw i McNeil 1944; Hinshaw i McNeil 1946). Salmonele se kod kornjača prenose vertikalno i to transovarijalnim putem odnosno prilikom prolaska jaja kroz kloaku (Chiodini i Sundberg, 1982).

Prema rezultatima brojnih autora prevalencija salmonela kod gmizavaca varira od 6-100% kod kornjača, 30-76% kod guštera i 54-100% kod zmija (Hoelzer i sar. 2011). Pfleger kao i Mermin sa svojim saradnicima zaključili su da *Salmonella* spp. predstavljaju sastavni deo mikroflore gastrointestinalnog trakta gmizavaca (Pfleger i sar. 2003; Mermin i sar. 2004).

Goupil i saradnici pratili su tokom 10 nedelja prisustvo *Salmonella* kod grupe od 12 zdravih zmija, čiji je feces ili kloakalni bris jednom nedeljno ispitivan (Goupil i sar. 2012). Od ukupno 12 zmija, čak 11 je bilo barem jednom pozitivno na prisustvo salmonela, a nedeljna prevalencija kod ispitivanih jedinki iznosila je između 25% i 66%. Preko 50% pozitivnih nedeljnih uzoraka je ustanovljeno kod 7 zmija, a od 9 jedinki su izolovana dva ili više različitih serovarijeteta *Salmonella*. Ukupno je determinisano 15 serovarijeteta uključujući i tri serovarijeteta povezana sa salmonelozom ljudi *S. Newport*, *S. Oranienburg* i *S. Muenchen*. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa rezultatima drugih autora koji ukazuju na visok nivo kolonizacije creva zmija sa *Salmonella* spp., a da je izlučivanje bakterija iz jedinki samo povremeno. Kako su salmonele utvrđene kod miševa kojim su zmije hranjene autori su naglasili da ishrana zmija može da bude njihov put infekcije.



Jackson i saradnici su, u svom radu 1971. godine, ispitivali prisustvo salmonela kod kornjača u zoološkim vrtovima i izolovali su je iz 12,1% kloakalnih briseva. Ukupno su utvrdili šest različitih serovarijeteta, koji su pripadali *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, osim jednog izolata iz podvrste *S. enterica* subsp. *arizonae* (Jackson i Jackson 1971).

Readel i saradnici su 2009. godine ispitivali prisustvo salmonela kod kornjača slobodnih u prirodi (*Trachemys scripta elegans*) i ustanovili ih u 11% kloakalnih briseva (Readel i sar. 2009). Pasma i saradnici su ispitivali pojavu *Salmonella* spp. u centru za oporavak šumskih kornjača (*Testudo hermanni*). Prisustvo salmonela je bilo dokazano kod čak 80% kloakalnih briseva šumskih kornjača, od kojih je 75% izolata pripadalo *S. enterica* subsp. *enterica*, a ostatak *S. enterica* subsp. *salamae* i *S. enterica* subsp. *diarizonae* (Pasma i sar. 2000).

Savage i Baker su u uzorcima kloakalnih briseva kornjača poreklom iz Jugoslavije, Rusije i Turske otkrili prisustvo bakterija roda *Salmonella* u 38% ispitanih materijala (Savage i Baker, 1980).

Cambre i saradnici su ispitivali prisustvo salmonela kod gmizavaca u zoološkom vrtu i ustanovili je kod 117 od ukupno 311 ispitanih jedinki (Cambre i sar. 1980). Prevalencija salmonela je bila najviša kod zmija 55%, zatim kod guštera 36% i na kraju kod kornjača 3%.

Briones i saradnici su tokom proleća i leta 2001. godine ispitivali prisustvo salmonela kod 166 gmizavaca i vodozemaca slobodnih u prirodi u centralnoj Španiji. *Salmonella* spp. su izolovane od 41,5% ispitanih gmizavaca dok nisu utvrđene kod vodozemaca (Briones i sar. 2004). Najveći broj izolata predstavljala je *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (50%), zatim *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (29,2%), *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (12,5%) i na kraju *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (8,3%). Ukupno je izolovano 27 različitih serovarijeteta od kojih su najčešći bili *S. Anatum* (12,5%), *S. Herzliya* (8,3%), *S. Abony*, 18:l,v;z, 9,12:z29:1,5 i 38:z10:z53 (6,2%). Ukupno 37,5% izolata je pripadalo serovarijetetima koji su uzročnici salmoneloze ljudi. Na osnovu dobijenih rezultata autori su zaključili da gmizavci za razliku od vodozemaca predstavljaju u prirodi važan rezervoar *Salmonella* i da predstavljaju potencijalnu opasnost po zdravlje ljudi.

Kuroki i saradnici su ispitivali od juna 2006. do maja 2009. godine prisustvo *Salmonella* kod ukupno 87 zmija slobodnih u prirodi u Japanu. Prevalencija salmonela kod ispitivanih zmija

iznosila je 58,6%, i to 41.1% *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* i 12,6% *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Kuroki i sar. 2013). Sledeći serovarijeteti *Salmonella enterica* subsp. *enterica* su utvrđeni kod zmija: *S. Eastbourne*, *S. Mikawashima*, *S. Narashino*, *S. Newport*, *S. Saintpaul* i *S. Thompson*. Visoka prevalencija salmonela kod zmija kao i prisustvo određenih serovarijeteta uzročnika salmoneloze kod ljudi navela je autore na zaključak da ove vrste gmizavaca predstavljaju važan izvor infekcije u prirodi.

Schellings sa saradnicima publikovala je 2011. godine podatke o prevalenciji *Salmonella* kod gmizavaca u Australiji, koja je iznosila 27,6%, i to kod zmija 69,2%, guštera 21,7%, i kornjača 2% (Scheelings i sar. 2011). Izolati su pripadali uglavnom podvrstama *S. enterica* subsp. *enterica* i *S. enterica* subsp. *diarizone*. Kod zmija je 69% izolata salmonela pripadalo *S. enterica* subsp. *diarizonae* a 26% *S. enterica* subsp. *enterica*. Kod guštera su približno isto bili zastupljeni sojevi ove dve podvrste *S. enterica*. Autori su приметili i da su salmonele češće izolovane kod gmizavaca karnivora nego kod gmizavaca insektivora.

Krautwald-Junghanns i saradnici su objavili 2013. godine rezultate ispitivanja prisustva, raširenosti i prevalencije serovarijeteta *Salmonella* kod slobodnih u prirodi odnosno zatočenih zmija. Od ukupno 174 zmije izolovana su 43 izolata *Salmonella enterica* i to 27 izolata podvrste *diarizonae* (IIIb), 7 izolata *enterica* (I) (n = 7) i 6 izolata *houtenae* (IV). Najčešći ustanovljeni sojevi kod zmija bili su *S. enterica* subsp. *enterica* (I) serovar Paratyphi B i *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb) serovar 47:l,v;z kod 4 odnosno 3 jединke. Prethodno neopisan serovarijetet *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb) 40:i:z53 je ustanovljen kod dve šarke *Vipera berus* sa različitih lokacija.

Zajec i saradnici su 2015. godine ispitivali raširenost bakterija i parazita kod zmija u parku prirode u centralnoj Poljskoj. Od ukupno 16 ispitanih zmija, 15 belouški *Natrix natrix* i 1 smukulje - lažna šarka *Coronella austriaca*, kod 14 odnosno 87.5% je utvrđeno prisustvo *Salmonella* spp. Ukupno je identifikovano i serotipizirano 33 izolata *Salmonella* spp., i to ne po jedan nego i do četiri različita serovarijeteta kod pojedinih zmija. Ukupno je ustanovljeno 9 različitih serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* i 2 *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Najčešće ustanovljeni serovarijetet kod 9 ispitivanih zmija bio je *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb) 38:r:z. I većina drugih utvrđenih serovarijeteta pripadalo je *Salmonella enterica* podvrsti *diarizonae* (IIIb) 21:l,v;-; 28:z<sub>10</sub>:z i 47:1,v;z, 48:k:z<sub>53</sub>.

Romero i saradnici su publikovali 2016. godine rad u kome su ispitivali prisustvo salmonela kod 74 gmizavca držanih u zoološkom vrtu u Ljubljani. Identifikacija salmonela vršena je primenom MALDI –TOF masene spektrometrije, a koje su otkrivene kod 29,7% ispitanih gmizavaca. Utvrđena prevalencija *Salmonella* spp. kod zmija, guštera i kornjača iznosila je 38.6%, 18.2% i 12.5%. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* je bila najčešće zastupljena podvrsta *Salmonella enterica* (63.6%), a zatim podvrsta *diarizonae* (31.8%) i *arizonae* (4.5%), a od serovarijeteta *S. Infantis* 6,7,14:r:1,5 i *S. Uzaramo* 1,6,14,25:z4,z24.

Clancy i saradnici publikovali su 2016. godine retrospektivnu kros-sekcijsku studiju pojave podvrsta i serovarijeteta *Salmonella enterica* kod gmizavaca u zoološkom vrtu u Bronksu u periodu od januara 2000. do decembra 2012. godine. Studijom je obuhvaćeno 11 krokodila, 78 zmija, 59 guštera i 34 kornjače, a ukupno je izolovano 175 sojeva salmonela. *S. enterica* subsp *enterica* je bila najčešće determinisana podvrsta *S. enterica* (45%), a zatim *Salmonella enterica* subsp *diarizonae* (24%). Izolati *S enterica* subsp *diarizonae* (IIIb) su većinom izolovani od zmija (81%), kao i svi izolati *S enterica* subsp *arizonae* (IIIa). Kliničke manifestacije salmoneloze kod zmija uključivale su dermatitis, promene na kostima kao i anoreksiju. Najčešći determinisani serovarijeteti predstavljali su *S. Newport*, *S. IV 43:z4,z32:-*, *S. Braenderup*, *S. Montevideo*, *S. Oranienburg* i *S. Thompson*.

Procenjuje se da je čak i do 90% gmizavaca kućnih ljubimaca inficirano salmonelama i to ne samo onim serovarijetetima specifično adaptiranim na kornjače, guštere ili zmije nego i onim koji mogu dovesti do infekcija ljudi i drugih vrsta životinja (Woodward i sar. 1997).

Salmonele su veoma često izolovane od gmizavaca kao kućnih ljubimaca, u Italiji kod 24 % (Ebani i sar. 2005), a u Austriji i Nemačkoj kod 54,1% ispitanih jedinki (Geue i Loschner, 2002). Veće agregacije životinja nesumnjivo doprinose lakšem širenju uzročnika, u Belgiji je prevalencija *Salmonella* kod guštera u odgajivačnicama odnosno centrima za prodaju kućnih ljubimaca iznosila 76% (Pasmans i sar. 2005).

Wikström i saradnici su u decembru 2011. godine ispitivali prisustvo *Salmonella* spp. u 63 terarijuma u Švedskoj i ustanovili prisustvo u 80% domaćinstava koje čuvaju gmizavce kao kućne ljubimce. Imajući u vidu visoku korelaciju dobijenih rezultata izolacije iz kloakalnih briseva i fecesa gmizavaca sa rezultatima izolacije iz uzoraka podloge iz terarijuma, autori su

zaključili da se salmonele brzo šire između životinja u istom terarijumu i ukazali na potrebu sprovođenja posebnih mera opreza prilikom čišćenja terarijuma radi minimalizovanja rizika od infekcija vlasnika.

Lukač i saradnici su sproveli od 2009. do 2011. godine u Hrvatskoj ispitivanje prisustva i raširenosti sojeva *Salmonella* kod gmizavaca držanih kao kućnih ljubimaca odnosno u zoološkom vrtu (Lukac i sar. 2015). Ukupno je mikrobiološkim analizama obuhvaćeno 200 zdravih reptila od kojih je uzeto ukupno 292 uzorka briseva kože, ždrela, kloake odnosno fecesa. Prisustvo salmonela je utvrđeno kod 13% ispitanih životinja i to kod 48,4% guštera, 8,9% zmija i 3,8% kornjača. Ustanovljene su sledeće podvrste *Salmonella enterica*: *Salmonella enterica* subsp *enterica* 34,6%, *Salmonella enterica* subsp *houtenae* 23,1%, *Salmonella enterica* subsp *arizonae* 23,1%, *Salmonella enterica* subsp *diarizonae* 15,4%, a *Salmonella enterica* subsp *salamae* 3,8%. Ukupno je otkriveno prisustvo 14 različitih serovarijeteta uključujući i onih koji se retko pojavljuju *S. Apapa*, *S. Halle*, *S. Kisarave* i *S. Potengi*.

Prevalencija salmonela kod vodozemaca zavisi od vrste, i viša je kod žaba nego kod salamandera i daždevnjaka. Većina infekcija vodozemaca je asimptomatska, a salmonele se prema literaturnim podacima samo povremeno izlučuju u spoljnu sredinu.

## **2.5. Zoonozni aspekt *Salmonella* spp. prisutnih kod gmizavaca i vodozemaca**

Gmizavci i vodozemci, kao i druge vrste životinja i kućnih ljubimaca, mogu biti rezervoar i izvor zoonoza, a tom činjenicom predstavljaju i opasnost po zdravlje ljudi.

Najznačajniji uzročnici zoonoza bakterijske etiologije prisutni kod gmizavaca su *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., druge vrste iz familije *Enterobacteriaceae* uključujući *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* i *Yersinia enterocolitica*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp. (*M. marinum*, *M. avium* i *M. tuberculosis*) i *Coxiella burnetii*. Veći broj vrsta gljivica *Basidiobolus ranarum*, *Conidiobolus* spp., *Mucor* ssp. i *Rhizopus arrhizus* kao i virusa, poput virusa zapadnog

encefalitisa konja i virusa Zapadnog Nila, mogu od gmizavaca preći na ljude i prouzrokovati oboljenja.

Ljudi koji su u čestom kontaktu sa gmizavcima i vodozemcima su pod višim rizikom od pojave zoonoza, što je od posebnog značaja za vlasnike životinja, zaposlene u prodavnicama kućnih ljubimaca, odgajivačnicama ili zoološkim vrtovima. Najviši rizik je prisutan kod beba i dece mlađe od 5 godina, starih ljudi kao i osoba sa imunokompromitovanim stanjem.

Gmizavci i vodozemci mogu preneti brojne potencijalne patogene na ljude, a rizik zavisi od toga da li je jedinka slobodna u prirodi, držana u kući, zoološkom vrtu ili pet shopu, da li postoji kontakt sa drugim životinjama, kao i od načina ishrane, držanja, održavanja higijene i dezinfekcije. Kontaminirana hrana često može da bude izvor infekcije gmizavaca, naročito ako se hrane živim životinjama poput miševa ili pilića, a ne gotovim proizvodima.

Radi minimalizovanja rizika od infekcija ljudi, životinje ne bi trebalo držati u kuhinji i prostoru gde se priprema hrana. Nakon kontakta sa gmizavcem ili vodozemcem potrebno je oprati ruke toplom vodom i sapunom (Bradley i sar. 2001). Bebe i deca ne bi trebalo da se igraju ili da ljube gmizavce. Tokom čišćenja terarijuma ili prostora gde su smeštene životinje potrebno je nositi rukavice, po mogućnosti i masku, a neophodno je sprovesti i redovnu dezinfekciju. U slučaju držanja i drugih kućnih ljubimaca, na primer pasa ili mačaka, treba sprečiti njihov kontakt sa gmizavcima. Preporuka je da životinje imaju svoj bazen i da ne koriste odnosno da se ne kupaju u sudoperi ili kadi (Marcus, 2002).

Lamm sa saradnicima ukazao je 1972. godine na, duži niz godina prisutan problem u SAD, rizik od infekcija ljudi salmonelama poreklom od kornjača kao kućnih ljubimaca, a koje su prvi put zabeležne 1944. godine (Lamm i sar. 1972). Iste godine Altman sa saradnicima je objavio studiju koja je obuhvatila 124 porodice sa decom starosti između jedne i deset godina. Autori su utvrdili četiri puta veću prevalenciju *Salmonella* spp. kod dece koja su živela u domu sa kornjačom kao kućnim ljubimcem u odnosu na one bez kornjača, 22,6% u odnosu na 5,7% (Altman i sar. 1972).

Tokom sedamdesetih godina prošlog veka sproveden je u SAD veći broj epidemioloških studija s ciljem da se utvrdi rizik po zdravlje ljudi od *Salmonella* spp. poreklom od kornjača držanih kao kućni ljubimci (Lamm i sar. 1972, Kaufmann i sar. 1972, Cohen i sar. 1980).

Procenjeno je da godišnje 280.000 od ukupno 2.000.000 zabeleženih slučajeva salmoneloze ljudi u SAD je povezano sa kornjačama. Ova procena se zasnivala na podacima da 4,2% od 60 miliona domaćinstava u SAD je držalo kornjače u svom domu, kao i da se preko 15 miliona kornjača godišnje prodavalo širom Amerike. Rizik od infekcija ljudi salmonelama poreklom od kornjača kao kućnih ljubimaca je procenjen na 2%, a kornjače su bile odgovorne za 14 do 23% slučajeva salmoneloze kod dece (Lamm i sar. 1972; Cohen i sar. 1980).

Ovi više nego zabrinjavajući epidemiološki podaci, doveli su 1972. godine do donošenja propisa u SAD od strane Agencije za hranu i lekove SAD (United States Food and Drug Administration FDA) kojima je uvedeno obavezno ispitivanje kornjača na odsustvo salmonela pre njihove prodaje, odnosno zabrane prodaje jaja i kornjača manjih od 10 centimetara. Procenjuje se da je donetim propisima u SAD smanjen broj salmoneloze kod ljudi, i to pre svega kod dece, za 100.000 slučajeva na godišnjem nivou (Hoelzer i sar. 2011).

Broj slučajeva salmoneloze ljudi koji se povezuju sa gmizavcima kao izvorom infekcije se značajno povećao prethodnih godina. Tako je na primer u Švedskoj, usled promene uvozne procedure nakon usklađivanja nacionalnih sa propisima Evropske unije i posledično prestanka obaveznog laboratorijskog ispitivanja uvoznih pošiljki gmizavaca na salmonele, došlo do povećanja incidencije slučajeva salmoneloze ljudi povezanih sa gmizavcima. U odnosu na period od 1990. do 1994. godine sa 0,015 slučajeva na 100.000 ljudi povećala se incidencija tokom 1996. i 1997. godine na 0,79 slučajeva na 100.000 ljudi (de Jong i sar. 2005). Deca su predstavljala najugroženiji deo populacije, a utvrđena incidencija u datom istraživanju iznosila je 1.3 slučaja na 100.000 dece.

Infekcije ljudi salmonelama poreklom od gmizavaca češće dovode do sistemskog oboljenja nego one unešene hranom, a posebno su ugrožena deca, trudnice i starije osobe. Dodatni problem sprečavanja infekcija ljudi salmonelama poreklom od gmizavaca i vodozemaca je često prisustvo latentnih infekcija životinja, koje samo povremeno izlučuju bakterije iz svog organizma. Ekskrecija salmonela je često povezana sa stresom kao što su transport, novo okruženje ili način ishrane životinja.

Kako salmonele mogu preživeti dugo u spoljašnjoj sredini, u većem broju slučajeva dokazano je indirektno prenošenje bakterije sa gmizavaca na ljude iz kontaminirane sredine ili putem

predmeta (Mermin i sar. 1997). Način prenošenja *Salmonella* zavisi pre svega od vrste i držanja gmizavaca i vodozemaca. Gušteri i neke vrste zmija često se slobodno kreću po kući potencijalno kontaminirajući podove, tepihe i nameštaj. Salmonele dugo preživljavaju izvan jedinke i uspešno su izolovane iz isušenog fecesa gmizavaca 6 meseci nakon njihovog odlaska iz terarijuma, kao i iz vode akvarijuma 6 nedelja od poslednjeg boravka kornjače u njemu (Rosenstein i sar. 1986; Grier i sar. 1993).

Širom sveta pored kornjača i druge vrste životinja - zmije, gušteri i žabe predstavljaju popularne kućne ljubimce, a procenjuje se da oko 3% domaćinstava u Sjedinjenim Američkim Državama drži gmizavce. Ukupan broj gmizavaca kao kućnih ljubimaca u SAD iznosi 7,3 miliona, zmije se drže u 400.000, gušteri u 700.000, a kornjače u 1.000.000 domaćinstava (American Veterinary Medical Association, 2007).

Tačan broj slučajeva salmoneloze ljudi koji su posledica kontakta sa gmizavcima teško je precizno odrediti. Procenjuje se da je 74.000 ovakvih slučajeva na godišnjem nivou u Sjedinjenim Američkim Državama, što predstavlja 6% svih slučajeva salmoneloze ljudi, odnosno 11% slučajeva kod osoba mlađih od 21. godine (Mermin i sar. 2004). U državi Mičigen, u Sjedinjenim Američkim Državama, od ukupnog broja salmoneloze dece mlađe od 5 godina čak 11,8% slučajeva je povezano sa gmizavcima (Wells i sar. , 2004).

Prema retrospektivnoj analizi prevalencije serovarijeteta *Salmonella* kod ljudi u Sjedinjenim Američkim Državama od 1987. do 1997. godine, sedam od dvadeset najčešćih su bili serovarijeteti prisutni pretežno kod gmizavaca *S. IV 48:G,Z51:-* (ranije poznata kao *S. Marina*), *S. Flint* (sada poznat kao *S. IV 50:Z4,Z23:-*), *S. Kintambo*, *S. Vassenaar* (sada poznata kao *S IV 50:G,Z51:-*), *S. Ealing*, *S. Carrau* i *S. Abaetetuba* (Olsen i sar. 2001).

Prema podacima iz literature podvrste i serovarijeteti *Salmonella enterica* poreklom od gmizavaca i vodozemaca koji mogu prouzrokovati oboljenja ljudi su (Kaufmann i sar. 1972, Duponte i sar. 1978, Onderka i sar. 1985, Sanya i sar. 1997, Woodward i sar. 1997):

- *S. enterica* supsp. *enterica* – serovarijeteti *S. Adelaide*, *S. Agioboo*, *S. Alachua*, *S. Anatum*, *S. Bareilly*, *S. Bovis*, *S. Bredeney*, *S. Carrau*, *S. Chameleon*, *S. Durham*, *S. Gaminara*, *S. Give*, *S. Harmelen*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Jangwani*, *S. Javiana*, *S. Kralendyk*, *S. Kintambo*, *S. Krefeld*, *S. Luciana*, *S. Madelia*, *S. Manhattan*, *S. Marina*, *S.*

Montevideo, *S. Morbificans*, *S. Mowanjum*, *S. Muenchen*, *S. New-Brunswick*, *S. Newport*, *S. Nima*, *S. Ohio*, *S. Oslo*, *S. Panama*, *S. Poona*, *S. Saint-Paul*, *S. Typhi phage type F*, *S. Typhimurium*, *S. Urbana*, *S. Weltevreden*,

- *S. enterica* subsp. *salamae*,
- *S. enterica* subsp. *arizonae*,
- *S. enterica* subsp. *houtenae*.

Imajući u vidu veliki broj slučajeva indirektnog prenošenja salmonela Centar za kontrolu zaraznih bolesti SAD preporučio je da se ne drže gmizavci kao kućni ljubimci u domaćinstvima sa decom mlađom od 5 godina, kao i da se gmizavci ne drže u školama. Zbog visoke prevalencije salmonela kod kornjača i guštera postoji realna opasnost od kontaminacije vodenih sistema, bara ili jezera, što predstavlja potencijalni rizik po zdravlje ljudi i potvrđeno je više slučajeva infekcija ljudi koje su nastali na ovaj način (Hoelzer i sar. 2011).

Rizik po zdravlje ljudi od salmoneloze nakon kontakta sa vodozemcima postoji, i u 30 država Sjedinjenih Američkih Država 2009. godine dokazana je epidemija prouzrokovana *S. Typhimurium* poreklom od patuljaste afričke žabice (*Hymenochirus boettgeri*) (CDC 2009). Kod epidemije ljudi u Misisipiju 2001. godine izazvane serotipom *S. Javiana* oboleli su imali kontakt sa žabama (Srikantiah i sar. 2002).

U Kolorado zoološkom vrtu 1996. godine zabeležena je infekcija 65 ljudi koji su bili blizu komodskog varana (CDC 1995). Zabeležene su infekcije odojčadi i dece *S. Kintambo* i *S. Nima* čiji su roditelji bili u kontaktu sa gušterom odnosno boom (CDC 1995; CDC 2003).

I u zemljama članicama Evropske unije sistematski se prikupljaju epidemiološki podaci o pojavi i raširenosti slučajeva salmoneloze ljudi za koje se smatra da su izvor infekcije bili gmizavci. U Evropskoj Uniji prevalencija *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca se značajno razlikuje između zemalja članica (Bertrand i sar. 2008). Tako je na primer u Švedskoj u periodu od 1990. do 2000. godine potvrđeno 339 slučajeva, što predstavlja 5% svih slučajeva salmoneloze ljudi, dok je u Ujedinjenom Kraljevstvu i u Holandiji 1% slučajeva salmoneloze ljudi direktno ili indirektno povezano sa gmizavcima.



Svake godine u zemljama članicama pojavljuje se sve veći broj slučajeva salmoneloze ljudi prouzrokovane *Salmonella enterica* poreklom od gmizavaca ili drugih egzotičnih ljubimaca, a koliki je broj ovih kućnih ljubimaca najbolje pokazuje podatak da je tokom 2007. godine uvezeno preko 500.000 gmizavaca samo preko aerodroma u Frankfurtu na Majni.

