

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ
СМЕР ТЕХНОЛОГИЈА НАМИРНИЦА АНИМАЛНОГ ПОРЕКЛА

Младен П. Рашета

УЧЕСТАЛОСТ НАЛАЗА *SALMONELLA* SPP.
НА ТРУПОВИМА БРОЈЛЕРА И ЊИХОВ
ЗНАЧАЈ ЗА БЕЗБЕДНОСТ ХРАНЕ

Докторска дисертација

Београд 2014.

UNIVERSITY IN BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
TECHNOLOGY OF FOOD OF ANIMAL ORIGIN

Mladen P. Rašeta

FREQUENCY OF *SALMONELLA* SPP.
FINDINGS ON BROILER CARCASSES AT
SLAUGHTERLINE AND IT'S SIGNIFICANCE
FOR THE FOOD SAFETY

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

МЕНТОР

Др Владо Теодоровић, редовни професор

Факултет Ветеринарске медицине, Београд

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Др Владо Теодоровић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Београд

Др Оливера Бунчић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Београд

Др Вера Катић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Београд

Др Дејан Видановић, научни сарадник

Ветеринарски специјалистички Институт, Краљево

Др Владимир Полачек, научни сарадник

Ветеринарски специјалистички Институт, Нови Сад

Својим учитељима, колегама, пријатељима и породици дугујем безграничну захвалност. Њихова помоћ, подршка, пренето знање и искуство, пажња, љубав и стрпљење су умногоме допринели мом личном и научном развоју.

Захваљујем се члановима Комисије на коректном и професионалном односу пуном разумевања, корисним сугестијама при критичкој оцени рада, подршци и помоћи.

Посебно захваљујем мом ментору проф. др Влади Теодоровићу за стрпљење и разумевање током израде докторске дисертације.

Посебно се захваљујем проф. др Оливери Бунчић и проф. др Вери Катић на корисним дискусијама и саветима који су ме усмеравали током израде дисертације.

Захваљујем се Институту за хигијену и технологију мяса, директору др Весни Матекало Сврак на разумевању при реализацији ове дисертације, помоћи при савладавању свих препрека у експериментима, од самог почетка рада.

Захваљујем се колегама др Дејану Видановићу из Ветеринарског Специјалистичког Института у Краљеву и др Владимиру Полачеку из Ветеринарског Специјалистичког Института у Новом Саду, на стручној и људској помоћи при изради докторске дисертације.

Захваљујем се колегама Института, посебно Војину Вранићу и Стевану Секису на пренетом знању и искуству, пруженим приликама и саветима.

Захваљујем се др Лазару Турубатовићу, руководиоцу пројекта: „Унапређење и развој хигијенских и технолошких поступака у производњи намирница животињског порекла у циљу добијања квалитетних и безбедних производа конкурентних на светском тржишту“, без чије помоћи и подршке извођење експерименталног дела дисертације не би било могуће.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације део су Пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије III 46009, под називом: „Унапређење и развој хигијенских и технолошких поступака у производњи намирница животињског порекла у циљу добијања квалитетних и безбедних производа конкурентних на светском тржишту”

УЧЕСТАЛОСТ НАЛАЗА *SALMONELLA* SPP. НА ТРУПОВИМА БРОЈЛЕРА И ЊИХОВ ЗНАЧАЈ ЗА БЕЗБЕДНОСТ ХРАНЕ

АПСТРАКТ

На основу података из литературе у настајању салмонелозе људи значајну улогу имају месо и производи од меса бројлера, а повећана резистенција на антибиотике отежава лечење салмонелозе људи. Стога је у оквиру ове докторске дисертације за циљ постављено да се сагледају извори инфекције салмонелама бројлера на фармама и да се утврди учесталост налаза *Salmonella* spp. на труповима бројлера на линији клања. Поред тога циљ истраживања је био да се упореде изолати са трупова бројлера, са сојевима салмонела изолованих у случајевима обољења људи, као и да се испита осетљивост изолата салмонела према антимикуробним лековима.

Како би се утврдио степен присуства *Salmonella* spp., на линији клања бројлера током четири године (2008-2011), испитано је 520 узорака коже врата бројлера формираних са 1560 трупова бројлера узетих са линије клања у три кланице. У циљу утврђивања учесталости налаза *Salmonella* spp. на труповима живине и сагледавања извора контаминације испитано је 200 узорака коже врата живине формираних од 600 трупова из три објекта различитог капацитета клања. За детекцију *Salmonella* spp. у узорцима коже врата коришћена је као скрининг метода аутоматизовани квалитативни тест miniVidas (BioMérieux, Француска). Узорци који су на скрининг тесту били позитивни су засејани на селективну подлогу – ксилоза лизин деоксихолат агар (XLD агар) и диференцијалну подлогу - Rambach агар (комерцијална подлога Merck, Немачка) у циљу изоловања *Salmonella* spp. Фенотипска идентификација изолата *Salmonella* spp. извршена је применом класичних и комерцијалних биохемијских тестова (помоћу аутоматског идентификационог система API 20E BioMérieux, Француска) и серолошком типизацијом коришћењем поливалентних, односно моновалентних антисерума, према Кауфман-Вајтовој (Kauffman-White) шеми. Генотипска идентификација *Salmonella* spp., изолованих са трупова живине, рађена је молекуларно-биолошким методама (Гел електрофореза у пулсном пољу - PFGE). Филогенетско поређење *Salmonella* spp. изолованих са трупова живине са сојевима *Salmonella* spp. изолованим у случајевима обољења људи, извршено је методом анализе генома - CHEF-DR III (Bio-Rad, California). Осетљивост изолата

Salmonella spp. на антимикуробне лекове испитана је диск дифузионом методом на Mueller-Hinton агару према CLSI упутству коришћењем дискова: (ампицилин 10µg, цефотаксим 30 µg, ципрофлоксацин 5 µg, гентамицин 10 µg, налидиксична киселина 30 µg, тетрациклин 30 µg, триметоприм сулфаметоксазол 30 µg) произвођача Oxoid, Basingstoke, UK.