Tokom 2006. godine u 25 država članica Evropske unije zajedno sa Bugarskom, Rumunijom, Islandom, Lihtenštajnom i Norveškom prijavljeno je 160.649 slučaja salmoneloze ljudi (Bertrand i sar. 2008). Nakon poslatog upitnika i dobijenih odgovora uređivački tim Eurosurveillance ustanovio je sledeće slučajeve salmoneloze ljudi izazvane sojevima poreklom od gmizavaca:

- Infekciju praćenu septikemijom četiri meseca stare bebe u Belgiji izazvane *Salmonella enterica* serovar Pomona poreklom od kućnog ljubimca kornjače 2007. godine,
- Infekciju tri osobe u Belgiji u aprilu 2008. godine izazvanu *S. enterica* subspecies IIIa 41:z4,z23: -) poreklom od zmija,
- Tri slučaja u Finskoj između 2005. i 2008. godine prouzrokovane sojevima poreklom od zmija kućnih ljubimaca - *S. enterica* serovar Paratyphi B biovar Java 4,5,12:b:1,2, *S. enterica* serovar Morehead 30:i:1,5 i *S. enterica* subspecies diarizonae 47:-:-,
- Infekcija 6 članova porodice u Finskoj prouzrokovane sojem poreklom od kućnog ljubimca kornjače *S. enterica* serovar Braenderup 6,7:e,h:e,n,z15,
- Tri slučaja u Francuskoj, kod osam meseci, tri i četiri godine stare dece, izazvane multirezistentnim sojem *S. enterica* serovar Typhimurium, doveden u vezu sa kontaktom sa zmijom, iguanom i preko supe od kornjače,
- Nakon uvedene standardne procedure i ustanovljene infekcije dece *S. enterica* subsp. II–IV, sprovodi se epidemiološka analiza i utvrđuje izvor infekcije. Ukupno 31 slučaj u Nemačkoj u periodu od 2006. do 2008. godine – u velikoj većini deca mlađa od godinu dana, izvor infekcije zmije, iguane i gušteri, a između ostalih potvrđeni su i sledeći serovarijeteti:
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Apapa, 45:m,t:-
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Ago 30:z38:-
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Gaminara, 16:d:1,7

- *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Jangwani, 17:a:1,5
- *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Pomona 28:y:1,7
- *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Poona 13,22:z:1,6
- *Salmonella enterica* subspecies II, 35:g,m,s:-
- *Salmonella enterica* subspecies II, 50:z:z23
- *Salmonella enterica* subspecies II, 58:lz13,z28:z6
- *Salmonella enterica* subspecies IIIa, 41:z4,z23:-
- *Salmonella enterica* subspecies IIIb, 47:i:z53
- *Salmonella enterica* subspecies IIIb, 50:z:z23
- *Salmonella enterica* subspecies IIIb, 53:z10:-
- *Salmonella enterica* subspecies IIIb, 61:l,v:1,5,7
- *Salmonella enterica* subspecies IIIb, 61:z52:z53
- *Salmonella enterica* subspecies IV, 48:g,z51:- (ranije *S. Marina*)
- Irska najmanje 14 slučajeva, uglavnom deca, kontakt sa iguanama, gušterima, zmijama i kornjačama, između ostalih potvrđeni i sledeći serovarijeteti:
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Enteritidis PT21
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Infantis
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Florida
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Minnesota
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Monschau
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Pomona
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Stanley
  - *Salmonella enterica* subspecies I, serovar Thompson
  - *Salmonella enterica* subspecies IIIa (*arizonae*)
  - *Salmonella enterica* subspecies IIIb (*diarizonae*)

Iz svega navedenog se može zaključiti da su salmonele široko rasprostranjene kod gmizavaca i vodozemaca, a postoje brojni radovi u kojima su opisane infekcije ljudi sojevima salmonela poreklom od gmizavaca i vodozemaca.

Prema nama dostupnim informacijama, u Srbiji do sada nije ispitivano prisustvo i raširenost *Salmonella* kod gmizavaca i vodozemaca, kako onih slobodnih u prirodi, tako i onih držanih u

zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci. Jedini podaci koji se odnose na prisustvo *Salmonella* spp. kod gmizavaca u našoj zemlji potiču iz 1980. godine, kada su Savage i Baker otkrili salmonele u fecesu 62 od ukupno 163 ispitane kornjače (*Testudo* spp.), a koje su uvezene u Ujedinjeno kraljevstvo iz Jugoslavije, Rusije i Turske (Savage i Bakar, 1980).

Drugi rad u kome se pominje Jugoslavija su objavili Tauxe i saradnici 1985. godine, a koji se odnosio na tri slučaja salmoneloze ljudi povezanih sa kornjačama u Portoriku (Tauxe i sar. 1985). Nakon sprovedene epidemiološke analize utvrđen je izvor i način infekcije. Na farmi crvenouhих kornjača ustanovljeno je prisustvo *S. Pomona*, a kornjače sa farme su pored distribucije u prodavnice kućnih ljubimaca izvezene u Guam i Jugoslaviju.

Konvencija o međunarodnoj trgovini ugroženim vrstama divlje faune i flore - CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) je međunarodni sporazum između vlada zemalja članica, sačinjen 1973. godine na inicijativu International Union for Conservation of Nature (IUCN), a koji je Savezna Republika Jugoslavija ratifikovala 2001. godine („Službeni list SRJ – Međunarodni ugovori“ br. 11/2001). Sve vrste sa CITES listi su na režimu uvoznih CITES dozvola kod uvoza i kod izvoza, a izdavanje dozvola je deo nadležnosti Sektora za zaštitu prirode Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine. (Zakon o zaštiti životne sredine, Sl. glasnik RS, br. 135/2004, 36/2009, 36/2009 i 72/2009). Unutar Republike Srbije za prodaju, kupovinu, podnošenje ponude za kupovinu, sticanje u komercijalne svrhe, izlaganje javnosti radi sticanja dobiti, korišćenje u svrhu sticanja dobiti, držanje radi prodaje, nuđenje na prodaju, prevoz radi prodaje, najam, razmena i bilo koji drugi vid promene vlasništva primeraka ugroženih vrsta, potrebno je pribavljanje potvrde za trgovinu (Pravilniku o prekograničnom prometu i trgovini zaštićenim vrstama, Službeni glasnik RS br. 99/09 i 6/14).

Prema članu 18. Zakona o dobrobiti životinja, objavljenog u Službenom glasniku RS br.41/2009, životinje se mogu držati, uzgajati i stavlјati u promet u proizvodne svrhe u objektima koji ispunjavaju uslove za dobrobit životinja u pogledu prostora za životinje, prostorija i opreme. Objekti za uzgajanje i stavlјanje za promet moraju biti upisani u Registar objekata koji vodi Ministarstvo poljoprivrede, u skladu sa Zakonom o veterinarstvu ("Sl. glasnik RS", br. 91/2005, 30/2010 i 93/2012).

Prema članu 58. Zakona o dobrobiti životinja, objavljenog u Službenom glasniku RS broj 41/2009, držanje i reprodukcija divljih i egzotičnih životinja kao kućnih ljubimaca može se obavljati samo na osnovu rešenja o odobrenju držanja i reprodukcije divljih i egzotičnih životinja kao kućnih ljubimaca, koje donosi ministar poljoprivrede, na osnovu prethodno pribavljene saglasnosti ministra nadležnog za poslove životne sredine. Životinjama se mora obezbediti:

- 1) prostor koji zadovoljava njihove potrebe u pogledu kretanja i fizičke aktivnosti;
- 2) prostor koji u zavisnosti od vrste omogućava penjanje, kopanje, odmor i sakrivanje, odnosno kupanje i ronjenje;
- 3) kontakt sa životinjama iste vrste, ako je to svojstveno vrsti;
- 4) odgovarajući klimatski uslovi, u skladu sa potrebama vrste;
- 5) drugi uslovi koji odgovaraju vrsti, rasi, polu, starosti, fizičkim i biološkim osobinama, osobinama u ponašanju i zdravstvenom stanju životinja.

Pravilnik o uslovima koje moraju da ispunjavaju odgajivačnice za životinje objavljen je u Službenom glasniku Republike Srbije br. 14/12 i koji u Prilogu 1. tačka 7. propisuje bliže uslova za gmizavce i vodozemce:

- 1) Gmizavci i vodozemci moraju da se drže u odgovarajućim terarijumima izrađenim od stakla ili posebne plastike i nerđajuće mreže, čime se sprečava beg životinja.
- 2) Veličina terarijuma, posebno za zmije i guštere, određuje se tako da zbir jedne dužine i širine terarijuma odgovara maksimalnoj dužini odrasle životinje.
- 3) Svakoj životinji mora da se obezbedi prostor takve veličine u kojem može da legne, odnosno ustane u svojoj prirodnoj poziciji, da se nesmetano okrene, kreće, hrani, sakriva i neguje.
- 4) Gmizavcima i vodozemcima moraju da se obezbede uslovi i mikroklima u skladu sa staništem iz koga potiču, i to:
  - za tropska staništa treba da se obezbedi visoka vlaga i temperatura,
  - za pustinjska staništa treba da se obezbedi visoka temperatura i niska vlažnost,
  - za umerena staništa treba da se obezbedi dodatno osvetljenje ako se životinje drže u zatvorenim prostorima.

- 5) Gmizavcima i vodozemcima kojima je prirodno stanište u vodi i na kopnu, u terarijumu treba da bude obezbeđeno dovoljno vode, kako bi im se omogućilo nesmetano plivanje, kao i lako dostupna suva površina na koju mogu da izađu.

Iako postoji zakonska osnova držanja i reprodukcije divljih i egzotičnih životinja, na web stranici Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine <http://www.vet.minpolj.gov.rs/sr/registri> u Registru odgajivačnica u junu 2016. godine ne nalazi se ni jedan odgajivač gmizavaca i vodozemaca.

## **2.6. Rezistencija *Salmonella spp.* prema antimikrobnim sredstvima**

Povećanje rezistencije na antibiotike kod bakterija na globalnom nivou postaje sve veći problem, sa ozbiljnim posledicama, s obzirom da je na raspolaganju sve manji broj antibiotika koji se može koristiti u terapiji infektivnih oboljenja.

Kada su antimikrobna sredstva u pitanju, usled relativno retke pojave rezistencije salmonela se dugo smatrala antibiotski "predvidivom" bakterijom, da bi se u poslednjih 20-25 godina drastično promenila situacija. Povećao se broj izolata *Salmonella* koji su pokazivali rezistenciju na veći broj antibiotika, pa i antibiotike prvog izbora u terapiji salmoneloze kod ljudi. Pojava multiple rezistencije kod salmonela rezultat je neracionalne i često prekomerne upotrebe odnosno zloupotrebe antibiotika, kako u veterinarskoj, tako i humanoj medicini. Multipla rezistencija uglavnom predstavlja stečenu otpornost koja se prenosi genima rezistentnosti, a proističe iz mobilnih genetičkih elemenata uključujući i plazmide.

Visoka prevalencija rezistentnih sojeva bakterija prema antimikrobnim sredstvima dovela je do uspostavljanja kako na globalnom svetskom tako i evropskom nivou sistema aktivnog monitoringa. Tokom 2008. godine, EU referentna laboratorija za rezistenciju mikroorganizama, Nacionalni institut za hranu Danske, prikupio je podatke od referentnih laboratorija zemalja članica EU o prevalenciji rezistencije prema hinolonima kod *Salmonella spp.* i *Escherichia coli*. U Nemačkoj su obrađeni podaci za 40.000 izolata *Salmonella* i ustanovljena je rezistencija kod 113 sojeva prema nalidiksinskoj kiselini i ciprofloksacinu. Interesantno je da je od ukupnog broja rezistentnih sojeva salmonela prema hinolonima čak

14 (12,4%) bilo poreklom od gmizavaca (Guerra i sar. 2010). Izolati su poticali uglavnom od guštera, izuzev jednog od zmija i dva od kornjača, a od serovarijeteta bili su zastupljeni *S. Urbana*, *S. Litchfield*, *S. Pomona*, *S. subsp. II 58: I,z13,z28: z6*, *S. subsp. IV 16: z4, z32: -* i *S. subsp. IV 48: g,z51 : -*. Dati rezistentni izolati salmonela imali su gen rezistencije prema hinolonima koji je prenosiv plazmidom (plasmid-mediated quinolone resistance PMQR), i to najčešće *qnrB19* gen.

Ne samo ovaj nego i drugi radovi ukazuju na pojavu rezistencije prema antimikrobnim sredstvima kod izolata *Salmonella* spp. poreklom od gmizavaca i vodozemaca (Chen i sar. 2010). Tako su Chen i saradnici ustanovili prisustvo *Salmonella* spp. kod 24,3% ispitanih kornjača, 62,8% guštera i 69,7% zmija. Ukupno je identifikovano 44 različita serovarijeteta *Salmonella*, a ispitivanjem osetljivosti 347 izolata, kod 6,9% utvrđena je rezistencija prema 4 ili više antibiotika, dok je najviši procenat rezistencije bio prema streptomycinu 14,7% i tetraciklinu 9,2%. Viši nivo rezistencije je utvrđen kod izolata poreklom od kornjača uključujući i pojavu rezistencije prema nalidiksinskoj kiselini kod 9,2 % i cefalotinu kod 7,3% datih sojeva.

Sagledavajući činjenicu da se gmizavci sve češće čuvaju kao kućni ljubimci i visoku prevalenciju salmonela kod njih, postoji rizik ne samo infekcija ljudi nego i prenošenja gena rezistencije od bakterija poreklom od gmizavaca u bakterije prisutne kod ljudi (Frye i Jackson, 2013).

Ebani i saradnici objavili su rad 2005. godine kojim su obuhvatili 73 soja *Salmonella* izolovanih od gmizavaca držanih u velikom prodajnom centru kućnih ljubimaca u Italiji (Ebani i sar. 2005). Utvrdili su čestu multiplu rezistenciju i izuzev osetljivosti koju su ispoljili svi izolati prema hloramfenikolu, tetraciklinima i enrofloksacinu, kod 27,40% ispitanih sojeva *Salmonella* utvrđena je rezistencija prema ampicilinu, 31,51% prema amoksicilinu, 32,88% prema gentamicinu, 35,61% prema sulfisoksazolu i 94,52% prema eritromicinu.

S druge strane, postoji veći broj radova u kojima ispitivanjem osetljivosti sojeva *Salmonella* izolovanih od gmizavaca i vodozemaca nije ustanovljena ili je ustanovljena u niskom procentu rezistencija prema antimikrobnim sredstvima.

Romero i saradnici su kod 12 od 15 ispitanih kameleona (*Chamaeleo calyptratus*), gajenih kao kućni ljubimci u Slovačkoj, ustanovili prisustvo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i subsp. *houtenae* i to serovarijeteta *S. Ago*, *S. Blijdorp*, *S. Tennessee* i *S.IV 45: g,z51* : - (Romero i sar. 2015). Ispitivanjem osetljivosti prema antimikrobnim sredstvima: ampicilinu, amoksicilinu sa klavulanskom kiselinom, cefalotinu, ceftazidiminu, ciprofloksacinu, hloramfenikolu, gentamicinu, nalidiksinskoj kiselini, sulfapreparatima, streptomycinu i tetraciklinu, izuzev jednog izolata rezistentnog prema streptomycinu i dva izolata sa intermedijalnim odnosom prema streptomycinu, svi izolati su bili osetljivi na ispitivane antibiotike i hemoterapeutike.

Ispitivanje osetljivosti izolovanih bakterija od zmija slobodnih u prirodi je retko izvođeno i publikovano. Izolati *Salmonella* poreklom od gmizavaca se u odnosu na izolate od domaćih životinja odlikuju znatno nižom prevalencijom rezistencije prema antimikrobnim sredstvima (Zajac i sar. 2013). Izuzev rezistencije prema streptomycinu uobičajeno su svi izolati salmonela od zmija osetljivi prema svim drugim antibioticima i hemoterapeuticima (Smith i sar. 2012; Kuroki i sar. 2013; Zajac i sar. 2013; Schmidt i sar. 2014).

### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je da se ispita prisustvo serovarijeteta *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca u Republici Srbiji, da se ustanovi postojanje rezistencije prema antimikrobnim sredstvima kod izolata *Salmonella* spp. i da se proceni rizik od infekcija ljudi *Salmonella* spp. poreklom od gmizavaca i vodozemaca.

Istraživanjem se utvrđivalo pored prisustva i raširenost serovarijeteta *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca, kao i postojanje rezistencije i gena rezistencije prema antimikrobnim sredstvima kod izolata *Salmonella* spp., a što je omogućilo procenu rizika po zdravlje ljudi od pojave salmoneloze poreklom od gmizavaca i vodozemaca odnosno prenošenja i širenja rezistencije.

Radi ostvarivanja cilja istraživanja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Uzimanje kloakalnih i orofaringealnih briseva kao i fecesa od gmizavaca i vodozemaca slobodnih u prirodi, iz zoološkog vrta i držanih kao kućni ljubimci.
2. Izolacija, identifikacija i serotipizacija sojeva *Salmonella* spp. izolovanih od gmizavaca i vodozemaca.
3. Ispitivanje osetljivosti izolata *Salmonella* spp. prema antimikrobnim sredstvima.
4. Detekcija gena rezistencije odnosno mutacija kod sojeva *Salmonella* spp. izolovanih iz vodozemaca i gmizavaca.



## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1 Materijal

U toku istraživanja materijal su predstavljali kloakalni, orofaringealni i brisevi kože, kao i feces kornjača, guštera, zmija i žaba. Uzorci su prikupljeni od gmizavaca i vodozemaca slobodnih u prirodi, iz zoološkog vrta i držanih kao kućni ljubimci.

### 4.2 Metode

#### 4.2.1. Izolacija i identifikacija *Salmonella*

Izolacija i identifikacija *Salmonella* spp. izvođena je prema standardu SRPS EN ISO 6579:2008, Prilogu D. Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp. uz upotrebu propisanih hranljivih podloga puferizovane peptonske vode, modifikovanog polutečnog Rapapport Vasiliadis agara kao i Rapapport Vasiliadis bujona, ksiloza lizin dezoksiholat (XLD) agara, MacConkey agara, Hektoen enteric agara i hromogene podloge chromID™ *Salmonella* Agar (SM2) proizvođača Biomerieux.

Postupak je sproveden u nekoliko koraka:

1. Nakon uzimanja fecesa ili brisa isti su u stavljeni u odnosu 1: 10 u puferizovanu peptonsku vodu (PPV) i inkubirani u termostatu na temperaturi od  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  u trajanju od  $18 \pm 2$  sata.
2. Nakon toga preneto je 0,1 ml PPV u 10 ml Rappaport-Vassiliadis bujon, koji je zatim inkubiran u termostatu na temperaturi od  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  u trajanju od  $24 \pm 3$  sata.

Uzorci su pored zasejavanja u Rappaport-Vassiliadis bujon, inokulisani u količini od 0,1 ml - 3 kapi na polutečni Rappaport-Vassiliadis agar i inkubirani na temperaturi od  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  u trajanju od  $24 \pm 3$  sata.

3. Zatim je materijal presejavan iz Rappaport-Vassiliadis bujona/polutečnog Rappaport-Vassiliadis agara na ksiloza lizin deoksiholatni agar (XLD agar) i MacConkey agar i inkubiran na temperaturi od  $37\text{ }^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$  u trajanju od  $24 \pm 3$  sata. Po potrebi su korišćene i druge

diferencijelne podloge za *Salmonella* vrste - Hektoen enteric agar i chromID™ *Salmonella* Agar (SM2).

Tokom identifikacije izolata ispitivane su biohemijske osobine i za tu svrhu koristile su se podloga sa ureom po Christensenu, podloga sa citratom po Simonsu, podloga za Voges Proskauer i metil crvenu reakciju, podloga za fenilalanin, podloga za indol, kao i ONPG diskovi za dokazivanje  $\beta$  galaktozidaze. Tokom identifikacije roda, vrste i podvrste *Salmonella* ispitivane su i oksidaza reakcija, katalaza reakcija, sposobnost produkcije H<sub>2</sub>S, razgradnja lizina kao i fermentacije laktoze, dulcitol, sorbitola i tartarata. Po potrebi korišćen je komercijalni identifikacioni test BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit, proizvođača Becton Dickinson iz SAD.

Pored primene konvencionalnih mikrobioloških ispitivanja, kao i komercijalnog testa BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID, određeni broj suspektnih izolata *Salmonella* spp poslat je u Gradski zavod za javno zdravlje Beograd gde je obavljena determinacija sojeva MALDI-TOF masenom spektrometrijom uz upotrebu Vitek MS aparata, proizvođača bioMérieux iz Francuske.

Izvođenje MALDI-TOF masene spektrometrije vršeno je na taj način što se, nakon dobijanja čiste kulture, na pločicu proizvođača bioMérieux iz Francuske nanosila mala količina ispitivane kolonije, koja se zatim prelivala sa 1  $\mu$ l matriks solucije -  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (C.H.C.A., bioMérieux, Francuska). Nakon sušenja na vazduhu pločica se stavljala u aparat VITEK® MS koji je bio povezan sa automatskom bazom podataka masenih spektara MYLA® software2 (bioMérieux, Francuska). U aparatu VITEK® MS laser bombarduje mešavinu bakterija i matriksa, pri čemu dolazi do jonizacije proteina i njihovog razdvajanja u električnom polju. Ovi proteini se usmeravaju u vakuum cev i razdvajaju se prema odnosu mase i naboja, a zatim se vrši detekcija masenih spektara. Ustanovljeni maseni profil se analizira i upoređuje se spektrima mikroorganizama i vrši identifikacija.

Serološka tipizacija izolata *Salmonella* spp. izvođena prema standardu CEN ISO/TR 6579-3:2014, Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i tipizaciju *Salmonella* — Deo 3: Uputstvo za tipizaciju *Salmonella* spp.. Tokom serološke tipizacije *Salmonella* spp. korišćeni su specifični polivalentni i monovalentni antiserumi salmonela kako grupni tako i

specifični za O, H i Vi antigene, proizvođača Bio-Rad i Becton Dickinson, SAD. Za konačno utvrđivanje serovarijeteta izolati *Salmonella* su prosleđeni u Institut za javno zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanović Batut”, Beograd, gde je izvršena serotipizacija izolata uz upotrebu antiseruma proizvedenih u IZJZ Srbije i Statens Serum Institut iz Danske.

#### **4.2.2. Ispitivanje osetljivosti prema antimikrobnim sredstvima sojeva *Salmonella* primenom disk difuzione metode**

Ispitivanje osetljivosti prema antimikrobnim sredstvima sojeva *Salmonella* izolovanih od gmizavaca i vodozemaca izvođeno je disk difuzionom metodom prema CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute M02-A11 standardu, a interpretacija dobijenih rezultata vršena je prema referentnom dokumentu Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI M100-S24.

Tokom izvođenja disk difuzione metode korišćen je Mueller Hinton agar i sledeći antibiogram diskovi: ampicilin (10 µg), cefotaksim (30µg), hloramfenikol (30µg), ciprofloksacin (5µg), gentamicin (10µg), nalidiksinska kiselina (30µg), tetraciklini (30µg) i trimetoprim sa sulfametoksazolom (1.25+23.75µg), (BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Discs, Becton Dickinson, SAD).

Ploče su inkubirane 24 h na temperaturi od 37°C u aerobnim uslovima u termostatu (Sutjeska, Beograd, Srbija). Rezultati su dobijeni merenjem prečnika zona inhibicije a interpretativne kategorije su određene prema relevantnom standardu (CLSI M100, 2014).

#### **4.2.3. Ispitivanje osetljivosti prema antimikrobnim sredstvima sojeva *Salmonella* utvrđivanjem inhibitorne koncentracije primenom mikrodilucione metode u bujonu**

Za ispitivanje osetljivosti prema antimikrobnim sredstvima sojeva *Salmonella* izolovanih od gmizavaca i vodozemaca korišćena je mikrodiluciona metoda u bujonu prema standardu M07-A9 (CLSI, 2012). U sterilne mikrotitracione ploče sa 96 bunarčića (Spektar Čačak, Srbija) uliveno je po 100µl Mueller Hinton bujona, izuzev prve kolone. Antibiotici su rastvoreni odgovarajućim rastvaračima prema standardu CLSI (CLSI, 2014) i pripremljeni za rad razblaživanjem do koncentracije od 64 µg/ml u Mueller Hinton II bujonu, sa izuzetkom sulfametoksazola čija je koncentracija iznosila 1188 µg/ml. Mikrotitracione ploče su konačno

pripremljene za rad dodavanjem po 100 µl rastvora aktivne supstance i u prvu i drugu kolonu i dvostrukim razblaživanjem u preostale kolone. Koncentracija antibiotika se kretala u 12 bazenčića mikrotitracione ploče od 64 µg/ml do 0,03 µg/ml, izuzev kombinacije sulfametoksazola i trimetoprima kod kojih je iznosila od 1188 µg/ml /64 µg/ml do 0,58 µg/ml/ 0,03 µg/ml.

Bakterijski inokulum je dobijen prema standardu M7-A7 (CLSI, 2006) suspendovanjem kolonija sa čvrste podloge u sterilni fiziološki rastvor do koncentracije  $1-2 \times 10^8$  bakterija/ml (McFarland 0,5) i razblaživanjem 1:10 do  $1-2 \times 10^7$  bakterija/ml. Po 5 µl inokuluma zasejano je u svaki bazenčić, što daje finalnu koncentraciju od  $4-5 \times 10^5$  bakterija/ml, tj.  $4-5 \times 10^4$  bakterija/bazenčiću. Ploče su inkubirane 24 h na temperaturi od 37 °C pri aerobnim uslovima u termostatu (Sutjeska, Beograd, Srbija). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) predstavlja najnižu koncentraciju pri kojoj nije bilo vidljivog porasta bakterija.

#### **4.2.4. Ispitivanje pojava mutacija odnosno prisustva gena rezistencije kod rezistentnih sojeva *Salmonella***

U slučaju pojave rezistencije prema antimikrobnim sredstvima, ispitaće se prisustvo mutacija odnosno određenih gena rezistencije. Tako na primer u slučaju pojave rezistencije prema fluorohinolonima ispitaće se pojava mutacija na topoizomerazi *gyrA* i *parC* odnosno prisustvo gena rezistencije *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6=)-Ib-cr* ili *qepA* koji se mogu steći odnosno preneti plazmidima. Primenom PCR tehnike i sekvenciranja genoma prema metodama opisanim u radu Skova i saradnika iz 2015. godine može se utvrditi pojava mutacija odnosno prisustvo gena rezistencije i to upotrebom sledećih prajmera:

- CTATGCGATGTCAGAGCTGG i TAACAGCAGCTCGGCGTATT za *parC*
- ATGAGCGACCTTGCGAGAGAAATTACACCG i TTCCATCAGCCCTTCAATGCTGATGTCTTC za *gyrA*
- GGATGCCAGTTTCGAGGA i TGCCAGGCACAGATCTTG za *qnrA* ,
- GGMATHGAAATTCGCCACTG i TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA za *qnrB*
- CGAGATCAATTTACGGGAATA i AACAAGCTGAAGCGCCTG za *qnrD*
- TCGACGTGCTAACTTGCG i GATCTAAACCGTCGAGTTCGG za *qnrS*
- TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA i CTCGAATGCCTGGCGTGTTT za *aac(6=)-Ib-cr*

- TGGTCTACGCCATGGACCTCA i TGAATTCGGACACCGTCTCCG za qepA.

#### **4.2.5. Statistička obrada podataka**

U analizi dobijenih rezultata korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćeni su apsolutni i relativni brojevi (%), a ovi pokazatelji su omogućili opisivanje dobijenih rezultata i njihovo tumačenje. Dalja statistička analiza odvijala se u zavisnosti da li su analizirani podaci normalno distribuirani ili ne. Testiranje na normalnost izvedeno je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa, a zatim su primenjivani  $\chi^2$  test i Kappa statistička analiza. Signifikantnost razlika ustanovljena je na nivou značajnosti od 5%. Statistička obrada podataka izvođena je primenom softverskog paketa Statistica verzija 8.0 i GraphPad Prism verzija 5.0.

## 5. REZULTATI

U periodu od aprila 2012. do aprila 2016. godine uzeti su uzorci od ukupno 317 gmizavaca i vodozemaca, od 42 različite vrste životinja. Uzorci su uzeti od 16 vodozemaca, 152 kornjače, 76 guštera i 73 zmiје, od koji su 73 jedinke poticale iz prirode, 156 jedinki iz zoološkog vrta i 88 jedinki držanih kao kućni ljubimci. U tabeli broj 3. prikazanu su prikupljeni uzorci.

Tabela broj 3. Prikupljeni uzorci gmizavaca i vodozemaca

R.B.	Vrsta životinje	Lokalizacija jedinki	Broj jedinki	Vrsta i broj uzoraka
1.	Velika zelena žaba <i>Pelophylax ridibundus</i>	Slobodna u prirodi	8	- Cela životinja – punoglavac – 4 uzorka - Kloakalni bris – 4 uzorka - Bris kože - 4 uzorka - Orofaringealni bris -2 uzorka
2.	Šumska krastava žaba <i>Bufo bufo</i>	Slobodna u prirodi	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak - Bris kože -1 uzorak - Orofaringealni bris -1 uzorak
3.	Žutotrba ognjena žaba <i>Bambina variegata</i>	Slobodna u prirodi	2	- Kloakalni bris – 1 uzorak - Bris kože -1 uzorak - Orofaringealni bris -1 uzorak
4.	Zelena krastača <i>Bufo (Pseudolepidae) viridis</i>	Slobodna u prirodi	2	- Kloakalni bris – 2 uzorka - Orofaringealni bris -2 uzorka
5.	Žaba travnjača <i>Rana temporaria</i>	Slobodna u prirodi	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak - Bris kože -1 uzorak - Orofaringealni bris -1 uzorak
6.	Šareni daždevnjak <i>Salamandra salamandra</i>	Slobodna u prirodi	2	- Cela životinja – punoglavac – 2 uzorka
7.	Šumska kornjača <i>Testudo hermanni</i>	Slobodna u prirodi	25	- Kloakalni bris – 20 uzoraka - Orofaringealni bris -6 uzoraka - Feces – 5 uzoraka
8.	Šumski gušter <i>Darevskia praticola</i>	Slobodna u prirodi	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak - Orofaringealni bris -1 uzorak
9.	Kratkonogi gušter <i>Ablepharus kitaibelii</i>	Slobodna u prirodi	2	- Kloakalni bris – 2 uzorka
10.	Slepić gušter <i>Anguis fragilis</i>	Slobodna u prirodi	2	- Kloakalni bris – 1 uzorak - Orofaringealni bris -1 uzorak

				- Feces – 1 uzorak
11.	Zidni gušter <i>Podarcis muralis</i>	Slobodna u prirodi	1	- Orofaringealni bris -1 uzorak - Feces – 1 uzorak
12.	Zelembać gušter <i>Lacerta viridis</i>	Slobodna u prirodi	5	- Kloakalni bris – 4 uzorka - Orofaringealni bris – 5 uzoraka
13.	Smuk <i>Zamenis longissimus</i>	Slobodna u prirodi	3	- Kloakalni bris – 3 uzorka - Orofaringealni bris -1 uzorak - Feces – 1 uzorak
14.	Ribarica <i>Natrix tessellata</i>	Slobodna u prirodi	6	- Kloakalni bris – 5 uzoraka - Orofaringealni bris – 6 uzoraka - Feces – 1 uzorak
15.	Belouška <i>Natrix natrix</i>	Slobodna u prirodi	1	- Orofaringealni bris -1 uzorak - Feces – 1 uzorak
16.	Poskok <i>Vipera ammodytes</i>	Slobodna u prirodi	11	- Kloakalni bris – 11 uzoraka - Orofaringealni bris – 11 uzoraka
17.	Loptasti – kraljevski piton <i>Python regius</i>	Zoološki vrt	6	- Kloakalni bris – 5 uzoraka - Feces – 3 uzorka
18.	Kukuruzni smuk <i>Pantherophis guttatus</i>	Zoološki vrt	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak
19.	Brazilska dugina boa <i>Epicrates cenchria cenchria</i>	Zoološki vrt	3	- Kloakalni bris – 3 uzorka
20.	Iguana <i>Iguana iguana</i>	Zoološki vrt	11	- Kloakalni bris – 8 uzoraka - Feces – 3 uzorka
21.	Jemenski kameleon <i>Chamaeleo calyptrotus</i>	Zoološki vrt	2	- Kloakalni bris – 2 uzorka
22.	Crvenouha kornjača <i>Trachemys scripta elegans</i>	Zoološki vrt	17	- Kloakalni bris – 17 uzoraka
23.	Šumska kornjača <i>Testudo hermanni</i>	Zoološki vrt	27	- Kloakalni bris – 27 uzoraka
24.	Barska kornjača <i>Emys orbicularis</i>	Zoološki vrt	64	- Kloakalni bris – 64 uzoraka
25.	Leopard zvezdasta kornjača <i>Geochelone elegans</i>	Zoološki vrt	4	- Kloakalni bris – 4 uzorka - Feces – 1 uzorak
26.	Bradata agama <i>Pogona vitticeps</i>	Zoološki vrt	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak
27.	Varan <i>Varanus komodoensis</i>	Zoološki vrt	1	- Feces – 1 uzorak
28.	Burmanski piton <i>Python bivittatus</i>	Zoološki vrt	1	- Feces – 1 uzorak
29.	Boa <i>Boa constrictor</i>	Zoološki vrt	3	- Kloakalni bris – 3 uzorka - Feces – 3 uzorka

30.	Cuvierov patuljasti kajman <i>Paleosuchus palpebrosus</i>	Zoološki vrt	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak
31.	Kalifornijska kraljevska zmija <i>Lampropeltis getula californiae</i>	Zoološki vrt	2	- Kloakalni bris – 2 uzorka
32.	Kolumbijska dugina boa <i>Epicrates cenchria maurus</i>	Zoološki vrt	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak
33.	Bull – goveđa zmija <i>Pituophis catenifer sayi</i>	Zoološki vrt	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak
34.	Leopard gekon <i>Eublepharis macularius</i>	Zoološki vrt	1	- Feces – 1 uzorak
35.	Sudanski oklopni pločasti gušter <i>Gerrhosaurus major</i>	Zoološki vrt	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak - Feces – 1 uzorak
36.	Žutouha kornjača <i>Trachemys scripta scripta</i>	Zoološki vrt	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak
37.	Afrička kornjača <i>Geochelone pardalis</i>	Zoološki vrt	2	- Kloakalni bris – 2 uzorka - Feces – 1 uzorak
38.	Grčka kornjača <i>Testudo graeca</i>	Zoološki vrt	1	- Kloakalni bris – 1 uzorak
39.	Marginata kornjača <i>Testudo marginata</i>	Zoološki vrt	4	- Kloakalni bris – 4 uzorka
40.	Bradata agama <i>Pogona vitticeps</i>	Kućni ljubimci	10	- Feces – 9 uzoraka - Kloakalni bris – 1 uzorak
41.	Loptasti – kraljevski piton <i>Python regius</i>	Kućni ljubimci	19	- Feces – 16 uzoraka - Kloakalni bris – 3 uzorka
42.	Mlečna zmija <i>Lampropeltis triangulum</i>	Kućni ljubimci	5	- Feces – 5 uzoraka
43.	Mandarinska zmija <i>Euprepiophis mandarinus</i>	Kućni ljubimci	1	- Feces – 1 uzorak
44.	Kukuruzni smuk <i>Pantherophis guttatus</i>	Kućni ljubimci	4	- Feces – 4 uzorka
45.	Gecko – gušter sa debelim repom <i>Hemitheconyx caudicinctus</i>	Kućni ljubimci	7	- Feces – 6 uzoraka - Kloakalni bris – 1 uzorak
46.	Leopard gekon <i>Eublepharis macularius</i>	Kućni ljubimci	30	- Feces – 27 uzoraka - Kloakalni bris – 3 uzorka
47.	Hognose zmija <i>Heterodon nasicus</i>	Kućni ljubimci	3	- Feces – 3 uzorka
48.	Boa <i>Boa constrictor</i>	Kućni ljubimci	2	- Kloakalni bris – 2 uzorka
49.	Crvenouha kornjača <i>Trachemys scripta elegans</i>	Kućni ljubimci	7	- Kloakalni bris – 7 uzoraka



Uzimanje uzoraka je prikazano na sledećim fotografijama.

Slika broj 1. Uzimanja kloakalnog brisa pitona



Slika broj 2. Uzimanja kloakalnog brisa boe



Slika broj 3. Uzimanja kloakalnog brisa iguane



Slika broj 4. Uzimanja kloakalnog brisa kameleona



Slika broj 5. Uzimanja kloakalnog brisa šumske kornjače



Slika broj 6. Uzimanje kloakalnog brisa crvenouhe kornjače



Slika broj 7. Uzimanja kloakalnog brisa barske kornjače



Prilikom izolacije i identifikacije sojeva salmonela kod gmizavaca i vodozemaca primenjavana je horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp. uz upotrebu propisanih hranljivih podloga puferizovane peptonske vode, Rapaport Vasiliadis bujona, modifikovanog polutečnog Rapaport Vasiliadis agara, ksiloza lizin dezoksiholat (XLD) agara, MacConkey agara, Hektoen enteric agara i hromogene podloge chromID™ *Salmonella* Agar (SM2).

Identifikacija roda, vrsta i podvrsta *Salmonella* je vršena primenom prethodno navedenih konvencionalnih biohemijskih reakcija, primenom test BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit Becton Dickinson kao i dodatno 25 izolata primenom aparata Vitek MS (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska) koji se zasniva na MALDI-TOF MS tehnologiji. MALDI-TOF masena spektrometrija je izvršena u Gradskom zavodu za javno zdravlje Beograd.

Tokom 2012. i 2013. godine prilikom uzimanja uzoraka kod većeg broja gmizavaca i vodozemaca slobodnih u prirodi uzimani su istovremeno kloakalni i orofaringealni brisevi odnosno orofaringealni bris i feces. Ukupno je paralelno uzeto 38 kloakalnih i orofaringealnih briseva odnosno 4 orofaringealna brisa i fecesa koji su zatim u laboratoriji ispitani kao posebni uzorci.

Iz paralelno ispitanih 38 kloakalnih i orofaringealnih briseva izolovano je ukupno 13 sojeva *Salmonella enterica* i to 2 iz oba brisa, 10 samo iz kloakalnog i 1 iz orofaringealnog, što je i prikazano u tabeli broj 5.

Tabela broj 4. Rezultati pozitivnih i negativnih izolacija *Salmonella enterica* iz paralelnih kloakalnih i orofaringealnih briseva gmizavaca i vodozemaca

		Orofaringealni brisevi		
		Pozitivna izolacija	Negativna izolacija	Ukupno
<b>Kloakalni brisevi</b>	Pozitivna izolacija	2	10	12
	Negativna izolacija	1	25	26
	Ukupno	3	35	38

Primenom Kappa statističke analize utvrđeno je da nema podudarnosti dobijenih rezultata izolacije *Salmonella enterica* iz paralelnih kloakalnih i orofaringealnih briseva gmizavaca i vodozemaca, a vrednost Kappa je iznosila  $k=0,16$ .

Iz 4 orofaringealna brisa i fecesa paralelno ispitanih izolovan je 1 soj *Salmonella enterica* iz uzorka fecesa.

Početakom 2016. godine paralelno je uzorkovano i ispitano 20 kloakalnih briseva i fecesa od gmizavaca – zmija, guštera i kornjača, od kojih je ukupno izolovano 5 sojeva *Salmonella enterica*, i to 2 soja i iz kloakalnih briseva i fecesa, a 3 soja samo iz fecesa, što je i prikazano u tabeli broj 6.

Tabela broj 5. Rezultati pozitivnih i negativnih izolacija *Salmonella enterica* iz paralelnih kloakalnih briseva i fecesa gmizavaca

		Feces		
		Pozitivna Izolacija	Negativna izolacija	Ukupno
Kloakalni brisevi	Pozitivna izolacija	2	0	2
	Negativna izolacija	3	15	18
	Ukupno	5	15	20

Primenom Kappa statističke analize utvrđena je slaba podudarnost dobijenih rezultata izolacije *Salmonella enterica* iz paralelnih kloakalnih briseva i fecesa gmizavaca, a Kappa vrednost je iznosila  $k=0,5$ .

Slika broj 8 . Izgled izolovanih sojeva na deferencijalnim i hromogenoj podlozi

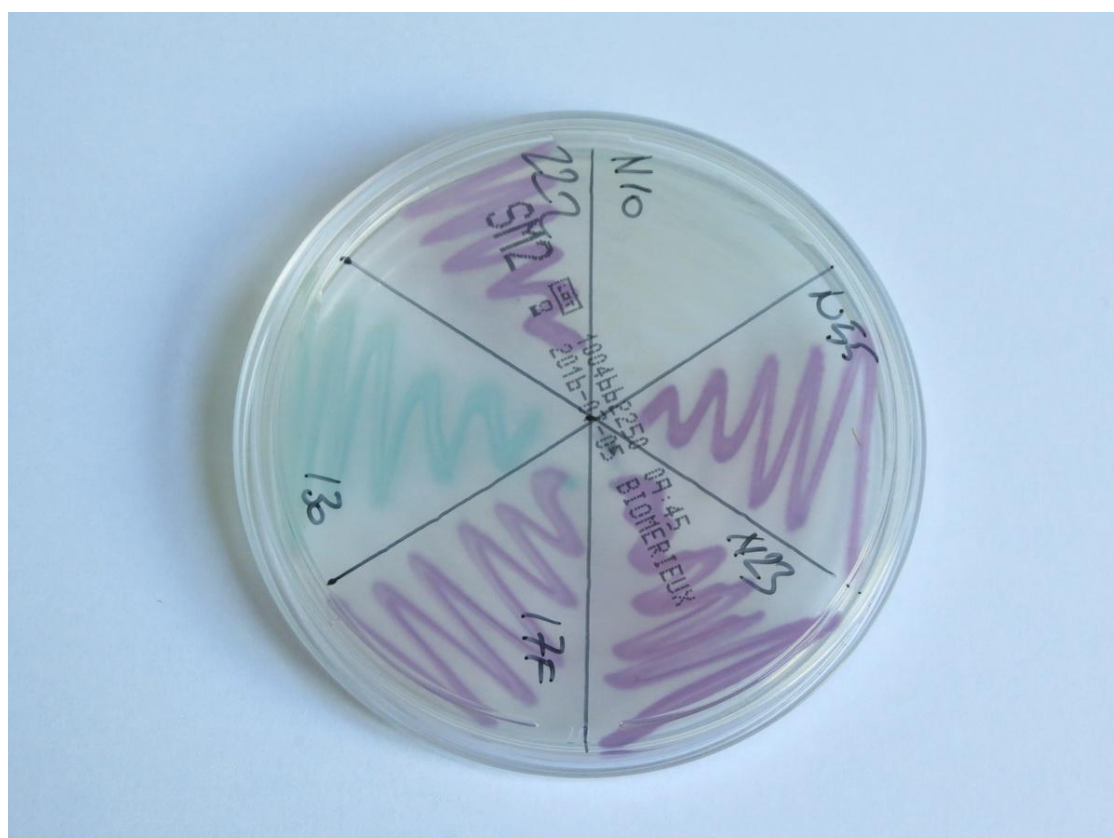
- *Salmonella* ID SM2, MacConkey Agar, XLD agar, Hektoen enteric agar



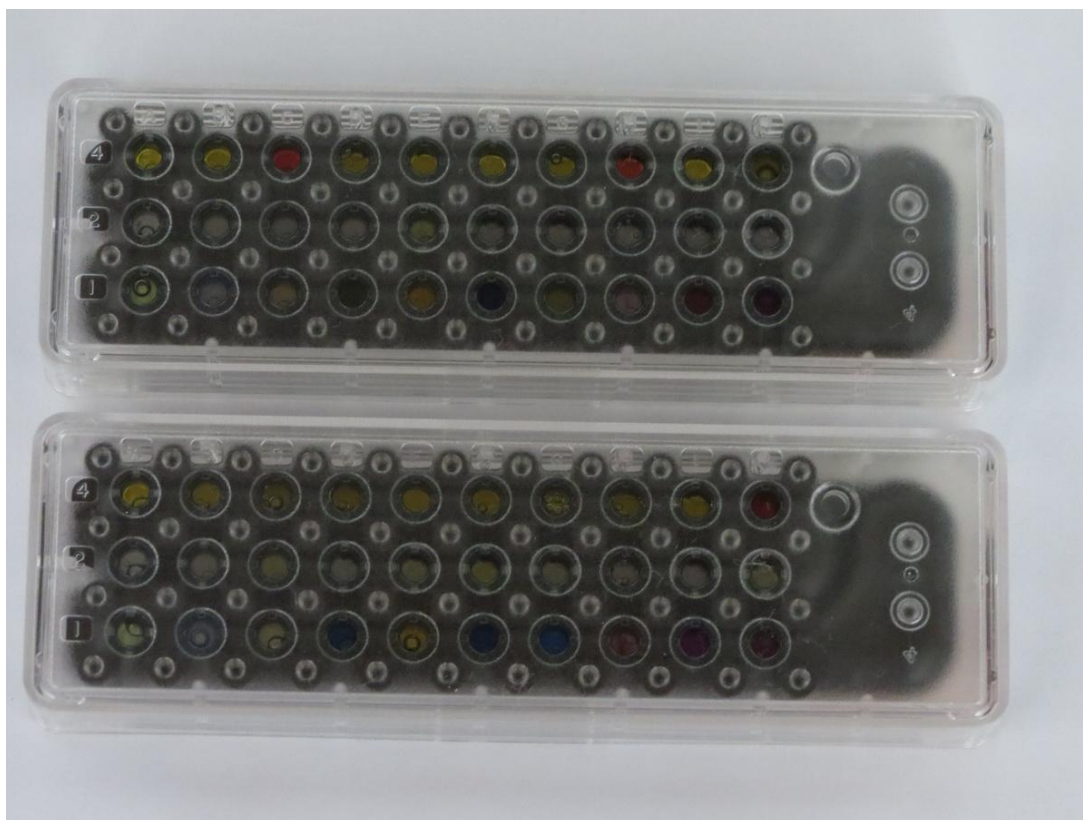
Slika broj 9. Izgled izolovanih sojeva na *Salmonella* ID SM2



Slika broj 10. i Slika broj 11. Izgled kolonija na XLD agaru i *Salmonella* SM2 ID agaru



Slika broj 13. Izgled *Salmonella* spp. i *Enterobacter cloacae* test BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit Becton Dickinson



MALDI-TOF masenom spektrometrijom upotrebom Vitek MS aparata u Gradskom zavodu za javno zdravlje Beograd ispitana su 25 prethodno biohemijski identifikovana izolata *Salmonella* spp. i identifikovano je:

- 17 izolata kao *Salmonella* group sa verovatnoćom od 99%,
- 5 izolata kao *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae* ili *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* sa verovatnoćom od 50%,
- 1 izolat kao *Salmonella* group, *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae* ili *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* sa verovatnoćom od 33,3%,
- 1 izolat kao *Salmonella* group, *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* ili *Citrobacter koseri* sa verovatnoćom od 25%,
- 1 izolat kao *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* ssp. *arizonae*, *Lactococcus raffinolactis* ili *Serratia fonticola* sa verovatnoćom od 20,3%.

Izvođenjem dodatnih biohemijskih reakcija i upotrebom antiseruma u Referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* i *Yersinia enterocolitica* u Institutu za javno zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanović Batut” u Beogradu determinisano je kao određeni serovarijetet *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 16 izolata od 17 izolata *Salmonella* group prema MALDI-TOF MS analizi, i kao određeni serovarijetet *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* 8 izolata koji su prema MALDI-TOF MS rezultatima najverovatnije bili *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* ili *Salmonella enterica* ssp *arizonae*. Jedan izolat koji je prema rezultatima konvencionalnih biohemijskih reakcija, BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID kita i MALDI-TOF MS analize potvrđen kao *Salmonella* spp. u Referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* i *Yersinia enterocolitica* je upotrebom komercijalnog API® 20E bioMérieux kita identifikovan kao *Citrobacter youngae* sa 99,6% verovatnoće. Primenom MALDI-TOF masene spektrometrije ukupno je ispitano 40 izolata iz familije *Enterobacteriaceae*, i to 25 suspektnih *Salmonella* i 15 *Citrobacter* sojeva (*C. braaki*, *C. youngae*, *C. freundii*), a u tabeli broj 6 prikazani su rezultati.

Tabela 6. Rezultati dobijeni MALDI-TOF MS i biohemijskom identifikacijom i serotipizacijom *Salmonella*.

		Biohemijska identifikacija i upotreba antiseruma		
		Pozitivna identifikacija	Negativna Identifikacija	Ukupno
<b>MADFI-TOF MS</b>	Pozitivna identifikacija	24	1	25
	Negativna identifikacija	0	15	15
	Ukupno	24	16	40

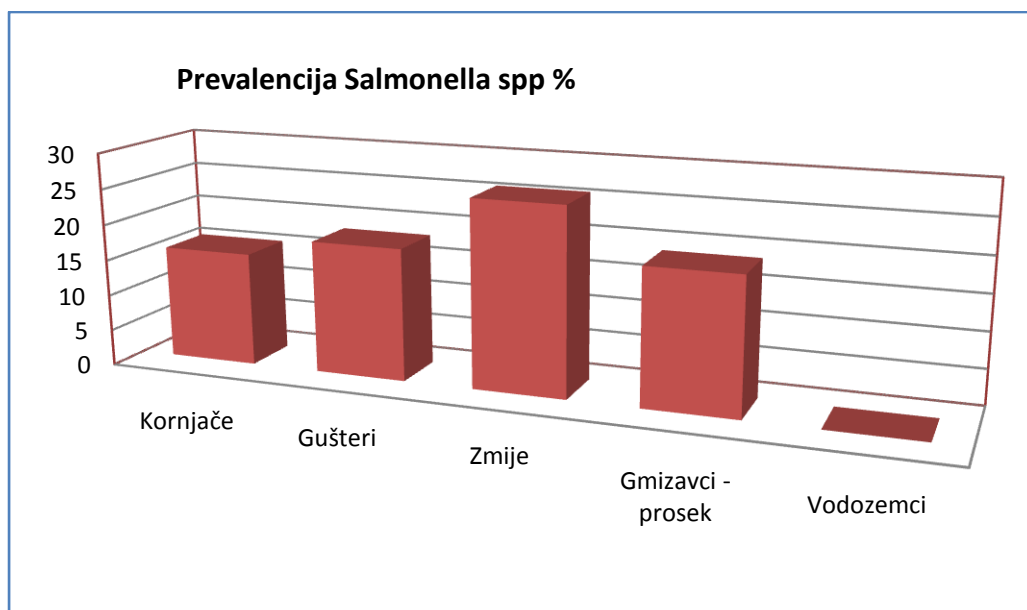


Primenom Kappa statističke analize utvrđena je izuzetno visoka podudarnost dobijenih rezultata identifikacije *Salmonella* spp. primenom MALDI-TOF MS i rezultata dobijenih biohemijskom identifikacijom i upotrebom antiseruma, a vrednost Kappa je iznosila  $k=0,947$ , odnosno sa 95% intervalom pouzdanosti između 0.846-1.000.

U okviru istraživanja ispitivani su uzorci poreklom od 317 gmizavaca i vodozemaca i prisustvo *Salmonella* spp. je ustanovljeno kod 57 jedinki odnosno kod 17,98%. Kod 16 vodozemaca obuhvaćenih ispitivanjem velike zelene žabe (*Pelophylax ridibundus*), šumske krastave žabe (*Bufo bufo*), žutotrbe ognjene žabe (*Bambina variegata*), zelene krastače (*Bufo viridis*), šarenog daždevnjaka (*Salamandra salamandra*) nije ustanovljeno prisustvo *Salmonella* spp.

Od ukupno ispitanog 301 gmizavca, izolovano i identifikovano je 57 sojeva *Salmonella* spp., odnosno od 18,93% jedinki obuhvaćenih istraživanjem. Od 57 izolata *Salmonella* spp., 24 su poticala od kornjača, 14 od guštera i 19 od zmija. Kako je ukupno istraživanjem obuhvaćeno 152 kornjače, 76 guštera i 73 zmije, kod 15,79%, 18,42% i 26,03% jedinki ustanovljeno je prisustvo *Salmonella* spp, što je i prikazano na grafikonu broj 1.

Grafikon broj 1. Prevalencija *Salmonella* kod ispitanih gmizavaca i vodozemaca



Od 24 soja *Salmonella* koji su izolovani od 152 kornjače, 8 je poticalo od jedinki slobodnih u prirodi, 12 iz zoološkog vrta i 4 od kućnih ljubimaca, a time je prevalencija u odnosu na ukupan broj ispitanih kornjača po prirodi staništa i držanja (25 u prirodi, 120 iz zoološkog vrta i 7 kućnih ljubimaca) iznosila 32%, 10% i 57,14%.

Od 14 sojeva *Salmonella* izolovanih od 76 guštera, 1 je poticao od jedinke slobodne u prirodi, 3 iz zoološkog vrta i 10 od kućnih ljubimaca, a time je prevalencija u odnosu na ukupan broj ispitanih guštera po prirodi staništa i držanja (11 u prirodi, 18 iz zoološkog vrta i 47 kućnih ljubimaca) iznosila 9,09%, 16,67 % i 21,27%.

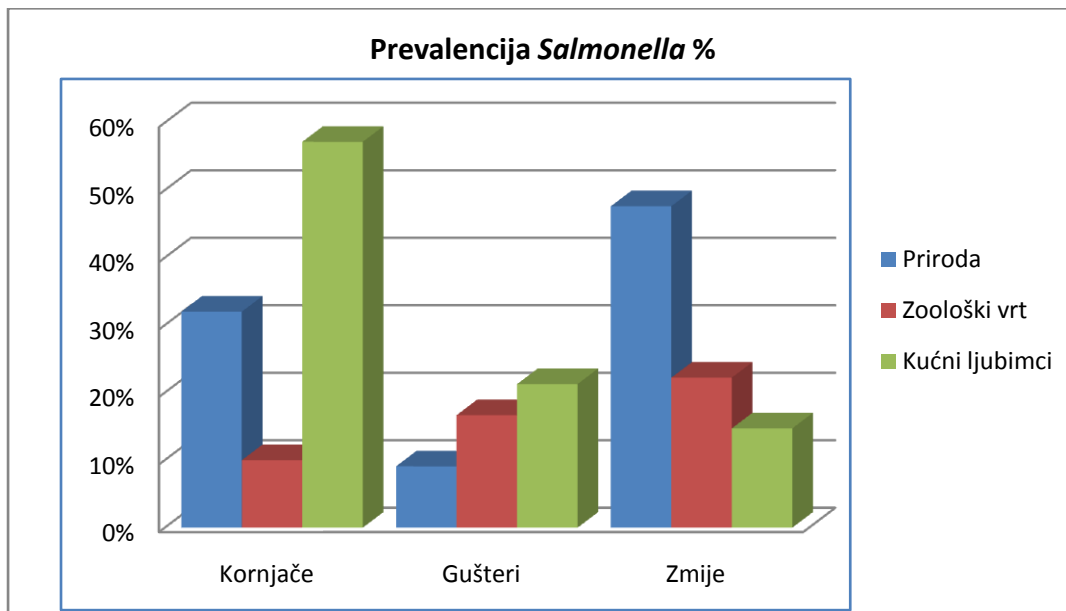
Od 19 sojeva *Salmonella* izolovanih od 73 zmije, 10 je poticalo od jedinki slobodnih u prirodi, 4 iz zoološkog vrta i 5 od kućnih ljubimaca, a time je prevalencija u odnosu na ukupan broj ispitanih zmija po prirodi staništa i držanja (21 u prirodi, 18 iz zoološkog vrta i 34 kućnih ljubimaca) iznosila 47,62%, 22,22% i 14,71%.