Налаз *Salmonella* spp. на труповима заклане живине у периоду од 2008-2010. године кретао се од $5,46 \pm 0,95$ до $6,04 \pm 0,87$ позитивних узорака на 50 испитаних трупова. У 2011. години услови хигијене процеса производње су побољшани и просечан налаз *Salmonella* spp. на труповима заклане живине се смањео на $2,27 \pm 1,19$ позитивних узорака на 50 испитаних трупова. Како би се утврдио извор контаминације трупова бројлера на линији клања праћено је порекло бројлера. Највећи број бројлера са налазом *Salmonella* spp. је потицао са фарме I, 11 узорака (55%). Током новог производног циклуса извршено је више испитивања на фарми I. Ни у једном узорку брисева са појилице, хранилица и зидова објекта на месту где се спајају са подовима, као и узорака хране за бројлере и воде за напајање није утврђено присуство салмонела. Испитивањем потенцијалних извора салмонела средином тога бројлера *Salmonella* spp. су изоловане из свих испитаних узорака назувки, простирке и шартираних трупова пилића као и 20% узорака инсеката. Присуство *Salmonella* spp. није утврђено ни у једном од 20 трупова једнодневних уинулих пилића, што је искључило инкубаторску станицу као извор инфекције *Salmonella* spp. Резултати овог испитивања су показали да инфекција бројлера салмонелама потиче из амбијента и од живих вектора на фарми. Применом биосигурносних мера на фарми I налаз салмонела је смањен са 55% на 10% узорака коже врата бројлера. Салмонеле изоловане из узорака коже врата бројлера су серолошком типизацијом идентификоване као сероваријетет *S. Infantis* (6,7 : r : 1,5).

На основу резултата PFGE салмонеле изоловане из узорака коже врата бројлера су сврстане у 7 генотипова или генетских профила. Изолати салмонела у оквиру истог генетског профила су показивали степен генетске сличности од 100%. Назив сваког генетског профила је формиран тако што се прво слово односи на врсту микроорганизма, следећа три слова на утврђени сероваријетет, затим се следећа два слова односе на употребљени ензим, уз четири броја који започињу са 0001. Профил SINFXB0001 је утврђен код 11 изолата од којих су 8 пореклом са коже врата бројлера (4, 5, 7, 8, 10, 11, 12,

15), док су три соја изолована у случају обољења људи (18,19, 20). Профили SINFXB0002 (16, 17) и SINFXB0003 (2, 3) су утврђени код изолата пореклом са коже врата бројлера, док је профил SINFXB0004 (21, 22) утврђен код сојева изолованих у случају обољења људи. Профили SINFXB0005 (9), SINFXB0006 (14) и SINFXB0007 (1) су утврђени код по једног изолата. Коефицијент сличности између генетских профила износи 92%. Антимикробни профил присутног микроорганизма умногоме зависи од лека који се користи на фарми бројлера, више него од лека избора који се користи у терапији људи. Један изолат, пореклом са кожа врата бројлера, профила SINFXB0002, је био резистентан на ампицилин, цефотаксим/клавуланску киселину и налидиксичну киселину, а други изолат истог профила је био резистентан на ампицилин, налидиксичну киселину и тетрациклине. Профили SINFXB0003, SINFXB0005, SINFXB0006 и SINFXB0007 који су показивали идентичну антимикробну резистенцију на ампицилин, цефотаксим/клавуланску киселину, налидиксичну киселину и тетрациклине, пореклом су са кожа врата бројлера. Профил SINFXB0004 је показивао идентичну антимикробну резистенцију као и доминантни профил SINFXB0001 на ампицилин, налидиксичну киселину и тетрациклине.

Профил резистенције на антимикробне лекове салмонела, изолованих из узорака коже врата бројлера и у случајевима обољења људи, се разликовао. Утврђена је резистенција на ампицилин и налидиксичну киселину (95,5%), тетрациклин (91%) и на цефотаксим (68,25%). Изолати салмонела су били осетљиви и интермедијарно осетљиви на триметоприм/сулфаметоксазол, ципрофлоксацин и на гентамицин. Додатним поређењем антимикробних профила утврђено је да су изолати пореклом од живине резистентни на ампицилин, цефотаксим/клавуланску киселину, налидиксичну киселину и тетрациклине, док су изолати пореклом од оболелих људи резистентни на ампицилин, налидиксичну киселину и тетрациклине.