Statističkom analizom utvrđena je statistički značajna razlika u raširenosti *Salmonella* kod kornjača i zmija u zavisnosti od prirode staništa i držanja. Kod kornjača gajenih kao kućni ljubimci prisustvo *Salmonella* je statistički značajno više nego kod kornjača slobodnih u prirodi ili držanih u zoološkom vrtu  $p=0.0002$ . Kod zmija u prirodi prisustvo *Salmonella* je statistički značajno više nego kod zmija držanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci  $p=0.023708$ .

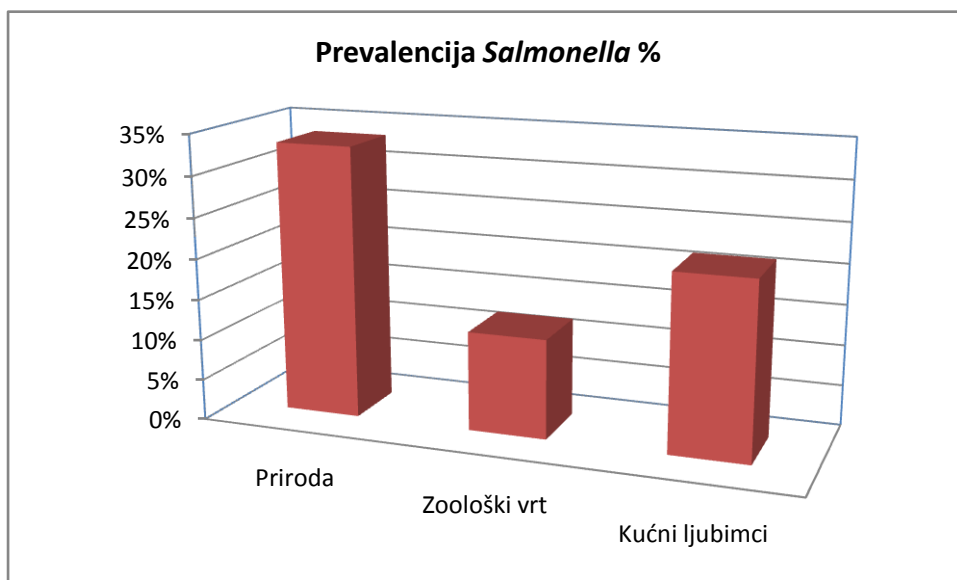
Prevalencija *Salmonella* kod gmizavaca i vodozemaca u zavisnosti da li su slobodni u prirodi, držani u zoološkim vrtu ili čuvani kao kućni ljubimci prikazana je na grafikonu broj 2.

U zavisnosti od prirode staništa i držanja gmizavaca po 19 sojeva *Salmonella* spp. izolovano je od 57 jedinki slobodnih u prirodi, 156 iz zoološkog vrta i 88 čuvanih kao kućni ljubimci, a time je prevalencija u odnosu na ukupan broj ispitanih jedinki iznosila 33,33%, 12,18% i 21,59%, kako je i prikazano na grafikonu broj 3.

Grafikon broj 2. Prevalencija *Salmonella* kod gmizavaca i vodozemaca slobodnih u prirodi, u zoološkim vrtu ili čuvanih kao kućni ljubimci



Grafikon broj 3. Prevalencija *Salmonella* spp. u zavisnosti da li su gmizavci bili slobodni u prirodi, zoološkom vrtu ili držani kao kućni ljubimci



U tabeli broj 7 prikazani su svi izolati *Salmonella* od gmizavaca obuhvaćenim ispitivanjem.

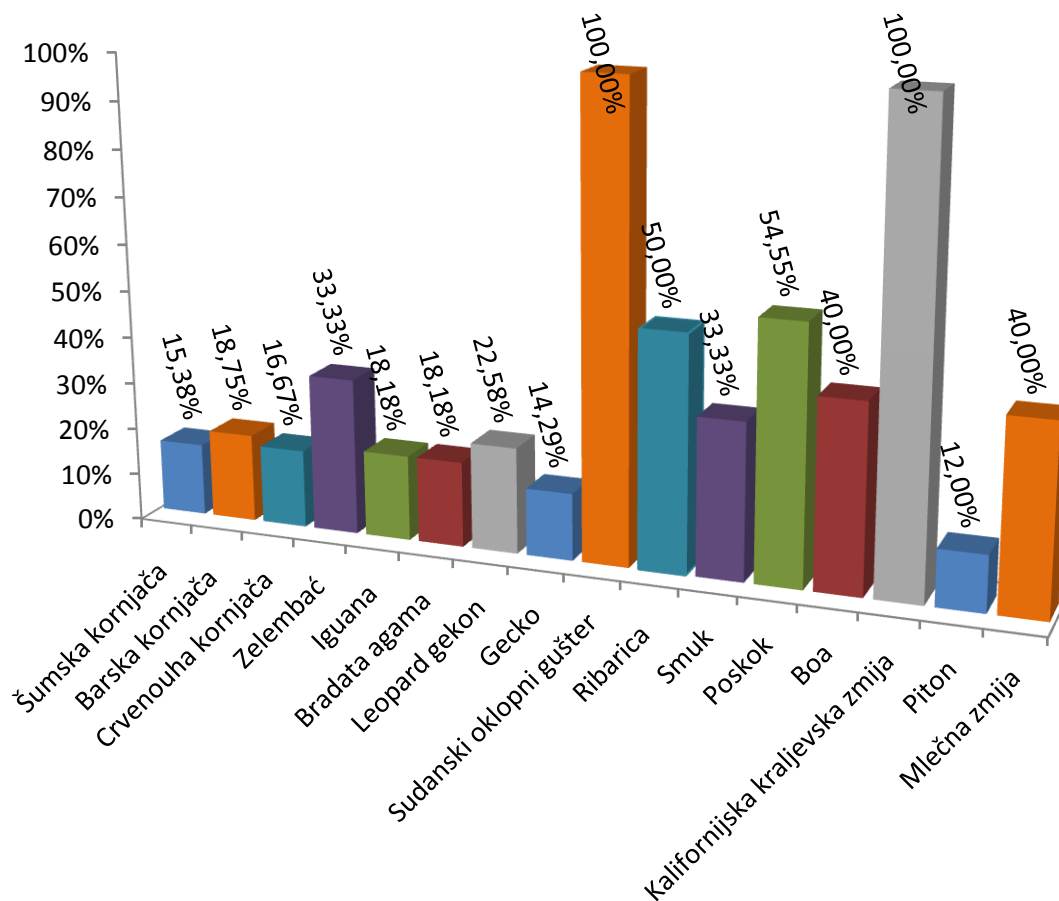
Tabela broj 7 - Izolacija, identifikacija i serotipizacija sojeva *Salmonella* spp. izolovanih od gmizavaca.

R.B.	Vrsta životinja	Broj ispitanih jedinki	Broj izolata	Vrsta, podvrsta i serovarijitet <i>Salmonella</i> spp.
1.	Šumska kornjača <i>Testudo hermanni</i>	52	8	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i></b> <i>Salmonella</i> Ahuza (43:k:1,5) – 2 izolata <i>Salmonella</i> Eastbourne (9,12:e,h:1,5) – 1 izolat <i>Salmonella</i> Glostrup (6,8:z10:e,n,z15) – 2 izolata <i>Salmonella</i> Potsdam (6,7:l,v:e,n,z15) – 2 izolata <i>Salmonella</i> Wagenia (4,12:b:e,n,z15) – 1 izolat
2.	Barska kornjača <i>Emys orbicularis</i>	64	12	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i></b> <i>Salmonella</i> Enteritidis (9,12:g,m :-) – 1 izolat <i>Salmonella</i> Thompson (6,7:k:1,5) – 6 izolata <i>Salmonella</i> Umbilo (28:z10:e,n,x) – 5 izolata
3.	Crvenouha kornjača <i>Trachemys scripta elegans</i>	21	4	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i></b> <i>Salmonella</i> Thompson (6,7:k:1,5) – 3 izolata <i>Salmonella</i> Umbilo (28:z10:e,n,x) – 1 izolat
4.	Zelembać <i>Lacerta viridis</i>	3	1	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i></b> <i>Salmonella</i> Finkenwerder (6,14:d:1,5) – 1 izolat
5.	Iguana <i>Iguana iguana</i>	11	2	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i></b> (IIIb 50:r:z) – 2 izolata
6.	Bradata agama <i>Pogona vitticeps</i>	11	2	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i></b> <i>Salmonella</i> Ago (30:z38:-) 2 izolata

7.	Leopard gekon <i>Eublepharis macularius</i>	31	7	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i></b> <i>Salmonella</i> Ago (30:z38:-) – 3 izolata <i>Salmonella</i> Apapa (45:m,t: -) – 2 izolata <i>Salmonella</i> Hadar (6,8:z10:e,n,x) – 1 izolat <b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i></b> (IIIb 47:-:z35) . 1 izolat
8.	Gecko <i>Hemitheconyx caudicinctus</i>	7	1	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i></b> (IIIb 50:r:z) - 1 izolat
9.	Sudanski oklopni gušter <i>Gerrhosaurus major</i>	1	1	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i></b> (IIIb 61:c:z35) - 1 izolat
10.	Ribarica <i>Natrix tessellata</i>	6	3	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i></b> <i>Salmonella</i> Bispebjerg (4,5,12:a:e,n,x) - 3 izolata
11.	Smuk <i>Zamenis longissimus</i>	3	1	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i></b> (IIIb 14:l,v:z53) - 1 izolat
12.	Poskok <i>Vipera ammodytes</i>	11	6	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i></b> (IIIb 17:z10:e,n,z15) - 2 izolata (IIIb 17:l,v:z) – 1 izolat (IIIb 50:i:z) – 1 izolat (IIIb (6),14:z10:z) – 2 izolata
13.	Boa <i>Boa constrictor</i>	5	2	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i></b> (IIIb 35:i:z35) – 2 izolata
14.	Kalifornijska kraljevska zmija <i>Lampropeltis getula californiae</i>	2	2	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i></b> (IIIb 18:l,v:z)- 2 izolata
15.	Piton <i>Python regius</i>	25	3	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i></b> <i>Salmonella</i> Apapa (45:m,t:-) – 1 izolat <i>Salmonella</i> Benin (9,46:y:1,7) – 2 izolata
16.	Mlečna zmija <i>Lampropeltis triangulum</i>	5	2	<b><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i></b> <i>Salmonella</i> Benin (9,46:y:1,7) – 2 izolata

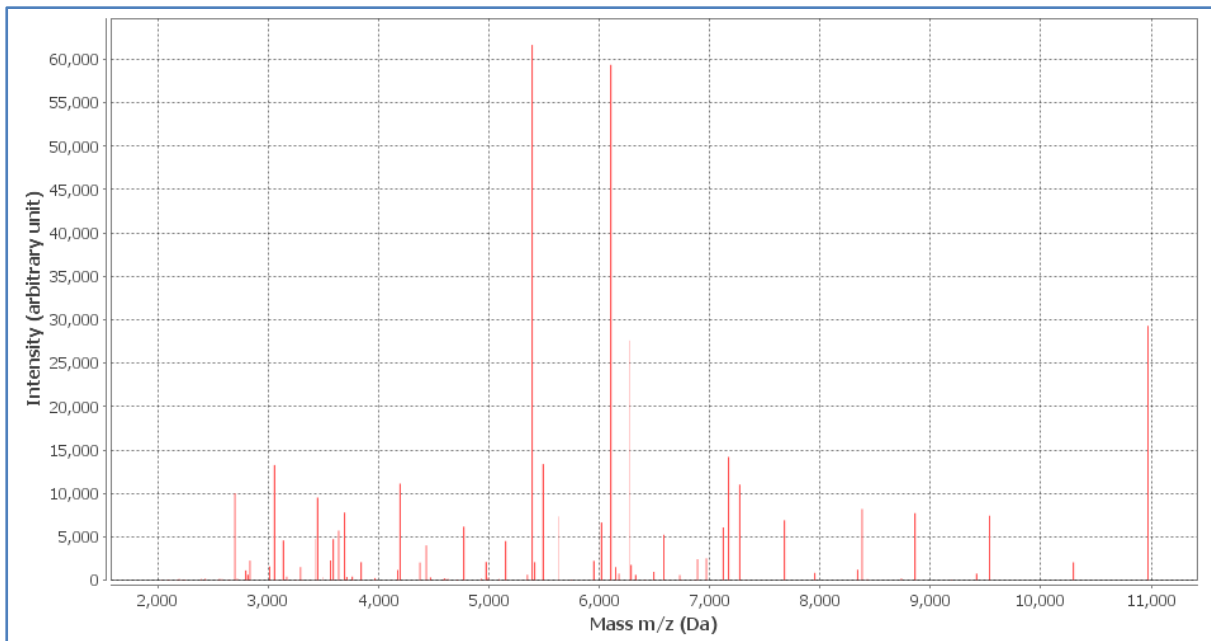
Na Grafikonu broj 4. prikazana je prevalencija *Salmonella enterica* kod određenih vrsta gmizavaca obuhvaćenim ispitivanjem.

Grafikon broj 4. Prevalencija *Salmonella enterica* kod gmizavaca po vrstama.

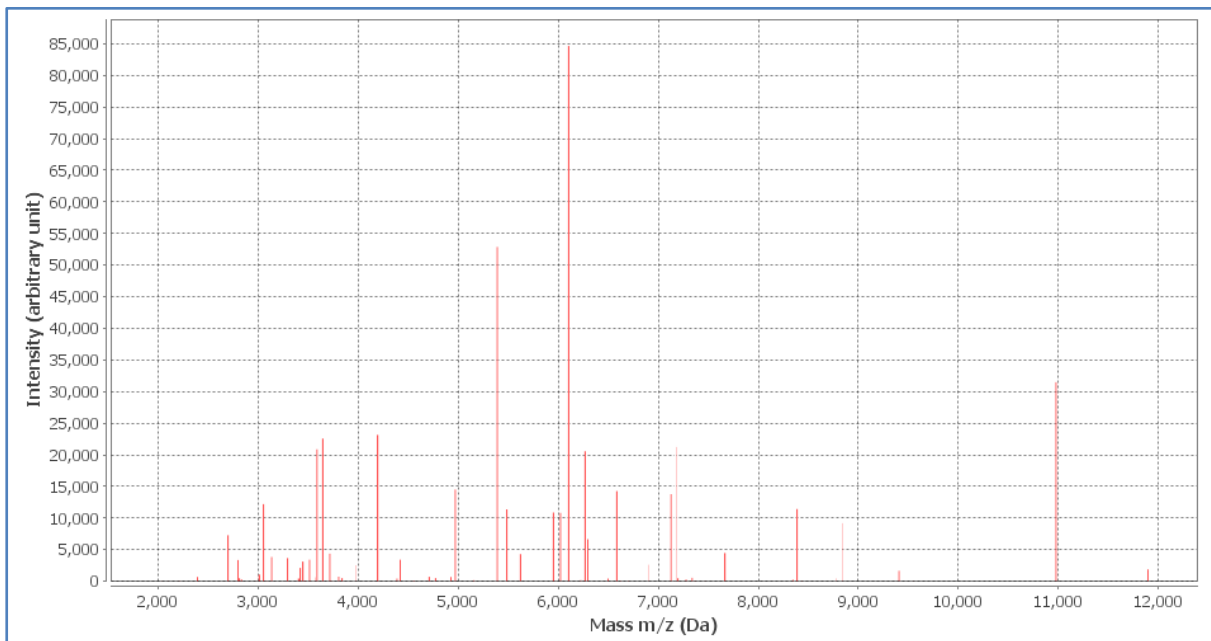


Na nekoliko sledećih slika od broja 14 do broja 21 biće prikazani maseni spektri određenih serovarijeteta *Salmonella enterica*.

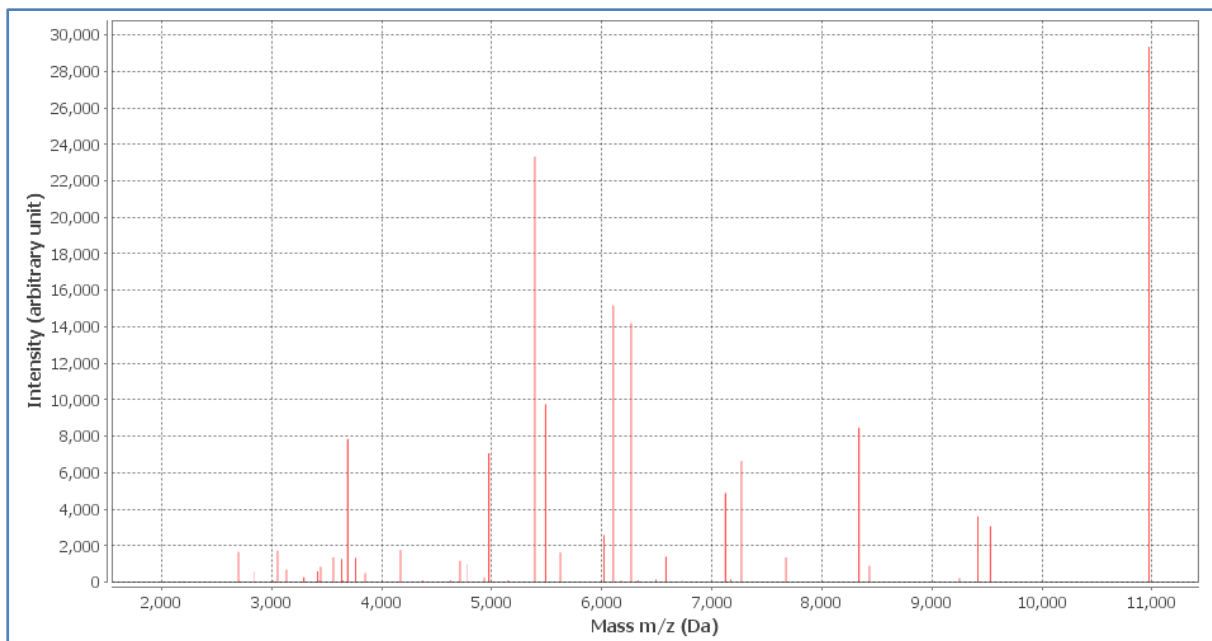
Slika broj 14. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella* group 99,4% kasnije serotipizovane kao *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Apapa



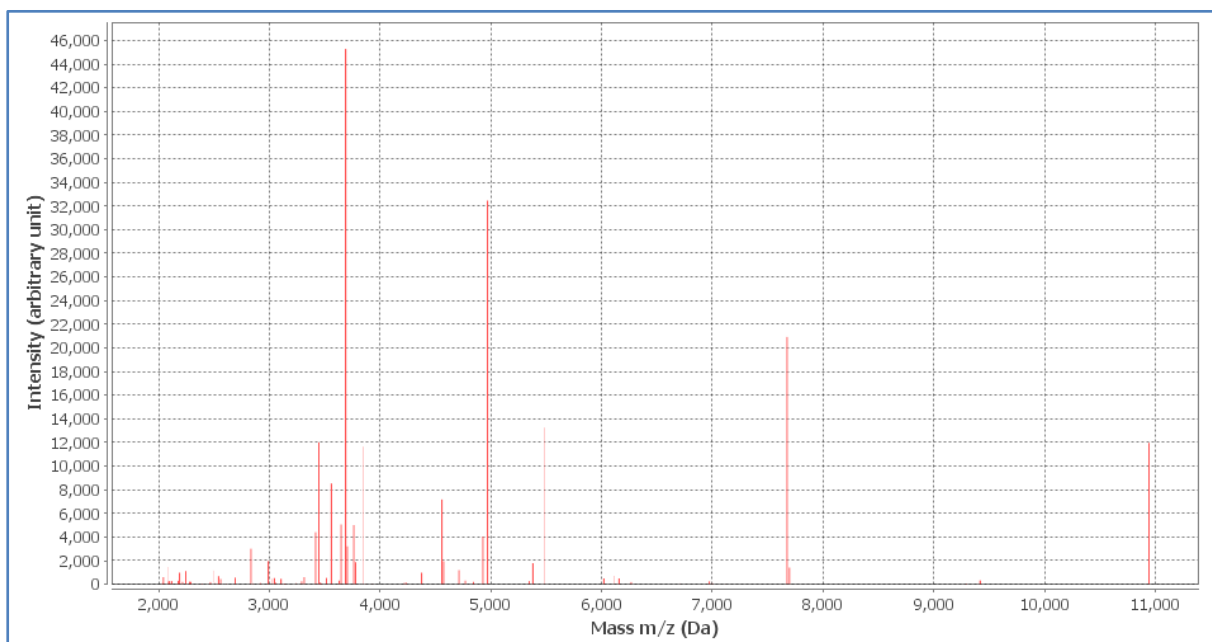
Slika broj 15. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella* group 99,9% kasnije serotipizovane kao *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Ago



Slika broj 16. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella* group 99,9% kasnije serotipizovana kao *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis

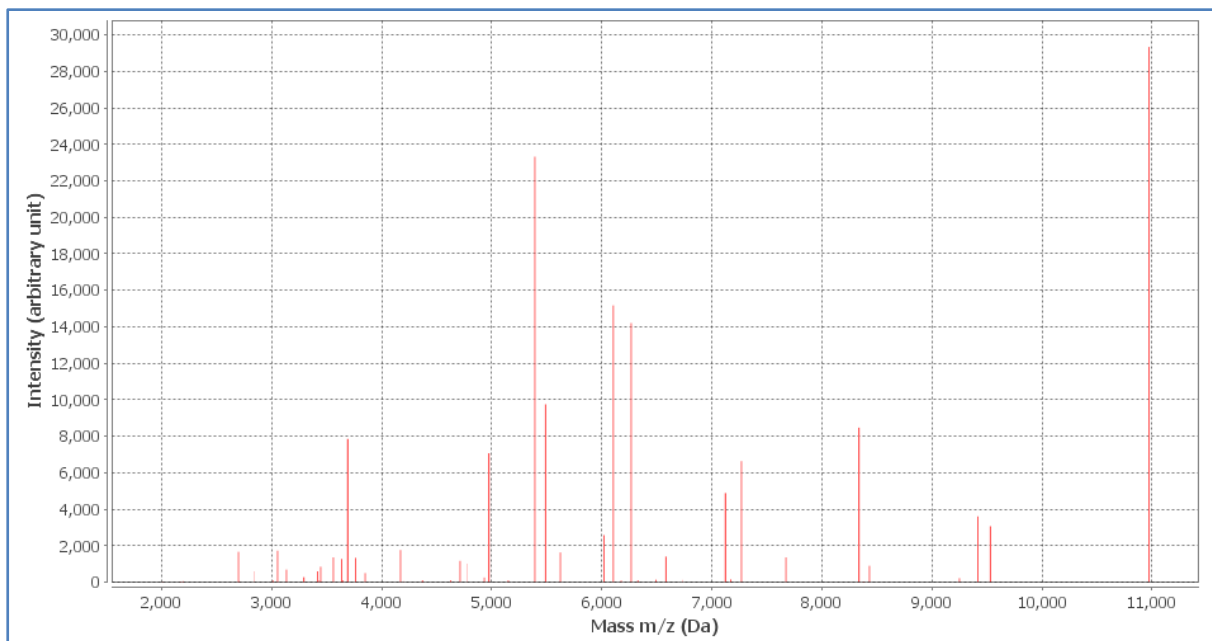


Slika broj 17. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella* group 99,9% kasnije serotipizovane kao *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Hadar

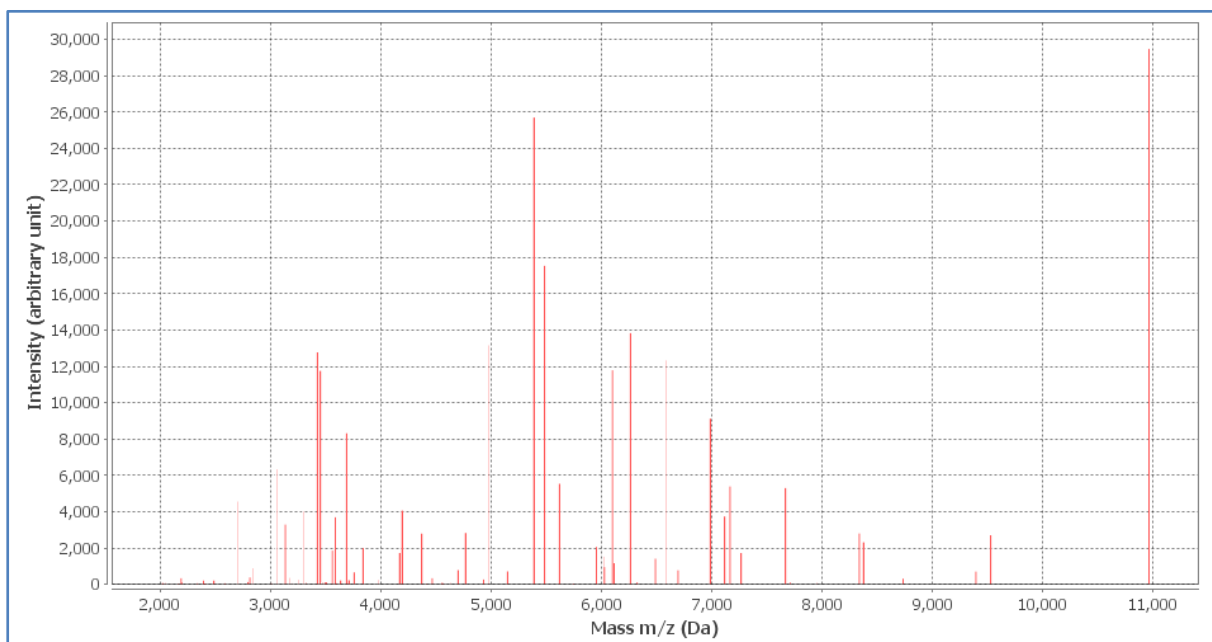




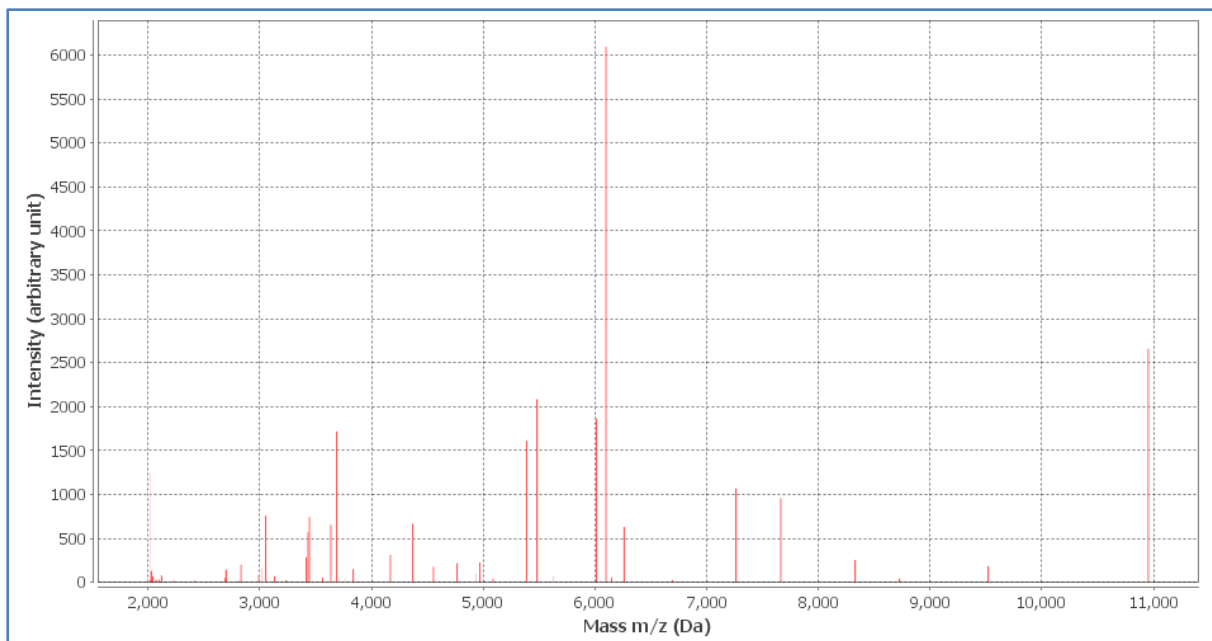
Slika broj 18. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella* group 99,9% kasnije serotipizovane kao *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Thompson



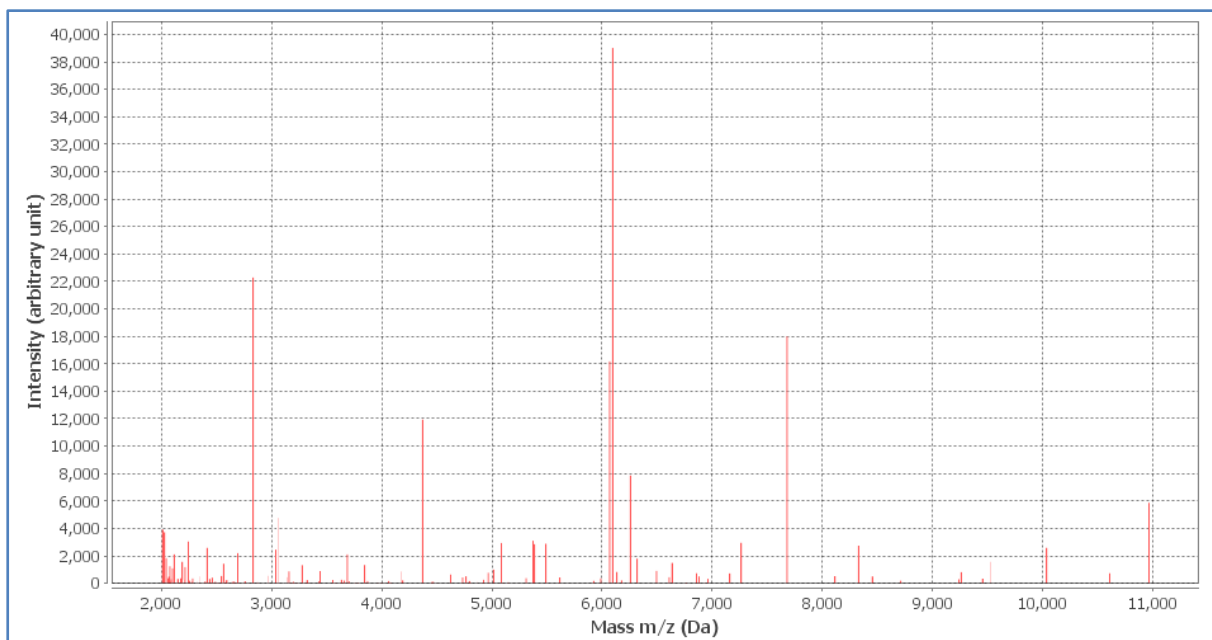
Slika broj 19. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella* group 99,9% kasnije serotipizovane kao *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Umbilo



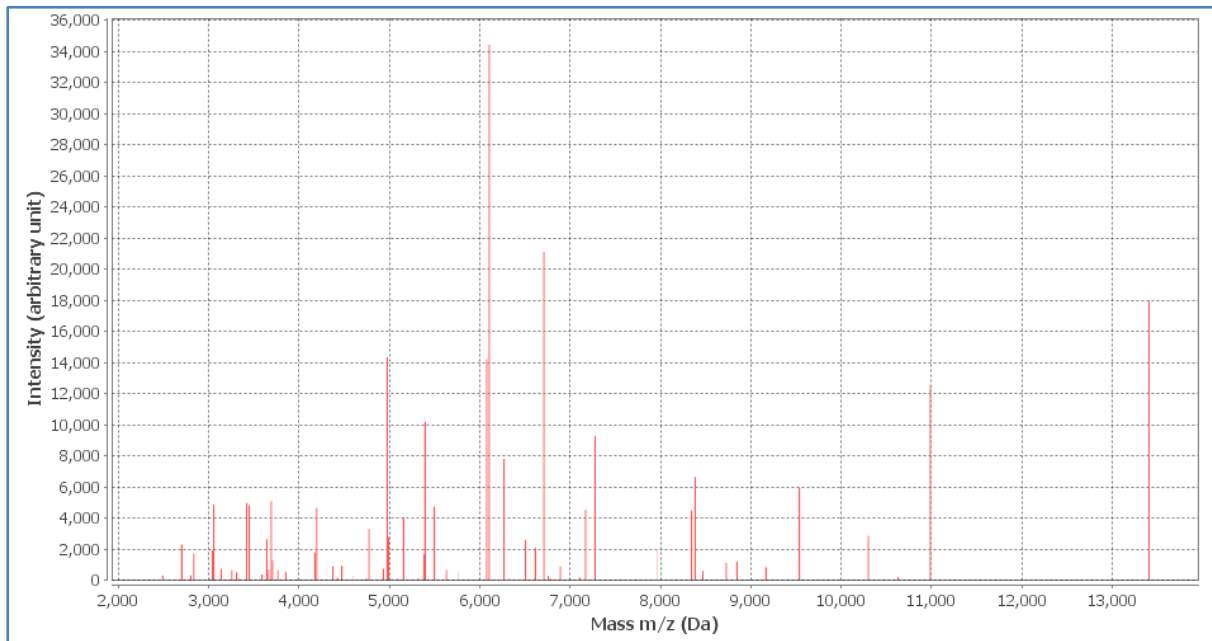
Slika broj 20. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella* group 99,9% kasnije serotipizovane kao *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Benin



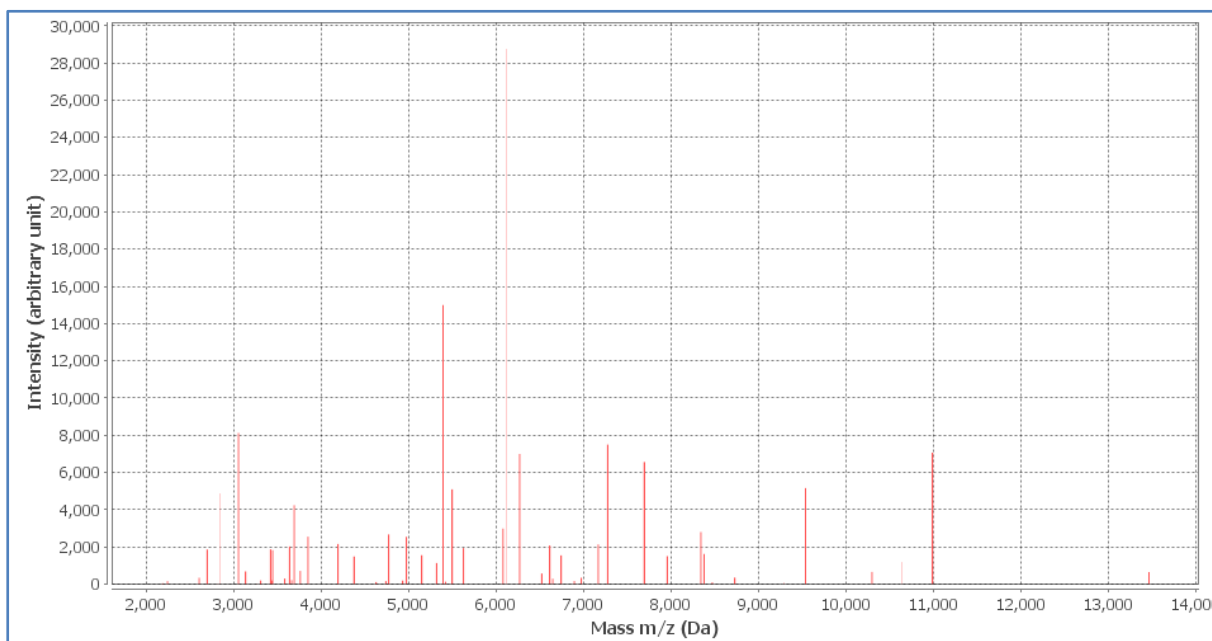
Slika broj 21. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* ili *Salmonella enterica* ssp *arizonae* sa verovatnoćom od 50% kasnije serotipizovane kao *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* IIIb 50:r:z



Slika broj 22. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* 20,3%, *Salmonella enterica* ssp *arizonae* 20,3%, *Lactococcus raffinolactis* 20,3%, *Serratia fonticola* 20,3% kasnije serotipizovane kao *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* IIIb 35:i:z35



Slika broj 23. MALDI-TOF MS Maseni spektar *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* ili *Salmonella enterica* ssp *arizonae* sa verovatnoćom od 50% kasnije serotipizovane kao *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* IIIb 17:z10:e,n,z15



Nakon sprovedene identifikacije i serotipizacije od ukupno 57 izolovanih sojeva, utvrđeno je prisustvo 41 soja *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i 16 sojeva *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, što predstavlja 71,93 % odnosno 28,07% od ukupnog broja izolata, i to:

*Salmonella enterica* subspecies *enterica*

<i>Salmonella</i> Ago 30:z38: -	– 5 izolata
<i>Salmonella</i> Ahuza 43:k:1,5	– 2 izolata
<i>Salmonella</i> Apapa 45:m,t : -	– 3 izolata
<i>Salmonella</i> Benin 9,46:y:1,7	– 4 izolata
<i>Salmonella</i> Bispebjerg 4,5,12:a:e,n,x	– 3 izolata
<i>Salmonella</i> Eastbourne 9,12:e,h:1,5	– 1 izolat
<i>Salmonella</i> Enteritidis 9,12:g,m:-	– 1 izolat
<i>Salmonella</i> Finkenwerder 6,14:d:1,5	– 1 izolat
<i>Salmonella</i> Glostrup 6,8:z10:e,n,z15	– 2 izolata
<i>Salmonella</i> Hadar 6,8:z10:e,n,x	– 1 izolat
<i>Sallmonella</i> Potsdam 6,7:l,v:e,n,z15	– 2 izolata
<i>Salmonella</i> Thompson 6,7:k:1,5	– 9 izolata
<i>Salmonella</i> Umbilo 28:z10:e,n,x	– 6 izolata
<i>Salmonella</i> Wagenia 4,12:b:e,n,z15	– 1 izolat

*Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*

IIIb (6),14:z10:z	– 2 izolata
IIIb 14:l, v:z53	– 2 izolat
IIIb 17:z10:e,n,z15	– 2 izolata
IIIb 17:l,v:z	– 2 izolat
IIIb 18:l,v:z	– 1 izolat
IIIb 35:i:z35	– 2 izolata
IIIb 47:-:z35	– 1 izolat
IIIb 50:i:z	– 1 izolat
IIIb 50:r:z	– 3 izolat
IIIb 61:c:z35	– 1 izolat

Od kornjača izolovani su samo sojevi koji su pripadali *S. enterica* subsp. *enterica* (24 izolata), od guštera 9 sojeva *S. enterica* subsp. *enterica* i 5 sojeva *S. enterica* subsp. *diarizonae*, i od zmija 8 sojeva *S. enterica* subsp. *enterica* i 11 sojeva *S. enterica* subsp. *diarizonae*.

Utvrđivanjem antigenske građe izolata *Salmonella enterica* utvrđeno je da su pripadali 14 različitih serovarijeta *S. enterica* subsp. *enterica* i 10 različitih serovarijeteta *S. enterica* subsp. *diarizonae*.

Prema podacima kojima raspolažemo od ukupno utvrđena 24 serovarijeteta, po prvi put je identifikovano u Srbiji 13 serovarijeteta i to: *S. Ago*, *S. Apapa*, *S. Benin*, *S. Finkenwerder*, *S. Wagenia*, IIIb 17:l,v,z, IIIb 17:z10:e,n,z15, IIIb 18:l,v,z, IIIb 47:-:z35, IIIb 50:r:z, IIIb 35:i:z35, IIIb 50:i:z i IIIb 61:c:z35.

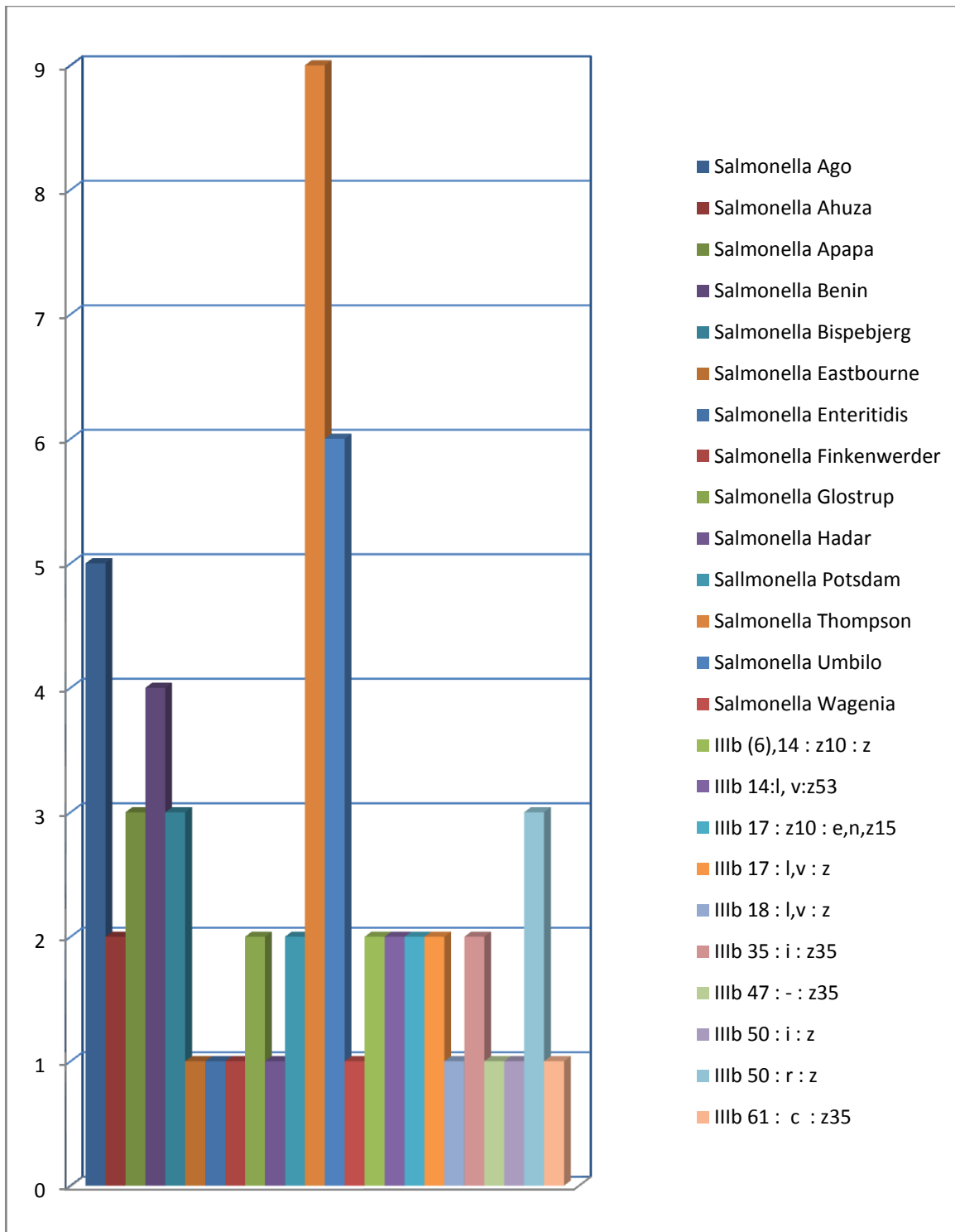
Za identifikovani serovarijetet IIIb 17:l,v,z je potrebna potvrda u supranacionalnoj referentnoj laboratoriji, WHO *Salmonella* Reference Centre Pasteur Institute Paris, jer nije naveden u postojećoj White-Kauffmann-Le minor šemi.

Od serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* izolovanih kod gmizavaca često su u Srbiji izolovani kod ljudi *S. Enteritidis*, *S. Thompson* i *S. Hadar*, dok su sporadično ustanovljeni *S. Glostrup*, *S. Bispebjerg* i *S. Potsdam*.

Kada su u pitanju najčešći serovarijeteti gmizavaca kućnih ljubimaca koji se dovode u vezu sa infekcijama ljudi, serovarijeteti poznati kao REPAS (Reptile-Exotic-Pet-Associated-Salmonellosis), sledeći su izolovani tokom ispitivanja *S. Apapa*, *S. Eastbourne*, *S. Potsdam* i veći broj *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* od kojih je najznačajnija prema literaturnim podacima IIIb (6),14:z10:z.

Na Grafikonu broj 5 prikazan je broj izolata *Salmonella enterica* subspecies *enterica* i *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*.

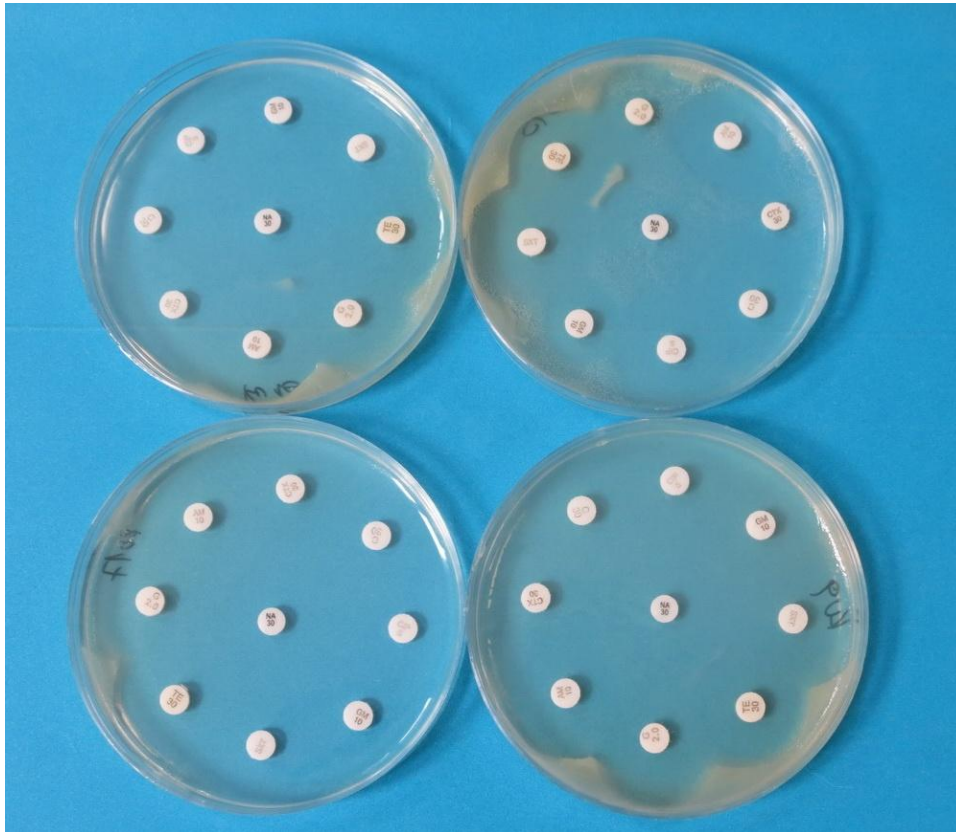
Grafikon broj 5. Broj izolata *Salmonella enterica* subspecies *enterica* i *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*



Primenom disk difuzione i mikrodilucione metode utvrđena je kod svih 57 izolata *Salmonella* spp. osetljivost prema svim ispitivanih antibioticima, slike broj 24. i broj 25.

Rezultati ispitivanje osetljivosti izolata *Salmonella* primenom disk difuzionog testa i mikrodilucione metode u bujonu prikazani su u tabeli broj 8 i tabeli broj 9.

Slika broj 24. Ispitivanje osetljivosti *Salmonella* izolovanih od gmizavaca prema antimikrobnim sredstvima primenom disk difuzionog testa



Slika broj. 25. Ispitivanje osetljivosti izolata *Salmonella* prema antimikrobnim sredstvima primenom mikrodilucione metode u bujonu

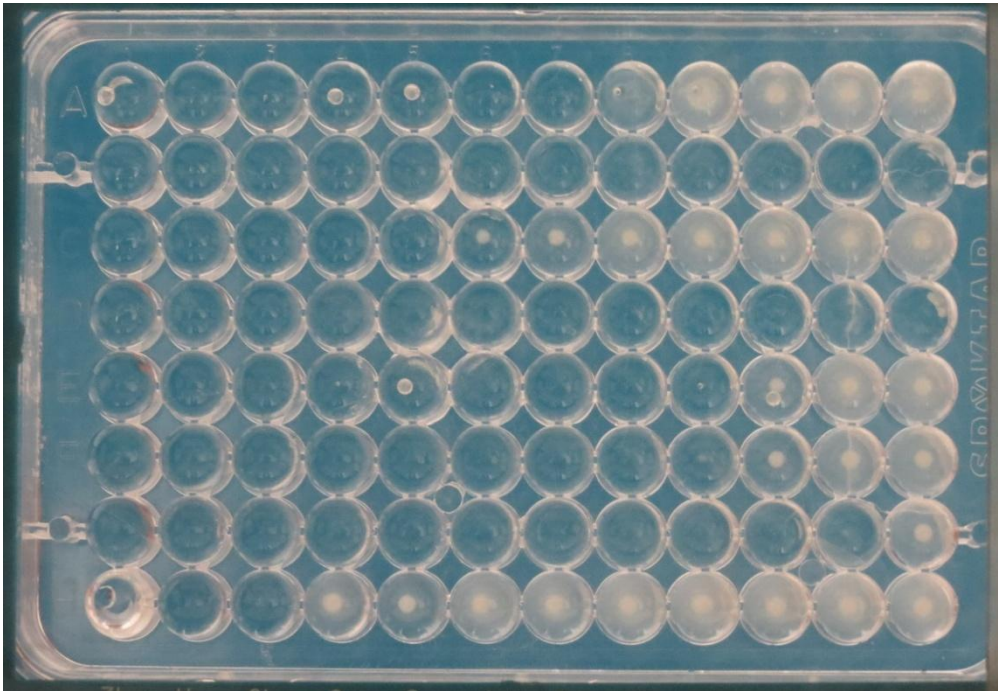




Tabela broj 8. Ispitivanje osetljivosti izolata *Salmonella* prema antimikrobnim sredstvima.primenom disk difuzione metode

		Ampicilin	Cefotaksim	Hloramfenikol	Ciprofloksacin	Gentamicin	Sulfametoksazol + trimetoprim	Tetraciklin	Nalidiksinska kiselina
1	Šumska kornjača, NP Đerdap	27	30	26	30	26	30	24	25
2	Šumska kornjača, NP Đerdap	30	30	26	30	30	30	24	26
3	Šumska kornjača, NP Đerdap	27	30	30	30	28	30	28	26
4	Šumska kornjača, NP Đerdap	24	30	30	30	30	30	28	28
5	Šumska kornjača , NP Đerdap	27	30	30	30	30	30	25	26
6	Šumska kornjača, NP Đerdap	28	30	30	30	28	30	26	28
7	Šumska kornjača, NP Đerdap	26	30	30	30	22	30	23	28
8	Šumska kornjača, NP Đerdap	30	30	30	30	28	30	30	30
9	Zelembać, NP Đerdap	24	30	30	30	24	30	28	30
10	Smuk, NP Đerdap	30	30	30	30	30	30	26	30
11	Ribarica, NP Đerdap	30	30	30	30	30	30	30	27
12	Ribarica, NP Đerdap	28	30	30	30	30	30	28	26
13	Ribarica, NP Đerdap	25	30	30	30	26	30	26	27
14	Poskok, Mileševce	30	30	26	30	26	30	25	30
15	Poskok, Mileševce	26	30	30	30	30	30	28	30
16	Poskok, Mileševce	30	30	30	30	30	30	27	26
17	Poskok, Mileševce	27	30	26	30	23	30	26	30
18	Poskok, Mileševce	28	30	30	30	28	30	30	30
19	Poskok, Mileševce	30	30	30	30	30	30	30	30
20	Barska kornjača,Zoovrt	30	30	30	30	30	30	25	30
21	Barska kornjača, Zoovrt	30	30	30	30	26	30	28	30
22	Barska kornjača, Zoovrt	26	30	26	30	25	30	24	27
23	Barska kornjača, Zoovrt	26	30	30	30	22	30	25	28
24	Barska kornjača, Zoovrt	26	30	30	30	28	28	26	28
25	Barska kornjača, Zoovrt	26	30	30	30	26	28	26	27
26	Barska kornjača, Zoovrt	27	30	26	30	30	30	24	29
27	Barska kornjača, Zoovrt	26	30	26	30	28	30	24	30
28	Barska kornjača, Zoovrt	24	30	30	30	26	30	26	25
29	Barska kornjača, Zoovrt	27	30	30	30	30	30	27	27
30	Barska kornjača, Zoovrt	28	30	23	30	30	30	28	27
31	Barska kornjača Zoovrt	28	28	28	30	26	30	23	23
32	Iguana Zoovrt	30	30	30	30	28	30	26	30
33	Iguana Zoovrt	26	30	30	30	23	30	25	30
34	Sudanski oklopni gušter Zoovrt	24	30	30	30	24	30	25	30
35	Boa Zoovrt	26	30	30	30	30	30	26	26
36	Boa Zoovrt	30	30	30	30	30	30	27	30