Кључне речи: *Salmonella* spp., *S. Infantis*, trupovi brojlera, profil rezistencije, genotipizacija

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Хигијена и технологија меса

UDK број: 619:636.5:579

FREQUENCY OF *SALMONELLA* SPP. FINDINGS ON BROILER CARCASSES AT SLAUGHTERLINE AND ITS SIGNIFICANCE FOR THE FOOD SAFETY

ABSTRACT

Based on the literature data, it is assumed that in the human salmonellosis, the important role have poultry meat and poultry products, as the increasing resistance to antibiotics complicates the treatment of salmonellosis. Therefore, in this doctoral dissertation the framework is set to review the sources of salmonella infection in broiler farms and to determine the frequency of *Salmonella* spp. presence on the carcasses of broilers at slaughter line. Besides, the goal of this research is to compare isolates from broiler carcasses with salmonella strains isolated in cases of illness in humans as well as to assess the sensitivity of salmonella isolates to antibiotics. In order to determine the extent of the presence of *Salmonella* spp., on the slaughter line of broilers, during four year period (2008-2011), 520 samples of broiler neck skin, formed from 1560 broiler carcasses on slaughter line, were examined. In order to determine the frequency of *Salmonella* spp. presence on broiler carcasses, and to detect contamination sources, 200 samples of broiler neck skin, formed by 600 carcasses, from three slaughterhouses of different capacities, were examined. For detection of *Salmonella* spp. in broiler skin samples, automated qualitative test miniVidas method (bioMérieux, France) is used as screening method. Samples that were screened tested positive were streaked on selective media - xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar) and differential medium - Rambach agar (Merck, Germany) in order to isolate *Salmonella* spp. Phenotypic identification of isolates of *Salmonella* spp. was performed using conventional and commercial biochemical tests (with automatic identification system API 20E bioMérieux, France) and serological typing by using polyvalent, or monovalent antisera, according to Kauffman-White scheme. Genotypic identification of *Salmonella* spp. isolated from poultry carcasses, were performed with molecular-biological method (gel electrophoresis in pulsed field - PFGE). Phylogenetic comparison of *Salmonella* spp. isolated from poultry carcasses with strains of *Salmonella* spp. isolated cases of the disease in humans, is carried out by the genome analysis - CHEF-DR III (Bio-Rad, California). Sensitivity of isolates of *Salmonella* spp. the antimicrobials tested by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar according to CLSI guide disk usage (ampicillin 10µg, cefotaxime 30 mg, ciprofloxacin 5 mg,

gentamicin 10 mg, nalidixic acid 30 mg, tetracycline 30 mg, trimethoprim sulfamethoxazole 30 mg) manufacturer Oxoid, Basingstoke ,UK.

Tests for the presence of *Salmonella* spp. in broiler neck skin samples were performed using SRPS ISO 6579. Detection of *Salmonella* spp. on the carcasses of slaughtered broilers ranged from $5,46 \pm 0,95$ to $6,04 \pm 0,87$ positive samples of 50 tested samples. In 2011. hygiene conditions of production processes were improved and the average findings of *Salmonella* spp. on the carcasses of slaughtered broilers decreased to $2,27 \pm 1,19$ positive samples, on 50 tested samples.

In order to determine the source of contamination of broiler carcasses on the slaughter line the origin of broilers was monitored. The largest number of broilers with finding *Salmonella* spp. originated from farm I - 11 (55%). During the new production cycle, more tests were performed on farm I. Examining the swabs from drinkers, feeders and walls of the object on the site and at the junction with the floors, as well as samples of feed and water supply, salmonella was not detected. Next test was performed in the middle of the next broiler breeding cycle, when salmonella was detected in 100% samples of shoe covers, rugs and culled carcasses and in 20% of samples of insects. Further investigation was performed on the day old chicken carcasses from the transportation truck. Presence of salmonella was not detected. The gained results excluded the hatchery as the source of *Salmonella* spp. infection. The results of this study showed that *Salmonella* spp. infection of broilers comes from the atmosphere and from farm living vectors. After the application of strict biosecurity measures on farms, the salmonella finding was reduced from 55% to 10% of the samples of neck skin of broilers in the slaughterhouse. Salmonella isolated from broiler neck skin samples were identified with serological typing as serovars of *S. Infantis* (6,7: r: 1,5).

Based on the results of PFGE, Salmonella isolated from broiler neck skin are classified into seven genotypes or genetic profiles. Salmonella isolates within the same genetic profile showed the degree of genetic similarity of 100%. The name of each genetic profile was formed according to marking in which the first letter refers to the type of microorganism, the following three letters to the serovars identified, then the next two letters refer to the used enzyme, then the four numbers that begin with 0001. SINFXB0001 profile was found in 11 strains of which 8 originated from the neck skin of broiler chickens (4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15), while the three

strains were isolated in the case of human disease (18,19, 20) . Profiles SINFXB0002 (16, 17) and SINFXB0003 (2, 3) were found in isolates from broiler neck skin, while the profile SINFXB0004 (21, 22) was found in strains isolated in the case of human diseases. Profile SINFXB0005 (9), SINFXB0006 (14) and SINFXB0007 (1) was determined with only one isolate. The similarity between the genetic profile was 92%. Antimicrobial activity of the microorganism of the present profile greatly depends on the drug used in broiler farms, higher than that of the drug of choice used in the treatment of humans. One isolate, originating from the neck skin of broilers, SINFXB0002 profile, was resistant to ampicillin, cefotaxime / clavulanic acid and nalidixic acid, and other isolates of the same profile was resistant to ampicillin, tetracycline and nalidixic acid. Profiles SINFXB0003, SINFXB0005, and SINFXB0006 SINFXB0007 which showed identical antimicrobial resistance to ampicillin, cefotaxime / clavulanic acid, nalidixic acid and tetracycline, originated from the neck skin of broilers. SINFXB0004 profile showed identical antimicrobial resistance, and as a predominant profile SINFXB0001 ampicillin, nalidixic acid and tetracycline.