37	Kalifornijska kraljevska zmija Zoovrt	23	26	30	30	30	30	26	30
38	Kalifornijska kraljevska zmija Zoovrt	25	30	30	30	24	30	29	30
39	Crvenouha kornjača kućni ljubimac	28	30	23	30	30	30	28	27
40	Crvenouha kornjača kućni ljubimac	28	30	23	30	30	30	28	27
41	Crvenouha kornjača kućni ljubimac	28	30	23	30	30	30	28	27
42	Crvenouha kornjača kućni ljubimac	28	30	23	30	30	30	28	27
43	Gekon kućni ljubimac	28	30	30	30	25	30	25	26
44	Gekon kućni ljubimac	30	28	30	30	30	30	25	30
45	Gekon kućni ljubimac	27	30	26	30	24	30	24	27
46	Gekon kućni ljubimac	30	30	30	30	28	30	25	28
47	Gekon kućni ljubimac	24	30	30	30	30	30	24	30
48	Gekon kućni ljubimac	23	27	26	30	28	30	24	30
49	Gekon kućni ljubimac	23	30	30	30	30	30	24	30
50	Gecko kućni ljubimac	25	28	30	30	28	30	26	30
51	Bradata agama kućni ljubimac	24	30	30	30	22	30	24	28
52	Bradata agama kućni ljubimac	23	28	28	30	30	30	23	30
53	Piton kućni ljubimac	28	30	30	30	27	30	26	30
54	Piton kućni ljubimac	26	30	30	30	30	30	26	28
55	Piton kućni ljubimac	30	30	30	30	30	30	26	26
56	Mlečna zmija kućni ljubimac	26	28	30	30	30	30	26	30
57	Mlečna zmija kućni ljubimac	23	25	30	30	30	30	25	30

Tabela broj 9. Ispitivanje osetljivosti izolata *Salmonella* prema antimikrobnim sredstvima.primenom mikrobilucione metode

		Ampicilin	Cefotaksim	Hloramfenikol	Ciprofloksacin	Gentamicin	Sulfametoksazol / trimetoprim	Tetraciklin
1	Šumska kornjača, NP Đerdap	2	≤0,03	8	≤0,03	0,125	2,32 / 0,125	1
2	Šumska kornjača, NP Đerdap	0,5	≤0,03	8	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	1
3	Šumska kornjača, NP Đerdap	2	≤0,03	4	0,06	0,06	≤ 0,58 / 0,03	0,5
4	Šumska kornjača, NP Đerdap	2	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	2,32 / 0,125	0,5
5	Šumska kornjača , NP Đerdap	1	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	2,32 / 0,125	1
6	Šumska kornjača, NP Đerdap	1	≤0,03	2	≤0,03	0,06	≤ 0,58 / 0,03	0,5
7	Šumska kornjača, NP Đerdap	2	≤0,03	2	≤0,03	1	≤ 0,58 / 0,03	2
8	Šumska kornjača, NP Đerdap	0,5	≤0,03	4	≤0,03	0,06	1,16 / 0,06	0,5
9	Zelembać, NP Đerdap	1	≤0,03	4	≤0,03	0,125	≤ 0,58 / 0,03	0,5
10	Smuk, NP Đerdap	0,5	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,5
11	Ribarica, NP Đerdap	0,5	≤0,03	2	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,25
12	Ribarica, NP Đerdap	1	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,5
13	Ribarica, NP Đerdap	4	≤0,03	4	≤0,03	0,125	≤ 0,58 / 0,03	1
14	Poskok, Mileševе	0,5	≤0,03	8	≤0,03	0,25	≤ 0,58 / 0,03	0,5
15	Poskok, Mileševе	2	≤0,03	4	0,06	≤0,03	1,16 / 0,06	0,5
16	Poskok, Mileševе	0,5	≤0,03	4	≤0,03	0,25	≤ 0,58 / 0,03	0,25
17	Poskok, Mileševе	2	≤0,03	8	≤0,03	0,125	≤ 0,58 / 0,03	0,5
18	Poskok, Mileševе	1	≤0,03	4	≤0,03	0,06	≤ 0,58 / 0,03	0,5
19	Poskok, Mileševе	0,5	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	1,16 / 0,06	0,5
20	Barska kornjača,Zoovrt	0,5	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	2,32 / 0,125	0,5
21	Barska kornjača, Zoovrt	0,5	≤0,03	4	≤0,03	0,125	≤ 0,58 / 0,03	0,5
22	Barska kornjača, Zoovrt	2	≤0,03	8	≤0,03	0,25	≤ 0,58 / 0,03	1
23	Barska kornjača, Zoovrt	2	≤0,03	4	≤0,03	0,5	≤ 0,58 / 0,03	0,5
24	Barska kornjača, Zoovrt	2	≤0,03	2	≤0,03	0,06	2,32 / 0,125	0,5
25	Barska kornjača, Zoovrt	2	≤0,03	4	0,06	0,125	1,16 / 0,06	0,5
26	Barska kornjača, Zoovrt	2	≤0,03	8	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	1
27	Barska kornjača, Zoovrt	2	≤0,03	8	≤0,03	0,06	1,16 / 0,06	0,5
28	Barska kornjača, Zoovrt	4	≤0,03	4	≤0,03	0,125	≤ 0,58 / 0,03	0,5
29	Barska kornjača, Zoovrt	2	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,25
30	Barska kornjača, Zoovrt	1	≤0,03	8	≤0,03	0,25	≤ 0,58 / 0,03	0,5
31	Barska kornjača Zoovrt	1	0,06	4	≤0,03	0,125	≤ 0,58 / 0,03	1
32	Iguana Zoovrt	0,5	≤0,03	2	≤0,03	0,06	≤ 0,58 / 0,03	0,5
33	Iguana Zoovrt	2	≤0,03	2	0,06	0,125	2,32 / 0,125	0,5
34	Sudanski oklopni gušter Zoovrt	4	≤0,03	4	≤0,03	0,125	2,32 / 0,125	0,5
35	Boa Zoovrt	2	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	1,16 / 0,06	0,5

36	Boa Zoovrt	0,5	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,25
37	Kalifornijska kraljevska zmija Zoovrt	4	0,25	4	≤0,03	0,5	≤ 0,58 / 0,03	0,5
38	Kalifornijska kraljevska zmija Zoovrt	4	≤0,03	4	0,06	0,125	≤ 0,58 / 0,03	0,25
39	Crvenouha kornjača kućni ljubimac	1	≤0,03	8	≤0,03	≤0,03	1,16 / 0,06	0,5
40	Crvenouha kornjača kućni ljubimac	1	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,5
41	Crvenouha kornjača kućni ljubimac	1	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,5
42	Crvenouha kornjača kućni ljubimac	1	≤0,03	8	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,05
43	Gekon kućni ljubimac	1	≤0,03	4	≤0,03	0,25	≤ 0,58 / 0,03	0,5
44	Gekon kućni ljubimac	0,5	0,06	4	0,06	≤0,03	1,16 / 0,06	0,5
45	Gekon kućni ljubimac	2	≤0,03	8	≤0,03	0,125	≤ 0,58 / 0,03	1
46	Gekon kućni ljubimac	0,5	≤0,03	4	≤0,03	0,06	≤ 0,58 / 0,03	0,5
47	Gekon kućni ljubimac	4	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	1
48	Gekon kućni ljubimac	4	0,125	8	≤0,03	0,06	≤ 0,58 / 0,03	1
49	Gekon kućni ljubimac	4	≤0,03	4	0,06	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	1
50	Gecko kućni ljubimac	4	0,06	4	≤0,03	0,06	2,32 / 0,125	0,5
51	Bradata agama kućni ljubimac	4	≤0,03	4	0,25	1	≤ 0,58 / 0,03	1
52	Bradata agama kućni ljubimac	4	0,06	4	≤0,03	≤0,03	1,16 / 0,06	1
53	Piton kućni ljubimac	1	≤0,03	4	0,06	0,06	≤ 0,58 / 0,03	0,5
54	Piton kućni ljubimac	2	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,5
55	Piton kućni ljubimac	0,5	≤0,03	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,5
56	Mlečna zmija kućni ljubimac	4	0,125	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,5
57	Mlečna zmija kućni ljubimac	4	0,125	4	≤0,03	≤0,03	≤ 0,58 / 0,03	0,5

## 6. DISKUSIJA

Prilikom uzorkovanja kod većeg broja gmizavaca i vodozemaca uzimani su istovremeno kloakalni i orofaringealni brisevi, odnosno kloakalni bris i feces, koji su zatim u laboratoriji ispitani kao posebni uzorci. Iz 38 paralelno ispitanih kloakalnih i orofaringealnih briseva izolovano je 13 sojeva *Salmonella enterica* i to 2 soja iz oba brisa, 10 samo iz kloakalnog i 1 iz orofaringealnog. Tokom paralelnog ispitivanja 20 kloakalnih briseva i fecesa od gmizavaca ukupno je izolovano 5 sojeva *Salmonella enterica*, i to 2 soja iz kloakalnih briseva i fecesa, a 3 soja samo iz fecesa. Primenom Kappa statističke analize  $k=0,16$  odnosno  $k=0,5$  utvrđeno je da nema podudarnosti dobijenih rezultata izolacije *Salmonella enterica* iz paralelnih kloakalnih i orofaringealnih briseva gmizavaca i vodozemaca, odnosno da je slaba podudarnost dobijenih rezultata izolacije *Salmonella enterica* iz paralelnih kloakalnih briseva i fecesa gmizavaca i vodozemaca. Činjenica da se bakterije iz roda *Salmonella* mnogo češće izoluju iz kloakalnih briseva nego iz briseva oralne duplje ukazuje na mnogo bolje uslove za dugotrajnije preživljavanje ove bakterija u ovom delu digestivnog trakta, usled postojanja adekvatne temperature, vlage, pH vrednosti i hranljivog supstrata, za razliku od oralne duplje gde nema odgovarajućeg hranljivog supstrata, a postoji i jača reakcija imuniteta i baktericidnog dejstva pljuvačke. Na osnovu dobijenih rezultata, može se preporučiti uzimanje fecesa i kloakalnih briseva kao pogodnijeg materijala od orofaringealnih briseva za utvrđivanje prisustva salmonela kod gmizavaca i vodozemaca.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Ajayi i saradnika koji su uzimali paralelne kloakalne i orofaringealne briseve od guštera *Agama agama* i izolovali *Salmonella enterica* dvostruko više iz kloakalnih u odnosu na orofaringealne briseve (Ajayi i sar. 2015).

Prisustvo *Salmonella* kod gmizavaca i vodozemaca poprilično je teško otkriti, jer se putem fecesa ove bakterije izlučuju intermitentno, i to često pod uticajem stresa. Prema DuPonte i saradnicima, odnosno Burnham i saradnicima, prevalencija salmonela kod gmizavaca i vodozemaca koja se utvrdi u samim ispitivanjima je daleko ispod prave prevalencije, usled postojanja velikog broja hronično inficiranih jedinki koje samo povremeno izlučuju salmonele iz organizma (DuPonte i sar. 1978; Burnham i sar. 1998). Tako je Readel sa saradnicima 2006. godine utvrdila prisustvo *Salmonella* u značajno većem procentu u

uzorcima sastruganog sadržaja creva crvenouhkih kornjača u odnosu na feces datih životinja, što je autore navelo da zaključie da kornjače kao i većina drugih gmizavaca samo povremeno izlučuju *Salmonella* putem fecesa iz organizma.

I visina temperature koja se primenjuje tokom izolacije *Salmonella* spp. utiče na uspešnost detekcije ove bakterije u ispitivanom materijalu. U većini radova temperatura prilikom faze predobogaćivanja, obogaćivanja i rasta na diferencijalnim i selektivnim podlogama iznosila je između 37°C i 43 °C (Van Schothorst i sar. 1977; Middleton 2008). S jedne strane Harvey i Price odnosno Van Schothorst i saradnici naglašavaju da povišenje temperature doprinosi značajno uspešnijoj izolaciji *Salmonella* iz uzoraka hrane i fecesa, a s druge strane Carlson i Snoeyenbos su izneli mišljenje da određeni serovarijeteti *Salmonella* spp. nisu sposobni da se razmnožavaju na 43 °C (Harvey i Price 1968; Carlson i Snoeyenbos 1972; Van Schothorst i sar. 1977). Tokom ispitivanja, sama izolacija i identifikacija salmonela izvođena je u skladu sa zahtevima standardne metode SRPS EN ISO 6579:2008, i to na temperaturi od 37°C ± 1 °C u fazi predobogaćivanja i prilikom izolacije na diferencijalnim i selektivnim podlogama, odnosno od 41,5 °C ± 1 °C tokom faze obogaćivanja. Imajući u vidu telesnu temperaturu gmizavaca koja iznosi između 18 °C i 32 °C, a i u skladu sa mišljenjem drugih autora, u budućim ispitivanjima vršićemo poređenje standardne sa modifikovanom standardnom metodom u pogledu temperature, kao i trajanja pojednih faza tokom postupka izolacije.

Prilikom paralelnog kultivisanja *Salmonella* suspektnih kolonija na hromogenoj i diferencijalnim podlogama *Salmonella* ID SM2, MacConkey Agar, XLD agar, Hektoen enteric agar najmanje lažno pozitivnih kolonija smo uočili kod *Salmonella* ID SM2 podloge, zatim kod XLD agara i Hektoen enteric agara, i na kraju kod MacConkey Agara. To je posebno značajno kod određenih H<sub>2</sub>S pozitivnih vrsta, na primer *Citrobacter freundii*, što dodatno otežava identifikaciju *Salmonella*.

Primenom Kappa statističke analize utvrđena je izuzetno visoka podudarnost dobijenih rezultata identifikacije *Salmonella* spp. primenom MALDI-TOF MS i rezultata biohemijske identifikacije i serotipizacije *Salmonella*. Kappa vrednost iznosila je k=0,947, što upućuje na zaključak da MALDI-TOF masena spektrometrija u determinaciji roda i vrste *Salmonella* može uspešno zameniti identifikaciju koja se zasniva na ispitivanju fiziološko-biohemijskih osobina bakterija. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora. Ralf

Dieckmann i Burkhard Malorny su 2011. godine izvršili ispitivanje potencijalne upotrebe MALDI-TOF masene spektrometrije za brzo skeniranje i identifikaciju epidemiološki značajnih serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* uključujući *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 4,[5],12:i:-, *S. Virchow*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Choleraesuis*, *S. Heidelberg* i *S. Gallinarum*. Upotrebom bioinformatičkog pristupa, varijacije u sekvencama koje doprinose različitoj jednoj ili više aminokiselina u proteinu, doprinosi inkluzivnosti i ekskluzivnosti specifičnog prepoznavanja najvažnijih serovarijeteta *Salmonella*. Autori su zaključili da se MALDI-TOF masena spektrometrija može primeniti kao brza screening metoda u identifikaciji epidemiološki najznačajnijih serovarijeteta, i da se njenom primenom može značajno redukovati broj izolata čija se potvrđivanje postavlja konvencionalnom serotipizacijom.

Kuhns i saradnici su 2012. godine povrdili mogućnost primene MALDI-TOF masene spektrometrije u određivanju serovarijeteta *Salmonella enterica* uključujući i *S. Typhi*, ali su i istakli neophodnost postojanja detaljne baze masenih spektara koji bi obezbeđivali preciznu identifikaciju, što nije bio slučaj sa korišćenom komercijalnom Biotyper bazom podataka, koja u određenim slučajevima nije mogla precizno da utvrdi serovarijetet. Sa sličnim problemom suočili smo se prilikom korišćenja nama dostupnog MYLA<sup>®</sup> software2 programa, kada nismo mogli da pored vrste i najverovatnije podvrste da bliže odredimo serovarijetet ispitivanog izolata. Deng i saradnici su 2014. godine objavili rad u kome su uporedili rezultate identifikacije upotrebom MALDI-TOF MS i BLAST analize sekvenci PCR amplifikata i zaključili da je analiza sekvenci genoma zlatni standard identifikacije i klasifikacije bakterija, a da je Vitek 2 sistem jednostavan, brz, pouzdan i jeftin metod identifikacije enteropatogena, mada su istakli da nije moguća preciznija determinacija *Salmonella* već samo njenog roda.

U uzorcima od 317 gmizavaca i vodozemaca, poreklom od 42 različite vrste životinja, ustanovljeno je prisustvo *Salmonella* spp. kod 16 različitih vrsta gmizavaca i ukupno kod 57 jedinki, odnosno kod 17,98% ispitanih životinja. Kod uzoraka obuhvaćenih istraživanjem utvrđeno je prisustvo samo vrste *Salmonella enterica*, a ne i vrste *Salmonella bongori*. Od podvrsta *Salmonella enterica* potvrđeno je prisustvo samo dve podvrste *S. enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) i *S. enterica* subsp. *diarizonae* (subspecies IIIb) .

Tokom ispitivanja nije dokazano prisustvo salmonela koje spadaju u preostale četiri podvrste *Salmonella enterica*: *S. enterica* subsp. *salamae* (subspecies II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (subspecies IIIa), *S. enterica* subsp. *houtenae* (subspecies IV) i *S. enterica* subsp. *indica* (ili subspecies VI).

Dobijeni rezultati su očekivani i podudaraju se sa rezultatima drugih autora, kod kojih su svi izolati poreklom od gmizavaca pripadali vrsti *Salmonella enterica*, a ogromna većina podvrstama *S. enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) i *S. enterica* subsp. *diarizonae* (subspecies IIIb). Tako je Clancy sa saradnicima izolovao i identifikovao 175 izolata od gmizavaca, svi izolati su pripadali vrsti *Salmonella enterica* i to najčešće podvrstama *enterica* (45%) i *diarizonae* (24%). I Romero i saradnici su ustanovili sličnu zastupljenost određenih podvrsta *Salmonella enterica* u svom ispitivanju 75 zdravih gmizavaca, a dominantno prisutna podvrsta je bila *S. enterica* subsp. *enterica* (63.6%), a zatim *S. enterica* subsp. *diarizonae* (31.8%) i *S. enterica* subsp. *arizonae* (4.5%). Briones i saradnici su kod 166 ispitanih gmizavaca i vodozemaca ustanovili prisustvo salmonela kod 41,5% jedinki, a najveći broj izolata predstavljala je *S. enterica* subsp. *enterica* (50%), zatim *S. enterica* subsp. *diarizonae* (29,2%), *S. enterica* subsp. *salamae* (12,5%) i na kraju *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (8,3%). Geue i Löschner su ustanovili prisustvo salmonela u fecesu 86 od 159 ispitanih gmizavaca (54,1%). Svi izolati su pripadali vrsti *Salmonella enterica* i to podvrsti I - *enterica* (n=46) i IIIb - *diarizonae* (n=30), ali i podvrsti II *salamae* (n=3), IIIa *arizonae* (n=6) i IV *houtenae* (n=2) (Geue i Löschner, 2002).

U našem ispitivanju od kornjača izolovani su samo sojevi koji su pripadali *S. enterica* subsp. *enterica* (24 izolata – 100% od svih izolovanih sojeva), od guštera 10 sojeva *S. enterica* subsp. *enterica* (64,29%) i 4 soja *S. enterica* subsp. *diarizonae* (35,71%), i od zmija 8 sojeva *S. enterica* subsp. *enterica* (42,11%) i 11 sojeva *S. enterica* subsp. *diarizonae* (57,89%).

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora, koji su ustanovili višu prevalenciju *S. enterica* subsp. *diarizonae* kod zmija u odnosu na kornjače i guštere. Tako su Schellings i saradnici izolovali od gmizavaca salmonele koje su pripadale najčešće podvrstama *S. enterica* subsp. *diarizonae* i *S. enterica* subsp. *enterica* (Schellings i sar. 2011). Kod zmija je 69% izolata salmonela pripadalo *S. enterica* subsp. *diarizonae* a 26% *S. enterica* subsp. *enterica*, a kod guštera su podjednako bili zastupljeni sojevi ove dve podvrste *S.*



*enterica*. I Kuroki sa saradnicima je utvrdio kod 41,1% ispitanih zmija slobodnih u prirodi prisustvo *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (Kuroki i sar. 2013). Pored navedene podvrste, kod zmija obuhvaćenih istraživanjem ustanovljeno je prisustvo samo još jedne podvrste *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i to kod 12,6 % jedinki.

Kod ispitanih vodozemaca nije ustanovljeno prisustvo bakterija iz roda *Salmonella*, i to je u potpunom skladu sa najvećim brojem radova drugih autora u svetu. Tako je Pflieger sa saradnicima zaključio 2003. godine da je pojava bakterija iz roda *Salmonella* kod vodozemaca veoma retka, a Briones godinu dana kasnije da je čak u potpunosti odsutna (Pflieger i sar. 2003; Briones i sar. 2004). Ipak ne treba u potpunosti isključiti rizik od infekcije ljudi i životinja od vodozemaca. Postoje i radovi koji ukazuje na moguću infekciju ljudi salmonelama poreklom od vodozemaca, pa čak i pojave epidemija koje su posledica kontakta ljudi sa ovim životinjama (Srikantiah i sar. 2004; Mermin i sar. 2004).

Kao što je već predstavljeno u rezultatima od ukupno ispitanog 301 gmizavca *Salmonella enterica* je izolovana od 57 jedinki, odnosno 18,93%. Iz ovde iznetih podataka, jasno je da su bakterije iz roda *Salmonella*, relativno često prisutne u populaciji raznih vrsta gmizavaca (zmije, gušteri, kornjače), i da po pravilu ne dovode klinički manifestnih infekcija, što je takođe u potpunosti u skladu sa nama dostupnim naučnim podacima koji tretiraju istu problematiku.

*Salmonella enterica* je izolovana kod 24 od 152 ispitivane kornjače, 14 od 76 ispitivanih guštera i 19 od 73 ispitivane zmije, a time je prevalencija iznosila 15,79%, 18,42% i 26,03%. Utvrđena viša prevalencija *Salmonella enterica* kod zmija u odnosu na guštere i kornjače u skladu je sa rezultatima drugih autora (Geue i Löschner, 2002; Corrente i sar. 2004).

Utvrđena prevalencija salmonela kod gmizavaca u radovima drugih autora, veoma je različita i zavisila je veličine uzorka, vrsta životinja koje su bile obuhvaćene ispitivanjem, njihovim staništem kao i različitim godišnjim dobom kada su vršena ispitivanja. Ustanovljene razlike zavisile su od broja uzetih uzoraka od jedinki, jednom ili više puta u određenim vremenskim razmacima. Kako je poznato da se salmonele izlučuju iz domaćina intermitentno veći broj uzoraka povećava analitičku osetljivost otkrivanja prisustva salmonela.

Schellings sa saradnicima 2011. godine istraživala je prisustvo *Salmonella* kod 504 gmizavca u Australiji i dobila je rezultate koji se podudaraju sa rezultatima naših ispitivanja. Izolovala je uzročnika kod 27,6% ispitanih uzoraka, od toga u najvišem procentu kod zmija 69,2%, guštera 21,7% i na kraju kornjača 2% (Scheelings i sar. 2011).

Prevalencija *Salmonella* spp. kod zmija je i prema radovima drugih autora visoka i kreće se od 15% koliko je ustanovio Gopee sa saradnicima na Trinidadu, 24% u Austriji prema Pflgeru i saradnicima, pa do 64,5% i 69,7% u Brazilu i Tajvanu, prema Bastosu odnosno Chenu sa saradnicima (Gopee i sar. 2000; Pflger i sar. 2003; Bastos i sar. 2008; Chen i sar. 2010).

Od ukupno 42 ispitane vrste životinja, izolati *Salmonella enterica* su poticali od 16 različitih vrsta gmizavaca i to: šumske kornjače (*Testudo hermannii*), barske kornjače (*Emys orbicularis*), crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta elegans*), zelembaća (*Lacerta viridis*), iguane (*Iguana iguana*), bradate agame (*Pogona vitticeps*), leopard gekona (*Eublepharis macularius*), gecka (*Hemitheconyx caudicinctus*), sudanskog oklopnog guštera (*Gerrhosaurus major*), ribarice (*Natrix tessellata*), smuka (*Zamenis longissimus*), poskoka (*Vipera ammodytes*), boe (*Boa constrictor*), kalifornijske kraljevske zmije (*Lampropeltis getula californiae*), pitona (*Python regius*) i mlečne zmije (*Lampropeltis triangulum*).

Kod šest vrsta gmizavaca, obuhvaćenih ovim ispitivanjem, *Salmonella enterica* je izolovana kod 40 ili više procenata jedinki, i to kod boe i mlečne zmije 40%, ribarice 50%, poskoka 54,55%, kao i sudanskog oklopnog guštera i kalifornijske kraljevske zmije 100%. Kako su samo jedan sudanski oklopni gušter i dve kalifornijske kraljevske zmije ispitani, zbog malog broja uzoraka nije moguće izvršiti adekvatnu analizu dobijenih rezultata. Tokom istraživanja ispitano je 5 mlečnih zmija i boe, 6 ribarica, 11 poskoka i 25 pitona, a dobijeni rezultati jasno ukazuju na višu prevalenciju salmonela kod zmija u odnosu na kornjače i guštere. Interesantno je da je u visokom procentu prisustvo salmonela dokazano kod zmija slobodnih u prirodi, što je verovatno povezano sa godišnjim dobom hvatanja i uzorkovanja. Izuzev sezone parenja i zimovanja zmije vode samostalni ili usamljenički život. Kako je uzorkovanje sprovedeno krajem proleća i početkom leta, kada je sezona parenja zmija u toku, moguće je da je široka raširenost salmonela posledica njihove aktivnosti i brojnih međusobnih kontakata. Pored toga, u zoološkom vrtu u Beogradu i na Paliću, mali je broj zmija koje se

drže pojedinačno u zasebnim terarijumima, tako da nema međusobnog kontakta između jedinki.

S druge strane kod šumske kornjače, crvenouhe kornjače i barske kornjače salmonele su ustanovljene kod 15,38%, 16,67% odnosno 18,75% ispitanih jedinki. Veći broj uzoraka je prikupljen tokom jeseni kada je spoljašnja temperatura bila često između 10 °C - 15°C, što je dovelo do ulaska u hibernaciju i snižavanje metaboličkih aktivnosti kornjača. Imajući ovu činjenicu u vidu, može se i objasniti relativno nizak nivo prevelencije salmonela kod kornjača u ispitivanim kloakalnim brisevima.

U zavisnosti od prirode staništa i držanja gmizavaca, po 19 sojeva *Salmonella* spp. izolovano je od 57 jedinki slobodnih u prirodi, 156 držanih u zoološkom vrtu i 88 čuvanih kao kućni ljubimci, što u procentima iznosi 33,33%, 12,18% i 21,59%.