Resistance profile of salmonella to antibiotics originating from broiler skin and from affected humans, did differ. Resistance was determined to nalidixic acid and ampicillin (95,5%), tetracycline (91%) and cefotaxime (68,25%). Salmonella isolates were susceptible and intermediately susceptible to trimethoprim / sulfamethoxazole, ciprofloxacin and gentamicin. Comparing the additional antimicrobial profiles it was found that the isolates which are derived from poultry were resistant to ampicillin, cefotaxime / clavulanic acid, nalidixic acid and tetracycline, while isolates originating from human disease showed resistance to ampicillin, tetracycline and nalidixic acid.

Key words: *Salmonella* spp., *S. Infantis*, broiler carcasses, antibiotic profile, genotipization

Science: Veterinary medicine

Field of expertise: Meat Hygiene and technology

No UDK: 619:636.5:579

Садржај:

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	3
2.1. Карактеристике рода <i>Salmonella</i>	3
2.1.1. Таксономија рода <i>Salmonella</i>	3
2.1.2. Морфологија.....	5
2.1.3. Услови за раст.....	5
2.1.4. Биохемијске особине.....	7
2.2. Епидемиологија салмонелозе.....	7
2.3. Налаз салмонела у храни животињског порекла.....	9
2.4. <i>Salmonella</i> Infantis као узрочник обољења људи.....	10
2.5. Епизоотиологија салмонелозе.....	11
2.5.1. Анализа ризика од појаве салмонелозе бројлера.....	12
2.5.2. Налаз <i>Salmonella</i> spp. на фарми.....	13
2.6. Патогенеза салмонелозе.....	16
2.7. Клиничка слика салмонелозе.....	17
2.8. Патоанатомски налаз салмонелозе.....	21
2.9. Терапија салмонелозе.....	23
2.10. Превентива салмонелозе код бројлера.....	24
2.11. Поступци са бројлерима на кланици.....	30
2.12. Присуство салмонела на труповима бројлера.....	32
2.13. Антибиотска резистенција салмонела.....	34
2.14. Изолација и идентификација салмонела.....	37
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА.....	41

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	42
4.1. Узорци коже врата са трупова бројлера	42
4.2. Сојеви микроорганизама.....	42
4.3. Хранљиве подлоге и реагенси.....	42
4.4. Утврђивање присуства антигена салмонела у узорцима.....	45
4.5. Засејавање узорака позитивних на присуство антигена салмонела на хранљиве подлоге.....	48
4.6. Идентификација салмонела поливалентним и моновалентним антисерумима према Kauffman-White схеми.....	50
4.7. Гел електрофореза у пулсном пољу.....	52
4.8. Испитивање осетљивости салмонела на антимикробне лекове.....	56
4.9. Поступци предузети на фарми са које потиче највећи број бројлера код којих је утврђено присуство салмонела.....	58
5. РЕЗУЛТАТИ.....	61
5.1. Резултати утврђивања учесталости налаза салмонела на труповима бројлера на линији клања.....	61
5.2. Резултати испитивања извора инфекције бројлера на фарми.....	64
5.3. Резултати оцене примене биосигурносних мера на фарми на смањење налаза салмонела на труповима бројлера на линији клања.....	68
5.4. Резултати упоређивања генетске сличности салмонела изолованих са трупова бројлера са салмонелама изолованим у случају обољења људи.....	69
5.5. Резултати испитивања осетљивости на антимикробне лекове салмонела изолованих са трупова бројлера и у случајевима обољења људи.....	70
6. ДИСКУСИЈА.....	74
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	88
8. ЛИТЕРАТУРА.....	90

Биографија аутора

Прилог 1.

Прилог 2.

Прилог 3.

1. УВОД

Salmonella spp. су цревни грам негативни микроорганизми који могу да егзистирају као коменсали у гастроинтестиналном тракту животиња и човека, а у одређеним случајевима могу да доведу до болести, коју прате локални (дијареја, бол у стомаку) или системски (бактеријемиа) симптоми. Према епидемиолошким студијама у случајевима салмонелозе људи, пренетих путем хране, најчешћи извор инфекције је храна животињског порекла, а при томе су јаја, живинско и свињско месо најчешће доказани. У последње време пажња истраживача је усмерена на праћење преваленције салмонела код животиња намењених за производњу хране, као и на појаву мултирезистентних сероваријетета салмонела које се путем хране могу пренети на људе. Познавање преваленције салмонела у ланцу хране, обухватајући и примарну производњу, треба да доприноси квантитативној процени ризика од налаза салмонела у живинском месу, као и избору мера за смањење преваленције салмонела у јатима живине.

Иако су дуги низ година познате као узрочници обољења људи, салмонеле и даље представљају претњу по јавно здравље. Салмонелоза представља озбиљан проблем у индустрији хране, доводи до економских губитака, уз увек присутан повишени ризик од тровања људи. У развијеним земљама које примењују програме контроле салмонеле појава салмонелозе људи бележи константан пад. Програми контроле спречавања ширења салмонела у ланцу хране, који обухватају примарну производњу, производњу и промет меса живине, су веома комплексни. Комплексност ланца хране захтева постојање система следљивости. Један од проблема у оквиру програма контроле салмонела у јатима живине, као и негативног утицаја на здравље људи, је и појава мултирезистентних сероваријетета салмонела. За процену ризика од налаза салмонела и предузимање мера за смањење салмонела на труповима живине потребно је успостављање система за брзу детекцију и типизацију салмонела.