Od 24 soja *Salmonella* izolovana od 152 kornjače, 8 je poticalo od jedinki slobodnih u prirodi, 12 iz zoološkog vrta i 4 od kućnih ljubimaca, što u odnosu na ukupan broj ispitanih kornjača po prirodi staništa i držanja 25, 120 i 7 u procentima je iznosilo 32%, 10% i 57,14%. Od 14 sojeva *Salmonella* izolovanih od 76 guštera, 1 je poticao od jedinke slobodne u prirodi, 3 iz zoološkog vrta i 10 od kućnih ljubimaca, što u odnosu na ukupan broj ispitanih guštera po prirodi staništa i držanja 11, 18 i 47 u procentima je iznosilo 9,09%, 16,67% i 21,27%. Od 19 sojeva *Salmonella* izolovanih od 73 zmije, 10 je poticalo od jedinki slobodnih u prirodi, 4 iz zoološkog vrta i 5 od kućnih ljubimaca, što u odnosu na ukupan broj ispitanih zmija po prirodi staništa i držanja 21, 18 i 34 u procentima je iznosilo 47,62%, 22,22% i 14,71%.

Statističkom analizom utvrđena je statistički značajna razlika u raširenosti *Salmonella* kod kornjača i zmija u zavisnosti od prirode staništa i držanja. Kod kornjača gajenih kao kućni ljubimci prisustvo *Salmonella* je statistički značajno više nego kod kornjača slobodnih u prirodi ili držanih u zoološkom vrtu  $p=0.0002$ . Kod zmija u prirodi prisustvo *Salmonella* je statistički značajno više nego kod zmija držanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci  $p=0.023708$ .

U poređenju sa drugim autorima koji su ustanovili prisustvo salmonela kod i preko 50% ispitanih jedinki, relativno niska prevalencija je ustanovljena kod gmizavaca držanih u

zoološkom vrtu ili čuvanih kao kućni ljubimci (Martínez Barreda i sar. 1999; Corrente i sar. 2004).

Scheeling i saradnici su utvrdili značajnu statističku razliku kod prisustva gmizavaca u zatočeništvu, držanih u zoološkom vrtu odnosno gajenih u kući, kod kojih je prevalencija salmonela iznosila 46.8%, u odnosu na slobodne u prirodi kod kojih je prevalencija iznosila 14.0%. (Scheelings i sar. 2011). Geue i Löschner su ustanovili prisustvo salmonela čak kod 88,9% gmizavaca iz prodavnica egzotičnih ljubimaca, a kod 58,5% gmizavaca slobodnih u prirodi. Autori su istakli značaj kontrolnih mera i održavanja higijene i značajno niži procenat inficiranih jedinki kod iskusnih odgajivača (Geue i Löschner, 2002).

Takođe i radovi drugih autora ukazuju na višu prevalenciju salmonela kod gmizavaca držanih u zoološkom vrtu ili čuvanih kao kućni ljubimci. Držanje gmizavaca u grupama potencira njihovu intezivnu kompeticiju u datoj sredini ali i veću izloženost fecesu drugih jedinki i posledično češću transmisiju uzročnika bolesti uključujući i salmonele.

Zajec i saradnici su kod 87.5 % ispitanih zmija, 15 belouški i 1 smukulje - lažne šarke, ustanovili prisustvo *Salmonella* spp. (Zajec i sar. 2016). Iako su belouške i smukulja poticale sa istog lokaliteta, različiti serovarijeteti *Salmonella* su utvrđeni kod ove dve vrste zmija. Način ishrane u velikoj meri doprinosi je zastupljenosti različitih serovarijeteta *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca. Tako na primer belouška živi u blizini vode i hrani se vodozemcima, a smukulja voli suve područja i hrani se uglavnom gušterima, ređe vodozemcima i sitnim glodarima. U skladu da načinom ishrane različita je i zastupljenost određenih serovarijeteta salmonela. Isti serovarijeteti kod belouški naveli su autore da zaključe da je to posledica kontakta tokom parenja ili grejanja na suncu.

Nakon sprovedene identifikacije i serotipizacije od ukupno 57 izolovanih sojeva utvrđeno je prisustvo 41 soja *Salmonella enterica* subspecies *enterica* i 16 sojeva *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*, što predstavlja 71,93 % odnosno 28,07% od ukupnog broja izolata.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora. Tako je Kuroki sa saradnicima izolovao *Salmonella enterica* tokom svog tri godine dugog ispitivanja, koje je trajalo od juna 2006. do maja 2009. godine, kod 51 od ukupno ispitanih 87 zmija, što je iznosilo 58,6%. Kod jedinki obuhvaćenih istraživanjem kod 41,1% otkriveno je prisustvo *S. enterica* subspecies

IIIb (subsp. *diarizonae*), kod 12,5% *S. enterica* subspecies I (subsp. *enterica*), kod 6,9% *S. enterica* subspecies IV (subsp. *houtenae*) i kod 1,1% *S. enterica* subspecies IIIa (subsp. *arizonae*).

Utvrđivanjem antigenske građe izolata *Salmonella enterica* utvrđeno je da su pripadali 14 različitih serovarijeta *S. enterica* subsp. *enterica* i 10 različitih serovarijeteta *S. enterica* subsp. *diarizonae*.

Prema podacima kojima raspolažemo od ukupno utvrđenih 24 serovarijeteta, po prvi put je identifikovano u Srbiji 13 serovarijeteta i to: *S. Ago*, *S. Apapa*, *S. Benin*, *S. Finkenwerder*, *S. Wagenia*, IIIb 17:l,v;z, IIIb 17:z10:e,n,z15, IIIb 18:l,v;z, IIIb 47:-:z35, IIIb 50:r;z, IIIb 35:i:z35, IIIb 50:i:z i IIIb 61:c:z35.

Za identifikovani serovarijetet IIIb 17:l,v;z je potrebna potvrda u supranacionalnoj referentnoj laboratoriji, WHO *Salmonella* Reference Centre Pasteur Institute Paris, jer nije naveden u postojećoj White-Kauffmann-Le minor šemi.

Od ukupno 57 izolata *Salmonella enterica* najveći broj su predstavljali serovarijeteti *S. Thompson* 9 izolata, *S. Umbilo* 6 izolata, *S. Ago* 5 izolata, *S. Benin* 4 izolata i *S. Apapa* 3 izolata. Svi izolati *S. Thompson* i *S. Umbilo* poticali su od kornjača, i to barske i crvenouhe kornjače, *S. Ago* od bradate agame i leopard gekona, *S. Benin* pitona i mlečne zmijske i *S. Apapa* leopard gekona i pitona. Izolati *S. Thompson* i *S. Umbilo* poticali su iz zoološkog vrta, a *S. Ago*, *S. Benin* i *S. Apapa* od guštera i zmijske gajenih kao kućni ljubimci. Zabeleženi su slučajevi pojave istog serovarijeteta *Salmonella* kod različitih vrsta gmizavaca u domaćinstvu, što ukazuje na mogućnost širenja infektivnog agensa u određenom okruženju. Tako je *S. Apapa* izolovana od dva leopard gekona i jednog pitona iz istog domaćinstva, *S. Ago* od guštera, bradate agame i leopard gekona, držanih u susednim terarijumima, što nameće kao potrebu uvođenja adekvatnog gajenja i održavanja higijene.

Od serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* izolovanih od gmizavaca u Srbiji kod ljudi često su izolovani *S. Enteritidis*, *S. Thompson* i *S. Hadar*, dok su sporadično ustanovljeni *S. Glostrup*, *S. Bispebjerg* i *S. Potsdam*.

Drugi autori su u većem procentu utvrdili prisustvo salmonela koje pripadaju serovarijetetima za koje je poznato da uzrokuju salmonelozu ljudi. U ispitivanju koje su

sproveli Romero i saradnici 63.6% izolata je pripadalo serovarijetetima sa zoonoznim potencijalom.

Pfleger i saradnici, kao i Murray, izneli su mišljenje da najznačajniji serovarijeteti koji prouzrokuju salmonelozu ljudi i životinja, uključujući *S.Typhimurium* i *S.Enteritidis*, se ne pojavljuju često kod gmizavaca i vodozemaca (Pfleger i sar. 2003; Murray 2000). S druge strane, Fuller sa saradnicima opisao je krajem 2005. i početkom 2006. godine epidemiju izazvanu *S.Typhimurium* tokom koje je obolela 21 osoba u Minesoti, Mičigenu, Pensilvaniji i Vajomingu, uključujući i tri učenika koja su tokom nastave imali kontakt sa zmijama (Fuller i sar. 2008). Nakon sprovedene epidemiološke istrage utvrđeno je da je izvor infekcije bila kontaminirana zamrznuta hrana za zmije proizvedena u Teksasu i prodavana putem interneta. Infekcije ljudi su nastale direktnim kontaktom sa zmijama ili indirektno preko kontaminiranih površina.

Tokom našeg ispitivanja izolovana je *S. Enteritidis* od barska kornjača držane u zoološkom vrtu. Imajuću u vidu mogućnost kontakta inficirane jedinke sa posetiocima ovaj nalaz upućuje na neophodnost uvođenja periodičnih laboratorijskih pregleda životinja na prisustvo salmonela. Friedman i saradnici u januaru 1996. godine potvrdili su epidemiju salmoneloze kod 65 dece koja su bila u kontaktu sa komodskim varanom (*Varanus komodoensis*) u zoološkom vrtu u Denveru (Friedman i sar. 1998). Od 39 dece izolovana je *S. Enteritidis*, a na osnovu procenta obolelih 4,3% i broja posetioca autori su izračunali da je još najmanje 315 osoba bilo inficirano. Na osnovu epidemiološke analize utvrđen je statistički značajno manji broj obolelih kod osoba koje su oprale ruke nakon posete zoološkom vrtu, što ističe potrebu održavanja lične higijene i pranja ruku nakon kontakta sa životinjama.

*S. Thompson* može da prouzrokuje epidemije kod ljudi i tako je u Holandiji između avgusta i decembra 2012. godine potvrđeno 1.149 slučajeva salmoneloze ljudi uzrokovanih navedenim serovarijetetom, a 4 osobe su preminule (Friesema i sar. 2013 ). Izvor ove najveće epidemije u Holandiji prouzrokovane salmonelama bio je dimljeni losos, a procenjuje se da je ukupno 23.000 ljudi bilo inficirano. Poput nas, i drugi autori ustanovili su prisustvo *S. Thompson* u ispitivanim uzorcima poreklom od gmizavaca što nesumnjivo

predstavlja potencijalnu opasnost po zdravlje ljudi (Kikillus i sar. 2011; Kuroki i sar. 2013; Clancy i sar. 2016 ).

*S. Apapa* koja je izolovana u našem istraživanju od leopard gekona i pitona, izolovana je od bradate ageme u Hrvatskoj, a potvrđene su i infekcije ljudi u Nemačkoj i SAD uzrokovane ovim serovarijetetom, nakon kontakta sa gmizavcima (Cooke i sar. 2009; Lukac i sar. 2015).

Nagli porast popularnosti egzotičnih kućnih ljubimaca, pre svega zmija, doveo je do drastičnog povećanja broja slučajeva salmoneloze ljudi koja je povezana sa prethodnim kontaktom sa gmizavcima, a Buck i Nicholls su izneli još pre dvadeset godina da je ovo jedan od najznačajnijih novih zdravstvenih problema ljudi (Buck i Nicholls, 1997).

U Švedskoj su de Jong i saradnici utvrdili drastično povećanje incidencije salmoneloze ljudi povezane sa gmizavcima nakon prestanka laboratorijskog ispitivanja uvoznih pošiljki egzotičnih životinja na salmonele (de Jong i sar. 2005). Nakon sprovedene kampanje podizanja svesti vlasnika gmizavaca o riziku od infektivnih oboljenja uzrokovanih mikroorganizmima poreklom od ovih kućnih ljubimaca, incidencija salmoneloze ljudi povezana sa gmizavcima smanjila se sa 0,79 na 0,46 slučajeva na 100.000 ljudi. Autori su zaključili da strogo kontrolisani uvoz životinja kao i jačanje pozornosti i edukacija stanovništva predstavljaju efektivne mere koje doprinose očuvanju javnog zdravlja.

Kada su u pitanju najčešći serovarijeteti gmizavaca kućnih ljubimaca koji se dovode u vezu sa infekcijama ljudi, serovarijeteti poznati kao REPAS (Reptile-Exotic-Pet-Associated-Salmonellosis), sledeći su izolovani tokom ispitivanja *S. Apapa*, *S. Eastbourne*, *S. Potsdam* i veći broj *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* od kojih je najznačajnija prema literaturnim podacima IIIb (6),14 : z10 : z.

Kikillus i saradnici su ustanovili kod 11,4% od 378 ispitanih gmizavaca na Novom Zelandu prisustvo salmonela, a od izolata najčešći serovarijeteti bili su *S. Onderstepoort* (30.2%), *S. Thompson* (20.9%), *S. Potsdam* (14%), *S. Wangata* (14%), *S. Infantis* (11.6%) i *S. Eastbourne* (2.3%) (Kikillus i sar. 2011). Navedeni serovarijeteti su i ranije utvrđeni kod ljudi i gmizavaca, uključujući i obolele osobe na Novom Zelandu. I pored toga što je Srbiji na drugom kraju sveta, u našem ispitivanju smo i mi otkrili *S. Thompson*, *S. Potsdam* i *S. Eastbourne*, što ukazuje da prisustvo ovih serovarijeteta u našoj zemlji i potencijalni rizik po zdravlje ljudi.

Primenom disk difuzione i mikrodilucione metode u bujonu utvrđena je svih 57 izolata *Salmonella enterica* osetljivost prema svim ispitivanim antimikrobnim sredstvima: ampicilinu, cefotaksimu, hloramfenikolu, ciprofloksacinu, gentamicinu, nalidiksinskoj kiselini, tetraciklinima i trimetoprimu sa sulfametoksazolom. Kako nije kod izolata utvrđena rezistencija prema antibioticima i hemoterapeuticima nije ni sprovedeno ispitivanje prisustva određenih gena rezistencije odnosno pojave mutacija u genomu bakterija. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Schroter i saradnika iz 2004. godine, koji nije utvrdio prisustvo kod salmonela izolovanih od zmija rezistenciju prema penicilinima, cefalosporinima, karbapenemima, aminoglikozidima i fluorohinolonima (Schroter i sar. 2004). Bastos i saradnici 2008., Smith i saradnici 2012., Kuroki i saradnici 2013., Zajec i saradnici 2013., kao i Schmidt i saradnici 2014. godine ispitivali su osetljivost izolata salmonela poreklom od gmizavaca, od kojih se velika većina odlikovala osetljivošću prema svim antibioticima. Kod manjeg broja izolata utvrđena je rezistencija samo prema streptomycinu. Romero i saradnici su otkrili rezistenciju kod 2 od 22 soja *Salmonella enterica* izolovanih od gmizavaca držanih u zoološkom vrtu, i to jednog soja prema streptomycinu, a jednog soja prema ampicilinu i amoksicilinu sa klavulanskom kiselinom (Romero i sar. 2016). Clancy i saradnici su svojoj retrospektivnoj analizi pojave salmonela kod gmizavaca u zoološkom vrtu u Bronxu zaključili da se rezistencija retko pojavljivala, izuzev očekivane rezistencije kod Gram negativnih bakterija prema klindamicinu, eritromycinu, penicilinu i rifampicinu (Clancy i sar. 2016).

S druge strane, Ebani i saradnici su utvrdili prisustvo multiple rezistencije sojeva *Salmonella enterica* izolovanih od gmizavaca držanih u velikom pet shopu-u, i to prema ampicilinu, amoksicilinu, gentamicinu, eritromycinu i sulfisoksazolu. Corrente i saradnici su ustanovili u visokom procentu kod ispitivanih izolata salmonela rezistenciju prema kolistin sulfatu (58.7%), sulfametoksazolu (55.5%), streptomycinu (32.6%), tetraciklinima (19.6%), ampicilinu (17.4%) i nalidiksinskoj kiselini (13.1%) (Corrente i sar. 2004). U slučaju dve prethodno navedene reference, uzorci su poticali iz jedne odgajivačnice ili prodavnice kućnih ljubimaca, pa je moguće da je visoka prevalencija rezistentnih sojeva posledica prisustva jednog dominantnog klona u određenoj sredini, odnosno češće primene antibiotika i posledično većeg selektivnog pritiska na osetljive sojeve. I drugi autori su otkrili rezistenciju *Salmonella* poreklom od gmizavaca i vodozemaca (Chen i sar. 2010), čak i prema hinolonima (Guerra i



sar. 2010), što u potpunosti opravdava zabrinutost od prenošenja gena rezistencije od bakterija poreklom od gmizavaca u bakterije prisutne kod ljudi (Frye i Jackson, 2013).

Dobijeni rezultati ukazuju da su salmonele rasprostranjenje kako kod slobodnih u prirodi gmizavaca tako i kod onih držanih u zoološkim vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci, uključujući i serovarijetete koje se retko nalaze kod toplokrvnih životinja i ljudi, ali i one koje uzrokuju salmonelozu. Zbog toga posebna pažnja treba da bude usmerena na dijagnostiku i prevenciju prenošenja salmonela sa gmizavaca i vodozemaca na ljude i domaće životinje.

Neophodno je pripremiti priručnik ili uputstvo za sprečavanje prenošenja salmonela sa gmizavaca na ljude, u kome bi se detaljno opisale odgovarajuće higijenske mere kao i istakla neophodnost izbegavanje kontakta ljudi sa imunokompromitovanim zdravstvenim stanjem sa egzotičnim životinjama. Nakon kontakta sa kornjačama, gušterima ili zmijama potrebno je oprati ruke sapunom i toplom vodom, a vlasnici ovih kućnih ljubimaca treba da vode računa o sprečavanju kontaminacije hrane i zabrani slobodnog kretanja gmizavaca u prostorijama gde borave deca. Imunodeficientne osobe, trudnice i deca mlađa od 5 godina ne bi trebala da budu u kontaktu sa gmizavcima, a potrebno je kontinuirano sprovoditi kampanju podizanja svesti o potencijalnom riziku po zdravlje ljudi od uzročnika zoonoza poreklom od egzotičnih životinja.

Pronalaženje brojnih, uključujući i veoma retkih, serovarijeteta, *Salmonella enterica* kod gmizavaca slobodnih u prirodi upućuje na zaključak da one predstavljaju jedan od rezervoara i izvora ove bakterije u prirodi. Tako na primer nakon uginuća zmija one mogu postati hrana lisica ili divljih svinja. Prisustvo *Salmonella* je dokazano kod 6% divljih svinja ispitanih u Poljskoj, od kojih su neki bili veoma retki serovarijeteti poput *S. Tripoli* (Zajac i sar. 2016). Konkretni dokaz o mogućem prenošenju *Salmonella* od zmija na ljude su *S. enterica* subspecies *diarizonae* 40:i:z53,z54 i *S. enterica* subspecies *diarizonae* 48:k:z57 koji su otkrivene kod šarki u Nemačkoj ali i kod ljudi u Poljskoj (Krautwald-Junghanns i sar. 2013; Issenhuth-Jeanjean i sar., 2014). Bez sumnje potrebna su daljna i opsežnija istraživanja u cilju otkrivanja uloge gmizavaca u epizootologiju i epidemiologiju ne samo salmoneloze nego i drugih infektivnih oboljenja.

Na kraju imajući u vidu prisustvo brojnih serovarijeteta kod gmizavaca u Srbiji, neophodno je razviti program sprečavanja pojave salmoneloze ljudi prouzrokovane sojevima *Salmonella enterica* poreklom od zmija, guštera i kornjača, pobuditi svest opšte javnosti o potencijalnom riziku i pokrenuti programe edukacije vlasnika egzotičnih kućnih ljubimaca i zaposlenih u zoološkim vrtovima o prevenciji mogućih infekcija.

Ispitivanjem u okviru doktorske disertacije po prvi put je u našoj zemlji ustanovljeno prisustvo i raširenost serovarijeteta *Salmonella enterica* kod gmizavaca i ukazano na rizik po zdravlje ljudi. Više je nego evidentno da se u Republici Srbiji ne sprovodi kontrola zdravstvenog stanja i prisustva salmonela kod gmizavaca, uključujući i uvoznih pošiljki gmizavaca, da ne postoji ni jedna registrovana odgajivačnica egzotičnih životinja, kao i da je izostala bliska saradnja državnih organa nadležnih za zaštitu ugroženih vrsta i veterinarstvo.

U cilju zaštite i unapređenja zdravlja i dobrobiti životinja, kao i sprečavanja pojave, otkrivanja, sprečavanja širenja, suzbijanja i iskorenjivanja zaraznih bolesti životinja, kao i bolesti koje se sa životinja mogu preneti na ljude, neophodno je uspostaviti adekvatnu veterinarsku kontrolu držanja, gajenja i prometa egzotičnih životinja. Tek tada kada se uspostavi sistem registracije i identifikacije ovih životinja biće moguće utvrditi njihov tačan broj, a programom edukacije vlasnika i efikasnijom kontrolom smanjiti rizik od pojavljivanja zaraznih bolesti koje direktno ili indirektno mogu da ugroze zdravlje životinja ili ljudi.

## 7. ZAKLJUČCI

1. U uzorcima od 317 gmizavaca i vodozemaca, poreklom od 42 različite vrste životinja, ustanovljeno je prisustvo *Salmonella* spp. kod 16 različitih vrsta gmizavaca i ukupno kod 57 jedinki, odnosno kod 17,98% ispitanih životinja.
2. Primena MALDI-TOF masene spektrometrije (matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry) u determinaciji roda i vrste *Salmonella* može uspešno zameniti identifikaciju koja se zasniva na ispitivanju fiziološko-biohemijskih osobina bakterija. Primenom Kappa statističke analize i izračunate Kappa vrednosti  $k=0,947$  utvrđena je izuzetno visoka podudarnost dobijenih rezultata identifikacije *Salmonella* spp. primenom MALDI-TOF MS i konvencionalne mikrobiološke metode biohemijske identifikacije.
3. Kod vodozemaca obuhvaćenih ispitivanjem velike zelene žabe (*Pelophylax ridibundus*), šumske krastave žabe (*Bufo bufo*), žutotrbe ognjene žabe (*Bambina variegata*), zelene krastače (*Bufo viridis*), šarenog daždevnjaka (*Salamandra salamandra*) nije ustanovljeno prisustvo *Salmonella* spp.
4. *Salmonella enterica* je izolovana iz uzoraka poreklom od 16 različitih vrsta gmizavaca i to: šumske kornjače (*Testudo hermannii*), barske kornjače (*Emys orbicularis*), crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta elegans*), zelembaća (*Lacerta viridis*), iguane (*Iguana iguana*), bradate agame (*Pogona vitticeps*), leopard gekona (*Eublepharis macularius*), gecka (*Hemitherconyx caudicinctus*), sudanskog oklopnog guštera (*Gerrhosaurus major*), ribarice (*Natrix tessellata*), smuka (*Zamenis longissimus*), poskoka (*Vipera ammodytes*), boe (*Boa constrictor*), kalifornijske kraljevske zmije (*Lampropeltis getula californiae*), pitona (*Python regius*) i mlečne zmije (*Lampropeltis triangulum*).
5. *Salmonella enterica* je izolovana od 57 od 301 ispitanih gmizavaca, odnosno od 18,93% jedinki, i to 41 soj *Salmonella enterica* subspecies *enterica* i 16 sojeva *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*.
6. *Salmonella enterica* je izolovana od 24 od 152 ispitane kornjače, 14 od 76 ispitanih guštera i 19 od 73 ispitane zmije, a time je prevalencija u odnosu na broj jedinki obuhvaćenih ispitivanjem iznosila 15,79%, 18,42% i 26,03%.

7. Prevalencija *Salmonella enterica* kod kornjača gajenih kao kućni ljubimci je statistički značajno viša nego kod kornjača slobodnih u prirodi ili čuvanih u zoološkom vrtu,  $p=0.0002$ .
8. Prevalencija *Salmonella enterica* kod zmija slobodnih u prirodi je statistički značajno viša nego kod zmija čuvanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci,  $p=0.0237$ .
9. Izolati salmonela su spadali u 24 serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, od kojih je po prvi put identifikovano u Srbiji 13 serovarijeteta: *S. Ago*, *S. Apapa*, *S. Benin*, *S. Finkenwerder*, *S. Wagenia*, IIIb 17:l,v;z, IIIb 17:z10:e,n,z15, IIIb 18:l,v;z, IIIb 47:-:z35, IIIb 50:r;z, IIIb 35:i:z35, IIIb 50:i:z i IIIb 61:c:z35.
10. Kod gmizavaca obuhvaćenim ispitivanjem utvrđeni su serovarijeteti *S. Enteritidis*, *S. Thompson* i *S. Hadar* koji su u Srbiji često ustanovljeni kod ljudi, odnosno *S. Glostrup*, *S. Bispebjerg* i *S. Potsdam* čije je prisustvo potvrđeno kod ljudi u Srbiji.
11. Kod gmizavaca obuhvaćenim ispitivanjem utvrđeni su serovarijeteti *Salmonella enterica* subspecies *enterica* *S. Apapa*, *S. Eastbourne*, *S. Potsdam* i veći broj serovarijeteta *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* uključujući i IIIb (6),14:z10:z, a koji spadaju u REPAS serovarijetete *Salmonella enterica*, serovarijeteti prisutne kod gmizavaca gajenih kao kućni ljubimci i koji se dovode u vezu sa infekcijama ljudi.
12. Primenom disk difuzione i mikrodilucione metode utvrđena je kod svih 57 izolata osetljivost prema ispitivanih antibioticima.
13. Dobijeni rezultati jasno potvrđuju da zmije, gušteri i kornjače, slobodne u prirodi, držane u zoološkom vrtu i gajene kao kućni ljubimci, mogu biti rezervoar različitih podvrsta i serovarijeteta *Salmonella enterica* i da predstavljaju rizik po zdravlje ljudi, što nameće potrebu za sistematskim pristupom, opsežnijim ispitivanjima prisustva i moguće epidemiološke povezanosti salmoneloze gmizavaca i ljudi.

## 8. LITERATURA

1. Abatcha M. G., Zakaria Z., Kaur D. G., Thong K. L. (2013) Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* Spp. Isolated from Snakes in Peninsular, Malaysia. J. Vet. Adv., Vol 3, No 12, pp 306-312.
2. Abulreesh H. H. (2012) *Salmonellae* in the environment. In: *Salmonella – Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*. Annous, B. A and GuLTRer, J. B. (Editors), Chapter 2, Pp.19-50. InTech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia (ISBN: 979-953-307-690-3).
3. Altman R., Gorman J.C., Bernhardt L.L., Goldfield M. (1972) Turtle-associated salmonellosis ii. the relationship of pet turtles to salmonellosis in children in New Jersey. Am J Epidemiol Vol 95 No 6 pp 518 -520.
4. Anonymous - AVMA American Veterinary Medical Association (2007) U.S. Pet Ownership & Demographics Sourcebook: American Veterinary Medical Association.
5. Anonymous - CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (1995) Reptile-associated salmonellosis—selected states, 1994-1995. MMWR Morb Mortal Wkly Rep Vol 44 No 17 pp 347-350.
6. Anonymous - CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2003) Reptile-associated salmonellosis—selected states, 1998-2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep Vol 52 No 49 pp 1206-1209.
7. Anonymous - CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2009) Multistate outbreak of human *Salmonella* Typhimurium infections associated with aquatic frogs - United States, 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009 Vol 58 No 51 pp. 1433-1436.
8. Anonymous - CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) M07-A9 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition, Vol. 32 No. 2.
9. Anonymous - CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) M02-A11 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition, Vol. 32 No.1.

10. Anonymous - CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2014) M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Vol. 34 No. 1.
11. Anonymous - Pravilnik o prekograničnom prometu i trgovini zaštićenim vrstama (2009) Sl. glasnik RS, br. 99/09 i 6/14
12. Anonymous - Pravilnik o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva (2010) Sl. glasnik RS, br. 5/2010.
13. Anonymous - Pravilnik o uslovima koje moraju da ispunjavaju odgajivačnice za životinje (2012) Službenom glasniku Republike Srbije br. 14/12.
14. Anonymous – Institut za standardizaciju Srbije SRPS EN ISO 6579:2008 Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp. Sl. glasnik RS, br. 104/8.
15. Anonymous - Uredba o stavljanju pod kontrolu korišćenja i prometa divlje flore i faune, Sl. glasnik RS“, br.31/2005, 45/2005., 22/2007, 38/2008 i 9/2010.
16. Anonymous - Zakon o potvrđivanju Konvencije o međunarodnom prometu ugroženih vrsta divlje faune i flore (2001) Službeni list SRJ-Međunarodni ugovori, br.11/2001.
17. Anonymous - Zakon o zaštiti životne sredine, Sl. glasnik RS, br. 135/2004, 36/2009, 36/2009 i 72/2009.
18. Anonymous - Zakon o zaštiti prirode (2009) Službeni glasnik RS, br. 36/2009.
19. Anonymous - Zakon o dobrobiti životinja (2009) Službeni glasnik RS br.41/2009.
20. Anonymous - Zakon o veterinarstvu Službeni glasnik RS br. 91/2005, 30/2010 i 93/2012.
21. Ajayi J., Ogunleye A., Happi A., Okunlade A. (2015) Bacteria Isolated from the Oral and Cloaca Swabs of Lizards Co-habiting with Poultry in Some Poultry Farms in Ibadan, Oyo State, Nigeria. Afr. J. Biomed. Res. Vol.18, pp. 211- 215.
22. Bastos H.M. (2012). *Salmonella* Associated with Snakes (Suborder Serpentes). Clín. Vet. Vila Sab. Sã. Pal., pp 81-98.
23. Bertrand S, Rimhanen-Finne R, Weill FX, Rabsch W, Thornton L, Perevoscikovs J, van Pelt W, Heck M (2008) *Salmonella* infections associated with reptiles: the current situation in Europe. Euro Surveill, Vol 13, No 24, pp 18902.
24. Bhatta, D.R. Bangtrakulnonth, A. Tishyadhigama, P. Saroj, S.D. Bandekar, J.R. Hendriksen, R.S. Kapadnis, B.P. (2008) Serotyping, PCR, phage-typing and antibiotic

- sensitivity testing of *Salmonella* serovars isolated from urban drinking water supply systems of Nepal. Letters in Applied Microbiology Vol 44 No 6, pp. 588-594.
25. Bopp D.J., Baker D.J., Thompson L., Saylor A., Root T.P., Armstrong L., Mitchell K., Dumas N.B., Arruda Musseret K. (2016) Implementation of *Salmonella* serotype determination using pulsed-field gel electrophoresis in a state public health laboratory, *Diagn Microbiol Infect Dis* <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.023>
  26. Bradley T., Angulo F., Mitchell M. (2001) Public health education on *Salmonella* spp and reptiles. *J Am Vet Med Assoc.* Vol 219 No 6 pp 754-755.
  27. Briones V., Tellez S., Goyache J., Ballesteros C., Lanzarot M.P., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J. (2004) *Salmonella* diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain. *Environ Microbiol.* 6, pp .868–871.
  28. Buck J.J., Nicholls S.W. (1997). *Salmonella* arizona enterocolitis acquired by an infant from a pet snake. *J. Pediatr, Gastro.Nutrit.* Vol 25, No 2, pp 248-249.
  29. Burnham, B.R., D.H. Atchley, R.P. DeFusco, K.E. Ferris, J.C. Zicarelli, J.H. Lee, and F.J. Angulo (1998) Prevalence of fecal shedding of *Salmonella* organisms among captive Green Iguanas and potential public health implications. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213:48–50.
  30. Caldwell ME, Ryerson DL (1939) Salmonellosis in certain reptiles. *J Infect Dis* Vol 65 pp 242-245.
  31. Cambre R.C. , Green D.E. , Smith E.E. , Montali R.J. , Bush M. (1980) Salmonellosis and arizonosis in the reptile collection at the National Zoological Park. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Vol 177, No 9, pp 800-803.
  32. Carlson V.L., Snoeyenbos G.H. (1972) Relationship of population kinetics of *Salmonella* Typhimurium and cultural methodology. *American Journal of Veterinary Research* Vol 33, pp 177-184.
  33. Chen Chun-Yu, Wan-Ching Chen, Shih-Chien Chin, Yen-Hsueh Lai, Kwong-Chung Tung, Chien-Shun Chiou, Yuan-Man Hsu, Chao-Chin Chang (2010) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonellae* isolates from reptiles in Taiwan. *J Vet Diagn Invest* 22 pp 44–50.
  34. Chiodini R.J., J.P.Sundberg. (1982) Salmonellosis in reptiles: a review. *American Journal of Epidemiology.* Vol 113., No 5, pp 494-499.

35. Clancy M.M., Davis M., Valitutto M., Nelson K., Sykes J.M.IV (2016) *Salmonella* infection and carriage in reptiles in a zoological collection. JAVMA, Vol 248, No. 9, pp 1050-1059.
36. Cohen, H. J., Mechanda, S. M., Lin, W. (1996) PCR amplification of the fimA gene sequence of *Salmonella* typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* spp. Applied and Environmental Microbiology, Vol 62, pp 4303–4308.
37. Cohen M.L., Potter M., Pollard R., Feldman R.A. (1980) Turtle-associated salmonellosis in the United States. Effect of Public Health Action, 1970 to 1976 JAMA 1980 Vol 243 No 12 pp 1247-1249.
38. Cohen N.D., Neiberghs H.L., McGruder E.D., Whitford H.W., Behle R.W., Ray P.M., Hargis B.M. (1993) Genus-specific detection of salmonellae using the polymerase chain reaction (PCR) Vet Diagn Invest Vol 5, pp.368-371.
39. Cooke F.J., De Pinna E., Maguire C., Guha S., Pickard D.J., Farrington M., Threlfall J.E. (2009) First Report of Human Infection with *Salmonella enterica* Serovar *Apapa* Resulting from Exposure to a Pet Lizard. Journal Of Clinical Microbiology Vol. 47, No.8, pp 2672–2674.
40. Corrente M., Madio A., Friedrich K.G., Greco G., Desario C., Tagliabue S., D'Incau M., Campolo M., Buonavoglia C. (2004) Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. J Appl Microbio, Vol 96, pp 709–715.
41. Crosa, J. H., D. J. Brenner, W. H. Ewing, S. Falkow (1973) Molecular relationships among the salmonellae. J. Bacteriol. Vol 115, pp 307–315.
42. de Jong B, Andersson Y, Ekdahl K (2005) Effect of regulation and education on reptile-associated salmonellosis. Emerg Infect Dis, Vol 11, No 3, pp 398-403.
43. DuPonte, M.W., R.M. Nakamura, and E.M.L. Chang (1978) Activation of latent *Salmonella* and *Arizona* organisms by dehydration in Red-eared Turtles, *Pseudemys scripta elegans*. American Journal of Veterinary Research Vol 39, pp 529-530.
44. Ebani V.V., Cerri D., Fratini F., Meille N., Valentini P., Andreani E. (2005) *Salmonella enterica* isolates from faeces of domestic reptiles and a study of their antimicrobial in vitro sensitivity. Res Vet Sci Vol 78, pp 117–121.
45. Ewing WH. (1972) The nomenclature of *Salmonella*, its usage, and definitions for the three species Can J Microbiol. Vol 18, No11, pp 1629-1637.



46. Friedman C.R., Torigian C., Shillam P.J., Hoffman R.E., Heltzel D., Beebe J.L., Malcolm G., DeWitt W.E., Hutwagner L, MS, Griffin P.M. (1998) An outbreak of salmonellosis among children attending a reptile exhibit at a zoo. *The journal of pediatrics*, Vol. 132, No 5, pp. 802-807.
47. Friesema I., de Jong A., Hofhuis A., Heck M., van den Kerkhof H., de Jonge R., Hameryck D., Nagel K., van Vilsteren G., van Beek P., Notermans D., van Pelt W. (2013) Large outbreak of *Salmonella* Thompson related to smoked salmon in the Netherlands, August to December 2012. *Euro Surveill*. Vol 19, No.39 Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=209182>
48. Frye F.L. (1991) *Infectious diseases : fungal actinomycetes, bacterial, rickettsial, and viral diseases. Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry.* Melbourne, Fla, Krieger Publishing.
49. Frye J.G., Jackson C.R. (2013) Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Front Microbiol* doi:10.3389/fmicb.2013.00135.
50. Fuller C. C., Jawahir S. L., Leano F. T., Bidol S. A., Signs K., Davis C., Holmes Y., Morgan J., Teltow G., Jones B., Sexton R. B., Davis G. L., Braden C. R., Patel N. J., Deasy III M. P., Smith K. E. (2008) A Multi-state *Salmonella* Typhimurium Outbreak Associated with Frozen Vacuum-packed Rodents used to Feed Snakes. *Zoonoses and Public Health*, Vol. 55, No. 8-10, pp 481–487.
51. Geue L., Loschner U. (2002) *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. *Vet Microbiol* Vol 84, pp 79–91.
52. Gopee N.V., Adesiyun A.A., Caesar K. (2000). Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. *J. Wild. Dis.*, Vol 2, pp 284-293.
53. Goupil B.A., Trent A.M., Bender J., Olsen K.E., Morningstar B.R., Wünschmann A. (2012) A longitudinal study of *Salmonella* from snakes used in a public outreach program *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, Vol 43, No 4, pp 836-841.
54. Grier J.W., Bjerke M.S., Nolan L.K. (1993) Snakes and the *Salmonella* situation. *Bull Chicago Herp Soc* Vol 28, pp 3–59.
55. Grimont P.A.D., Weill F.X. (2007) *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* ; Institut Pasteur, pp 1-166.

56. Guerra, B. Helmuth, R. Thomas, K. Beutlich, J. Jahn, S. Schroeter, A. (2010) Plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Salmonella* spp. isolates from reptiles in Germany J Antimicrob Chemother Vol 65, No9 pp. 2043-2045.
57. Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M., Fields P.I., Bockemühl J., Grimont P.A.D., Weill F.-X. (2010). Supplement 2003–2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res. Microbiol. 161:26–29
58. Harvey R.W.S., Price T.H. (1968) Elevated temperature incubation of enrichment media for isolation of *Salmonellas* from heavily contaminated materials. Journal of Hygiene Cambridge Vol 66, pp 377.
59. Hinshaw, W.R. McNeil, E. (1944) Gopher snakes as carriers of salmonellosis and paracolon infection. Cornell Vet., Vol 24, pp. 248-254.
60. Hinshaw W.R. McNeil, E. (1946) Paracolon type 10 from captive rattlesnakes. J.Bacteriol. Vol 51, pp. 397-398.
61. Hoelzer K., Moreno Switt A.I., Wiedmann M, (2011) Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. Veterinary Research Vol 42, pp 34.
62. Issenhuth Jeanjean S., Roggentin P., Mikoleit M., Guibourdenche M., de Pinna E., Nair S., Field P.I., Weill F.X. (2014) Supplement 2008 – 2010 (no. 48) to White – Kauffmann – Le Minor scheme. Research in Microbiology, Vol 165, pp 526-530.
63. Jackson C.G., Jackson. M.M.(1971) The frequency of *Salmonella* and *Arizona* microorganisms in Zoo turtles. Journal of wildlife diseases. Vol.7, pp 130-132.
64. Janda M.J., Abbott S.L. (1998) The enterobacteria, Philadelphia, Lippincott-Raven.
65. Kaufmann A.F., Fox M.D., Moriss L.L. (1972) Turtle-associated salmonellosis. III. The effect of environmental salmonellae in commercial turtle breeding ponds. Am J Epidemiol Vol 95 No 6 pp 521-517.
66. Kikillus K.H., Gartrell B.D., Motion E. (2011) Prevalence of *Salmonella* spp and serovars isolated from captive exotic reptiles in New Zealand. New Zealand Veterinary Journal. Volume 59, Issue 4, pp 174-178.
67. Krautwald-Junghanns M.E. , Stenkat J. , Szabo I. , Ortlieb F. , Blindow I. , Neul A.K. , Pees M. , Schmidt V. (2013 ) Characterization of *Salmonella* isolated from captive and free-living snakes in Germany. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift. Vol 126, No 5-6, pp 209-215.

68. Kuroki T., Tomoe Ishihara T., Furukawa I., Tomomitsu Okatani A., Kato Y. (2013) Prevalence of *Salmonella* in Wild Snakes in Japan. Jpn. J. Infect. Dis., Vol 66, pp 295-298.
69. Lamm SH, Taylor A Jr, Gangarosa EJ, Anderson HW, Young W, Clark MH, Bruce AR (1972) Turtle-associated salmonellosis. I. An estimation of the magnitude of the problem in the United States, 1970-1971. Am J Epidemiol Vol 95 No 6 pp 511-517.
70. Lukac M., Jelic D., Cizelj I., Ivancan D., Horvatek-Tomic D., Prukner-Radovic E., (2012) Venom and intestinal bacterial flora from venomous snakes in Croatia, Proceedings of the Joint 61st WDA/10th Biennial EWDA Conference „Convergence in wildlife health, Lyon 23-27.07. pp 215
71. Lukac, M., Pedersen, K., & Prukner-Radovic, E. (2015). Prevalence of *Salmonella* serovars from captive reptiles from Croatia. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, Vol. 46, No. 2, 234-240.
72. Mader D.R. (2006) Reptile Medicine and Surgery (Second Edition) Saunders Elsevier ISBN: 978-0-7216-9327-9.
73. Malorny B., Hoorfar J., Bunge C., Helmuth R. (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Appl. Environ. Microb., 69: 290-296.
74. Marcus L.C. (2002) Common reptilian zoonoses. Proc NorthAm Vet Conf Small Animal Exotics, Vol 16 pp 822-823.
75. Martínez Barreda C., Gallegos Antúnez D.C., Bär W., Márquez De Bär G., Fernández Cano R., Ruiz Reyes G. (1999) Pet reptiles: a potential source of *Salmonella*. Enf Infec Microbiol, Vol 19, pp 266–269.
76. McQuiston. J.R., Waters J.R., Dinsmore B.A., Mikoleit M.L., Fields P.I. (2011) Molecular Determination of H Antigens of *Salmonella* by Use of a Microsphere-Based Liquid Array. Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 49, No. 2, pp. 565–573.
77. Mermin J, Hoar B, Angulo FJ (1997) Iguanas and *Salmonella* marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. Pediatrics Vol 99, No 3, pp 399-402.
78. Mermin J, Hutwagner L, Vugia D, Shallow S, Daily P, Bender J, Koehler J, Marcus R, Angulo FJ (2004) Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. Clin Infect Dis Vol 38 (Suppl 3), pp 253-261.

79. Middleton D. (2008) The prevalence of *Salmonella* and the spatial distribution of its serovars among New Zealand's native lizards. Master of Science Thesis
80. Mitchell, M.A. & Shane, S.M. (2001). *Salmonella* in reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* Vol. 10, No. 1, pp. 25-35.
81. Olsen SJ, Bishop R, Brenner FW (2001) The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987–1997. *J Infect Dis* Vol 183, pp 753–761.
82. Onderka D.K., Finlayson M.C. (1985) *Salmonella* and salmonellosis in captive reptiles. *Can J Comp Med.* Vol 49, No 3 pp 268 – 270.
83. Page L.A. (1966) Diseases and infectious of snakes: a review. *Bull. wildlife disease assoc.* Vol.2, pp.111-126.
84. Park Y. S., Lee S. R., Kim, Y. G. (2006) Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *The Journal of Microbiology*, Vol 44, pp 92–97.
85. Pasmans F., De Herdt P., Haesebrouck F., Chasseur-Libotte M.L., Ballasina D.L.Ph. (2000) Occurrence of *Salmonella* in tortoises in a rescue centre in Italy, *Veterinary Record*, Vol 146, No 9, pp 256-258.
86. Pasmans F., Martel A., Boyen F., Vandekerchove D., Wybo I., Immerseel F.V., Heyndrickx M., Collard J.M., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2005) Characterization of *Salmonella* isolates from captive lizards. *Vet Microbiol* Vol 110, pp 285–229.
87. Pees M., Rabsch W., Plenz B., Fruth A., Prager R., Simon S., Schmidt V., Münch S., Braun P.G. (2013) Evidence for the transmission of *Salmonella* from reptiles to children in Germany, July 2010 to October 2011. *Euro Surveill.* Vol 18, No 46 Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20634>
88. Pelton J.A., Dilling G.W., Smith B.P., Jang S. (1994) Comparison of a commercial antigen-capture ELISA with enrichment culture for detection of *Salmonella* from fecal samples *J Vet Diagn Invest* Vol 6, pp 501-502.
89. Pflieger S., Benyr G., Sommer R., Hassl A.(2003) Pattern of *Salmonella* excretion in amphibians and reptiles in a vivarium. *Int J Hyg Environ Health.* Vol 206, No 1, pp 53-59.

90. Popoff MY, Bockemühl J, Gheesling LL. (2004) Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* Vol 155, pp 568-570.
91. Pui, C. F. Wong, W.C. Chai, L.C. Tunung, R. Jeyaletchumi, P. Noor Hidayah, M.S. Ubong, A. Farinazleen, M.G Cheah, Y.K. Son, R. (2011) Review article *Salmonella*: a food borne pathogen, *International Food Research Journal* Vol 18, pp 465–473.
92. Readell M. Anne, C.A. Phillips, T.L. Goldberg. (2009) Prevalence of *Salmonella* in intestinal mucosal samples from free-ranging red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) in Illinois. *Herpetological Conservation and Biology* Vol 5, No 2, pp 207-213.
93. Romero S.B., Kvapil P., Čížek A., Knotek Z., Masaříková M., Myšková P. (2015) The incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* species isolated from cloacae of captive veiled chameleons *Acta Vet. Brno*, Vol 84, pp 209-213.
94. Romero S.B., Kvapil P., Čížek A., Knotek Z. (2016) The prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* species isolated from captive reptiles at Ljubljana zoo. *Slov Vet Res*, Vol 53, No 1, pp 43-48.
95. Rosenstein B.J., Russo P., Hinchliffe M.C. (1965) A family outbreak of salmonellosis traced to a pet turtle. *N Engl J Med*, Vol 272, pp 960–961.
96. Saelinger, C.A., G.A. Lewbart, L.S. Christian, C.L. Lemons. (2006) Prevalence of *Salmonella* spp in cloacal, fecal and gastrointestinal mucosal samples from wild North American turtles. *Journal of the American Veterinary medical association*. Vol. 229 No2, pp 266-268.
97. Sanya D., Douglas T., Roberts R. (1997) *Salmonella* infection acquired from reptilian pets. *Arch Dis Child* Vol 77, pp 345-346.
98. Savage M., J.R. Baker. (1980) Incidence of *Salmonella* in recently imported tortoise. *Veterinary record* Vol 106, pp 558.
99. Scheelings TF, Lightfoot D, Holz P. (2011) Prevalence of *Salmonella* in Australian reptiles *J Wildl Dis*. Vol 4, No 1, pp 1-11.
100. Schroter M., Roggentin P., Hofmann J., Speicher A., Laufs R., Mack D. (2004) Pet Snakes as a Reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *Diarizonae* (Serogroup IIIb): a Prospective Study. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 1, pp 613-615.
101. Skov R, Matuschek E, Sjölund-Karlsson M, Åhman J, Petersen A, Stegger M, Torpdahl M, Kahlmeter G (2015) Development of a Pefloxacin Disk Diffusion Method

- for Detection of Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella* enteric. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 53, No 11, pp 3411- 3417.
102. Smith, N. H., Selander R.K. (1991) Molecular genetic basis for complex flagellar antigen expression in a triphasic serovar of *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol 88, pp 956–960.
103. Soumet C., Ermel G., Rose V., Rose N., Drouin P., Salvat G., Colin P. (1999) Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* typhimurium and *Salmonella* enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology*. Vol 29, pp 1–6.
104. Srikantiah P., Lay J. C., Hand S., Crump J. A., Campbell J., Van Duyne M. S., Bishop R., Middendor R., Currier M., Mead P. S., Mølbak K. (2004) *Salmonella* enterica serotype Javiana infections associated with amphibian contact, Mississippi, 2001, *Epidemiology and Infection* Vol 132, No 2, pp 273-281.
105. Srikantiah P., Lay J.C., Crump J.A. (2002) An outbreak of *Salmonella* Javiana associated with amphibian contact—Mississippi, 2001) Presented at the International Conference on Emerging Infectious Diseases Atlanta, Georgia.
106. Swaminathan B., Barrett T.J., Hunter S.B., Tauxe R.V. (2001) CDC PulseNet Task Force. PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*. Vol 7, No 3, pp 382–389.
107. Swamy S.C., Barnhart H. M., Lee M. D., Dreesen, D. W. (1996) Virulence of determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 62, 3768–3771.
108. Tan S., Gyles C.L., Wilkie B.N. (1997) *Veterinary Microbiology* Comparison of an LPS-specific competitive ELISA with a motility enrichment culture method (MSRV) for detection of *Salmonella* typhimurium and *S. enteritidis* in chickens. Vol 56, pp 79-86.
109. Tauxe R.V., Rigau-Perez J.G., Wells J.G., Blake P.A.. (1985) Turtle-associated salmonellosis: Hazards of the global turtle trade. *Journal of the American Medical Association* Vol 254, No 2, pp 237-239.

110. Tille P.M. (2014) Chapter 20 – Enterobacteriaceae. In Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, Elsevier Mosby St.Louis, Missouri ISBN: 978-0-323-08330-0, pp 307-328.
111. Van Schothorst M., Van Leusden F. M., Jeunink J., De Dreu J. (1977) Studies on the Multiplication of *Salmonellae* in Various Enrichment Media at Different Incubation Temperatures, J Appl Bacteriol. Vol 54, No2, pp. 209-15.
112. Waltman D.A., Horne A.M., Pirkle C., Dickson T.G. (1991) Use of Delayed Secondary Enrichment for the Isolation of *Salmonella* in Poultry and Poultry Environments *Avian Diseases* Vol. 35, No. 1, pp. 88-92.
113. Wells, E.V. Boulton, M. Hall, W, Bidol, S.A. (2004) Reptile-Associated Salmonellosis in Preschool-Aged Children in Michigan, January 2001–June 2003 *Clinical, Infectious Diseases* Vol 39, No 5, pp. 687-691.
114. Wikström V.O., Fernström L.L., Melin L., Boqvist L. (2014) *Salmonella* isolated from individual reptiles and environmental samples from terraria in private households in Sweden, *Acta Veterinaria Scandinavica* Vol 56, No 7.
115. Woodward D.L., Khakhria R., Johnson W.M. (1997) Human salmonellosis associated with exotic pets. *J Clin Microbiol* Vol 35, No 11, pp 2786-2790.
116. Zajac M., Wasyl D., Różycki M., Bilska-Zajac E., Fafiński Z., Iwaniak W., Krajewska M., Hoszowski A., Konieczna O., Fafińska P., Szulowski K. (2016) Free-living snakes as a source and possible vector of *Salmonella* spp. and parasites. *European Journal of Wildlife Research* DOI: 10.1007/s10344-016-0988-y.

## 9. OBAVEZNI PRILOZI

### Biografija autora

Kandidat Ivan Bošnjak je završio osnovnu školu u Melencima, a gimnaziju smer matematičko-programerski saradnik u Zrenjaninu. Fakultet veterinarske medicine u Beogradu upisuje 1993. godine i završava isti 09.05.2000. godine sa prosečnom ocenom 8,05 stičući zvanje diplomiranog veterinara.

Po sticanju diplome Ivan Bošnjak je obavio jednogodišnju stručnu praksu u javnoj veterinarskoj stanici u Zrenjaninu, a 2001. godine položio je stručni ispit i zasnovao stalni radni odnos u JVS Zrenjanin. U privatnoj veterinarskoj stanici u Melencima počeo je da radi 2004. godine. Magistarske studije je upisao 2004. godine i položio planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 8,60. Magistarsku tezu pod naslovom „Uporedna ispitivanja hematoloških i biohemijskih parametara krvi konja inficiranih sa askaridama i strongilidama” odbranio je na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu 19.03.2010. godine. Rezultati magistarske teze predstavljeni su na naučnim skupovima u inostranstvu u Manhajmu u Nemačkoj 2008. godine i u Beču u Austriji 2014.godine, kao i na nacionalnom skupu na epizootiološkim danima u Somboru 2009. godine.

Kandidat Ivan Bošnjak je nastavio svoje usavršavanje u oblasti menadžmenta kvaliteta, bezbednosti hrane i zaštite životne sredine i sertifikovani je auditor za standarde ISO 9001, ISO 14000 i ISO 22000 kao i za HACCP. Stečeno znanje je primenio u stručno konsultativnim poslovima u oblasti veterine i tehnologije i higijene hrane.

Kandidat mr Ivan Bošnjak tokom svoje dosadašnje naučno istraživačke karijere je objavio ili prezentovao osam radova u zemlji i inostranstvu, uključujući jedan rad iz kategorije M23, pet M34 i jedan M64.



## Prilog 1.

### Izjava o autorstvu

Potpisani-a mr Ivan Bošnjak

broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Ispitivanje prisustva, serotipske pripadnosti i rezistencije prema antimikrobnim sredstvima

Salmonella spp. kod gmizavaca i vodozemaca

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

### Potpis doktoranda

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Prilog 2.

### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora     mr Ivan Bošnjak    

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program   Doktorske akademske studije  

Naslov rada   Ispitivanje prisustva, serotipske pripadnosti i rezistencije prema antimikrobnim sredstvima *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca  

Mentor   Prof. Dr Dejan Krnjić  

Potpisani   mr Ivan Bošnjak  

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje prisustva, serotipske pripadnosti i rezistencije prema antimikrobnim sredstvima *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.