Према подацима из литературе, примена мера за контролу салмонеле у јатима живине доводи до смањења преваленције, међутим, појава мултирезистентних сероваријетета као што је *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Java представља глобални проблем за јавно здравље.

Присуство салмонела у гастроинтестиналном тракту бројлера не морају да прате симптоми болести (асимптоматски ток), међутим, у тим случајевима гастроинтестинални тракт живине може да буде извор контаминације трупова на линији клања. За човека највећи ризик представља конзумација недовољно термички третираног контаминираниог меса бројлера. Тачан број оболелих људи услед присуства салмонеле је тешко утврдити због спорадичне појаве болести која се манифестује општим симптомима и тешко се доводи у везу са конзумацијом одређеног типа хране.

Код људи инфекција салмонелама може да се испоји као гастроентеритис, тифоидна грозница, паратифусни синдром, општи бактеријемички синдром или жаришна болест. Честа је и појава асимптоматског клицоноштва.

Од утврђених сероваријетета салмонеле, највише су у случајевима болести пренетих путем хране заступљене *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis (даље *S. Enteritidis*) и *S. Typhimurium*. По наводима Светске здравствене организације (World Health Organization-WHO) *S. Enteritidis* је водећи узрочник салмонелозе људи у протеклих 10 година. Из извештаја Светске здравствене организације, у Републици Србији најчешће изоловани сероваријетети салмонела у случају обољења људи су: *S. Enteritidis* (82,1%) и *Salmonella Typhimurium* (5,4%) и *Salmonella Infantis* (2,5%).

Пилеће месо подразумева месо добијено клањем пилића старости до 120 дана. Под трупом бројлера, у смислу Правилника о квалитету меса пернате живине ("Сл. лист СФРЈ", бр. 1/81 и 51/88), подразумева се тело пилета, очишћено од перја, без главе и врата, без доњих делова ногу, без јестивих и нејестивих делова, са или без коже врата. На тржишту Републике Србије најуобичајенији је упаковани охлађени труп (температура меса у средишњем делу је од од - 0,5° до + 4°C).

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Карактеристике рода *Salmonella*

2.1.1. Таксономија рода *Salmonella*

Царство: *Bacteria*

Тип: *Proteobacteria*

Класа: *Gamma Proteobacteria*

Ред: *Enterobacteriales*

Фамилија: *Enterobacteriaceae*

Род: *Salmonella*

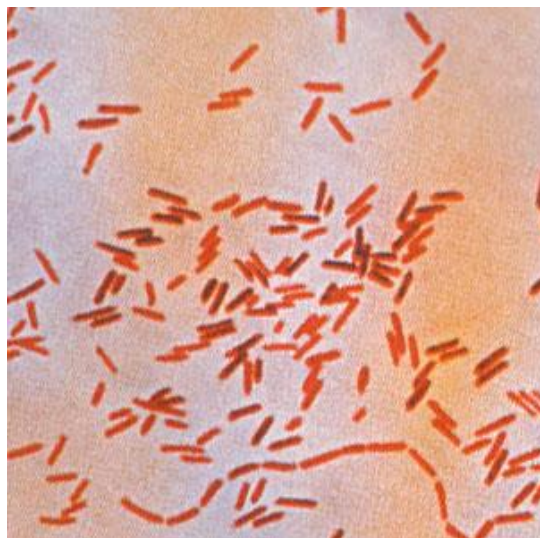
Врсте: *S. enterica* и *S. bongori*

Подврсте: *S. enterica* (*subspecies enterica*, *subspecies salomae*, *subspecies arizonae*, *subspecies diarizonae*, *subspecies houtenae*, *subspecies indica*)

Таксономски посматрано *Salmonella* Enteritidis је *Salmonella enterica* *subspecies enterica* serovar Enteritidis (даље *S. Enteritidis*).

На основу грађе О соматског, Н флагеларног и Vi капсуларног антигена салмонела врсте су подељене на више од 2500 сероваријетета. У последње време неке значајне промене су прихваћене у таксономији салмонела. Иако микробиолози хране, научници и епидемиолози, посебно посматрају сваки од 2.500 постојећих сероваријетета, све салмонеле се деле у две врсте: *Salmonella enterica* и *Salmonella bongori*, док су сероваријетети подељени у пет група у оквиру ове две врсте, а доминантно у *Salmonella enterica*. По усвојеној класификацији сероваријетет *Salmonella* Typhimurium треба да носи назив *Salmonella enterica* *subspecies enterica* serovar Typhimurium (даље: *S. Typhimurium*). Епидемиолошки посматрано, салмонеле могу да се сврстају у три групе (Jay *et al.*, 2005.):

1. Салмонеле патогене само за људе: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* и *S. Paratyphi C*. У ову групу се сврставају узрочници тифоидне и паратифоидне грознице, најтежег обољења које салмонеле изазивају. Тифоидна грозница има најдуже време инкубације, проузрокује највишу телесну температуру и доводи до највећег степена морталитета. *S. Typhi* може да се изолује из крви оболеле особе, понекад из столице и урина.



Слика 1. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Typhi*, бојена по Граму
(<http://textbookofbacteriology.net/salmonella.htm>)

2. Сероваријетети адаптирани на домаћина: *S. Gallinarum* (живина), *S. Dublin* (говеда), *S. Abortus equi* (коњи), *S. Abortus ovis* (овце) и *S. Choleraesuis* (свиње). Сероваријетети из ове групе могу да, пренети путем хране, доведу до обољења људи.
3. Сероваријетети неадаптирани на домаћина (немају специфичност према домаћину) су патогени за човека и животиње. У овој групи салмонела налази се највећи број сероваријетета који се преносе путем хране (*S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*).

Називи салмонела су одређивани на основу међународног договора. Неки сероваријетети салмонела су добили назив према месту где су први пут изоловани (*S. London*, *S. Miami*, *S. Richmond*).

2.1.2. Морфологија

Салмонеле су грам-негативни микроорганизми, штапићастог облика (дужине 2-5 μm и ширине 0,7-1,5 μm). Углавном су покретни микроорганизми (сем *S. Galinarum* и *S. Pullorum*), перитрихо обрасли флагелама. Неке формирају капсулу. Салмонеле су аспорогени аеробни микроорганизми који стварају ендотоксине, распрострањене су у природи при чему су људи и животиње резервоари (James *et al.*, 2005).



Слика 2. Салмонела (<http://www.futurity.org>)

2.1.3. Услови за раст

Салмонеле су релативно отпорне на исушивање, ниске температуре, одређене технолошке процесе (саламурање, NaCl до 4%, NaNO₂ до 350 mg/l; димљење). Салмонела је у окружењу врло постојана. У сасушеним екскрементима остаје витална и до 4 године, у сувој земљи 16 месеци а у влажној 12 месеци, у фецесу 11 месеци, прабини 80 дана. У води преживе и до 3 недеље (Lolin, 1991).

Опсег температура раста салмонела је 5-44°C, док је оптимална температура +37°C. Осетљиве су на више температуре. Време децималне редукције броја салмонела (D вредност) је 4-5 минута при температурама од 60°C (Curtis *et al.*, 2009). У живинском месу, салмонела се по правилу инактивише за 2-6 минута, на 60°C, а на 70°C за 1 минут, са изузетком *S. Seftenberg* (Resanović *et al.*, 2008). Смрзавање неће уништити салмонеле, мада може да их оштети, што по одмрзавању условљава одложен или успорен раст у идеалним условима. Исте ефекте може да има и загревање на сублеталним температурама.

Способност салмонела да формирају биофилм, доприноси њиховом опстанку у спољашњем амбијенту и у објектима за производњу хране (Steenackers *et al.*, 2012). Салмонела може да се умножава у биофилму формираном на алату и опреми, који долазе у директан контакт са храном (Chia *et al.*, 2009). Ћелије у биофилму су потенцијални извор контаминације хране (Wang *et al.*, 2013).

Минимална активност воде у медијуму, до које салмонеле опстају и размножавају се, је 0,93. Салмонеле се умножавају у рН опсегу 4,5 – 9,0, док је оптимум за раст 6,5 – 7,5 (Lolin, 1991).

Током колонизације гастроинтестиналног тракта човека, салмонела преживљава деловање киселог стомачног садржаја, активност жучи налик детергенту, услове смањеног садржаја кисеоника, присуство бројних метаболита резидентне цревне микрофлоре и финално деловање катјонских антимикуробних пептида присутних на површини епителијалне ћелије. Постоје четири главна регулаторна механизма за одговор на стресне услове амбијента - RpoS, PhoPQ, Fur и OmpR/EnvZ. Сем механизма Fur, инактивација гена који кодирају преостала три регулаторна механизма, доводи до смањења вирулентности и тако добијене мутантне бактерије могу да се користе за вакцинацију (Rychlik, Barrow, 2005).

Spector и сарадници (2012) сматрају да су за преживљавање салмонела у измењеним условима одговорни регулатори, за активацију или деактивацију сета гена, као што су: сигма фактори (σ^S , σ^E , и σ^H), двокомпонентни системи везани за фосфор (BaeRS, CpxRA, OmpR-EnvZ, PhoPQ, PmrAB - BasRS и RcsBCD) и регулатори транскрипције (SoxS/SoxR, OxyR, Fur, RamA, RamR, MarA and MarR).

2.1.4. Биохемијске особине

Салмонеле су аероби и факултативни анаероби, разлажу велики број угљених хидрата (оксидативно и ферментативно разлагање) уз стварање киселине и гаса (осим *S. Typhi*, *S. Gallinarum*, као и неких факултативно анаеробних сероваријетета). Уједно су то и сахаролитичке, протеолитичке и липолитичке бактерије. Оксидаза су негативне, каталаза позитивне, не отапају желатин, не производе индол, стварају водоник сулфид, не разлажу лактозу, сахарозу и уреу (Ben Salem *et al.*, 2012).

2.2. Епидемиологија салмонелозе

Сероваријетети *Salmonella* spp. представљају опасност по јавно здравље током протеклих 100 година и настављају да буду најпатогенији микроорганизми који се храном преносе, и од којих обољевају људи (Buxton, Gordon, 1946; Silliker, 1980; Roberts, 1982; Bryan, 1980; Todd, 1989; Tauxe, 1991; Maguire *et al.*, 1993).

Храна анималног порекла често може да представља извор контаминације људи салмонелама. Посебан ризик представљају месо бројлера, јаја и производи од јаја, док се људи инфицирају директно, конзумацијом или индиректно, унакрсном контаминацијом (De Boer, Hahne, 1990; Jorgensen *et al.*, 2002; Meldrum *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2001; Wegener *et al.*, 2003). Род *Salmonella* садржи преко 2500 сероваријетета. Типизовање утврђених салмонела омогућава праћење тренда производње као и успостављање везе у ланцу производње хране са циљем утврђивања извора контаминације за људе (Kirk, 2004; Olsen *et al.*, 2001).

Најзначајнији сероваријетет салмонела који је високо специфичан за човека је *S. Typhi*, узрочник тифоидне грознице људи. Човек остаје једини познати резервоар овог сероваријетета. Слично, *S. Pullorum* и *S. Gallinarum* су специфичне за живину и када се човек инфицира овим сероваријететима, не долази до настанка болести (Ziprin, Hume 2001). Сероваријетети салмонеле адаптирани на домаће животиње, могу код људи да доведу до настанка болести. *S. Choleraesuis* је адаптирани сероваријетет код свиња, може да доведе до ентеричне грознице и гастроентеритиса код људи (нарочито код деце). Други сероваријетети, попут *S. Typhimurium* нису специфични за домаћина, а одговорни су за велики број случајева обољења људи (Ben Salem *et al.*, 2012).

Са аспекта јавног здравља, салмонела као храном преносив зоонотски агенс, има посебан значај и сврстана је у многе локалне, националне и интернационалне програме праћења (Yan *et al.*, 2004). Салмонелоза преносива храном представља значајан ризик по здравље људи (Taskila *et al.*, 2012). Салмонела је била узрочник инфективних цревних болести људи у 25 – 30 % свих пријављених случајева (Report, 1996). На основу извештаја Европске агенције за безбедност хране (European Food Safety Authority - EFSA), за 2010. годину, две најфреквентније присутне зоонозе код људи у Европској Унији (ЕУ), јесу салмонелоза и кампилобактериоза. Током протеклих шест година, забележен је

статистички значајан тренд опадања случајева салмонелозе људи. У Европској унији запажен је тренд опадања случајева салмонелоза насталих после конзумирања хране, са 100.267 оболелих људи у 1997. године, на 73.006 у 2001. години (O'Brien, De Valk, 2003).

У храни анималног порекла, салмонела је присутна на труповима бројлера и ћурака, као и у уситњеном месу и полупроизводима од меса (EFSA Journal, 2010; Makela *et al.*, 2012).

Из годишњих извештаја EFSA, о случајевима зооноза и болести преносивих храном, запажа се опадајући тренд појаве салмонелозе људи у земљама Европске уније (EFSA, 2012, 2013). У 2011. години, на 100.000 људи утврђено је 21,5 случајева салмонелозе, при чему је леталитет износио 0,13%. Као и у предходним периодима углавном су била погођена деца узраста 0-4 године и 5-14 година. У Европској унији 2005. године обољење салмонелоза је дијагностиковано код 40 од 100.000 људи (EFSA, 2008b), док је највише пријављених случајева било у периоду касно лето/јесен. Највећи број земаља чланица Европске уније примењује програме за контролу салмонела.

У ЕУ од болести преносивих храном, као главни извор салмонеле за људе наводе се јаја и производи од јаја, а месо живине и свињско месо представљају већи ризик него говеђе и овчије месо (EFSA, 2008b). Најчешће је салмонела утврђена у свежем пилећем (4,8% испитаних узорака) и ћурећем месу (9,0% испитаних узорака) (Morgens, 2011). У студији спроведеној у Енглеској и Велсу у периоду 1992-1995. године, утврђено је да је месо бројлера на петом месту као узрочник инфективних цревних болести код људи (Kessel *et al.*, 2001). Као главни узрочници у 7.000 обољења људи, са 258 хоспитализованих, и 17 смртних случајева, утврђене су: *Salmonella* spp. (60%), *Clostridium perfringens* (21%) и *Campylobacter* spp. (6%).

2.3. Налаз салмонела у храни животињског порекла

По наводима Светске здравствене организације *S. Enteritidis* је водећи узрочник салмонелозе људи током предходних 10 година (EFSA, 2010). У годишњем извештају EFSA за 2008. годину о трендовима и изворима зооноза, зоонотских агенаса и храном преносивих болести у 2008. години, наведено је да је 80 % случајева салмонелозе код људи изазвано сероваријететима *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*. Месо живине је главни извор салмонелозе људи. Овај тренд је био у складу са извештајима из предходне године. Европска комисија је поставила критеријуме за контролу *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у јатима кока носила, како би се смањила могућност уласка контаминираних јаја у ланац

хране. Тровања услед конзумације контаминираних јаја настају најчешће због присуства сероваријетета *S. Enteritidis*, због могућности вертикалног преноса. *S. Enteritidis* може да опстане до 54 дана на површини конзумног јајета (Botey-Saló *et al.*, 2012) и има јак афинитет за пријањање на љуску јајета (Howard *et al.*, 2012). Други сероваријетети салмонела контаминирају јаја хоризонтално и налазе се у садржају јаја продором кроз љуску (Martelli, Davies, 2012).

У Аустралији је током 1990-2000. године пријављено просечно по 6.000 случајева салмонелозе људи на годишњем нивоу. Број пријављених случајева варира од 4.600 у 1992. години, до 7.000 у 1998. години. Када се узме у обзир да се мањи проценат салмонелозе људи пријави, сматра се да је број укупно оболелих људи од салмонелозе 240.000 случајева (Sumner *et al.*, 2000a; Sumner *et al.*, 2000b), чак и до 650.000 случајева на годину (ANZFA, 1999). Најчешће изоловани сероваријетет код људи у периоду 1993-1994. и 2000-2001. године је био *S. Sofia* 80%, односно 36%, док је као узрочник салмонелозе људи, утврђена у само 0,3% случајева, што нам указује на врло мали степен инфективности (Sumner *et al.*, 2004; Duffy *et al.*, 2012).

Молекуларна типизација *S. Enteritidis* изоловане из хране и столице људи, као и бројлера, методом RAPD, показала је да се генотипски високо сродне салмонеле могу наћи и код људи, бројлера и у храни (Velhner *et al.*, 2013). Последње деценије су обележиле појаве алиментарних токсоинфекција узрокованих *S. Enteritidis* фаготип PT4 и мултипло резистентном *S. Typhimurium* DT 104. Салмонела PT4 је присутна у јајима пореклом из инфицираних јата носилца и преноси се на људе углавном преко јаја (Velhner *et al.*, 2013).

Током 2001. године испитивањем 5.000 узорака хране увезене у САД-у, добијено је 208 изолата салмонеле. Даљом типизацијом утврђено је присуство следећих изолата: *S. Welteverden* (20%), *S. Newport* (6%), *S. Lexington* (5%) и *S. Thompson* (4%) (Zhao *et al.*, 2006).

У Индији је у периоду 2001-2005. године изоловано 3.079 сероваријетета салмонела, од чега је 2.098 пореклом од људи, 250 од животиња и 726 из хране и амбијента. Код људи од тифоидних сероваријетета је изолована *S. Typhi* (73%) и *S. Paratyphi* (24%), а од нетифоидних сероваријетета *S. Worthington* (28,2%) и *S. Typhimurium*. (Kumar *et al.*, 2009).

У Јапану је испитано укупно 518 узорака фецеса говеда, свиња и бројлера, како би се утврдио степен присуства салмонеле и антимикуробна резистенција. Број позитивних узорака је износио 36,1% код бројлера, 2,8% код свиња и 0,5% код говеда. Најчешћи изоловани сероваријетет из узорака фецеса је *S. Infantis*, 22,6% код бројлера. Изолати су показивали резистенцију на триметоприм (35,2%), док је резистенција на ампицилин и налидиксичну киселину била мања од 10%. Такође у овом испитивању је утврђен први случај цефалоспорин резистентног изолата салмонеле изолованог из животиње намењене за производњу хране (Ishikara *et al.*, 2009).

2.4. *Salmonella Infantis* као узročник обољења људи

S. Infantis припада групи нетифоидних сероваријетета салмонела (NTS), које представљају здравствени проблем. Потврђена је као узročник салмонелозе људи у неколико држава и представља трећи најчешће изолован сероваријетет салмонела (1,1%), након *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* (Merino *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2009, Dionisi *et al.*, 2011; http://www.sva.se/upload/pdf/rapport/Zoonoses_CSR_2008.pdf).

У периоду од априла до августа 1993. године, у Данској је забележено преко 500 регистрованих случајева салмонелозе људи изазване *S. Infantis*. Поређења ради, у 1992. години, укупан број регистрованих случајева салмонелозе људи је износио 41. Узорци су испитивани PFGE методом, при чему је добијено 19 изолата *S. Infantis*, пореклом од оболелих људи, при чему је утврђено да припадају истом генотипу. Током избијања епидемије салмонелозе људи, урађено је праћење присуства салмонеле на линији клања бројлера. Том приликом је утврђено присуство *S. Infantis* код 1,8% закланих јата. Молекуларним испитивањима утврђено је да *S. Infantis*, пореклом са бројлера није истог генотипа као *S. Infantis* изолована од оболелих људи (Wegener C.H., Baggesen D.L., 1996).

Током 2005-2006. године у Италији, *S. Infantis* је изолована из хуманог и анималног материјала. Изолати су били резистентни на ампицилин, хлорамфеникол, стрептомицин, сулфонамиде, тетрациклин, канамицин и триметоприм/сулфаметоксазол. У Италији је системом праћења цревних патогених бактерија (EnterNet Italia), утврђено да је од свих салмонелоза људи узрок обољења у 2-7% случајева била *S. Infantis*, док су као најчешћи узročници обољења људи наведени сероваријетети *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* (Dionisi *et al.*, 2011).

Miler и сарадници (2010) су упоређивали епидемиолошки однос изолата *S. Infantis* изолованих из оболелих људи и са трупова бројлера. Присуство *S. Infantis* је утврђено у болницама, при чему најчешће оболе мала деца, са акутним, септикемичним током (Hasenson *et al.*, 1995). Од посебног епидемиолошког значаја је да и болница може да буде место инфекције *S. Infantis* (Pessoa Silva *et al.*, 2002, Fonseca *et al.*, 2006).

У испитивањима спроведеним у Бразилу у периоду 1984-2009. године Almeida и сарадници су утврдили патогени потенцијал *S. Infantis* пореклом од оболелих људи (25 изолата) и хране (10 изолата). Том приликом је код 34 изолата утврђен степен генетске сличности $\geq 93,7\%$.

2.5. Епизоотиологија салмонелозе

Распрострањеност салмонела у природи иде до убиквитарности, врло значајну улогу имају фактори средине за настајање болести. Примарно станиште салмонела је гастроинтестинални тракт животиња (птице, живина, фармске животиње, рептили и понекад инсекти). Као сапрофити салмонеле могу да се одрже у дигестивном тракту наизглед здравих животиња и птица (Lolin, 1991). Иако им је гастроинтестинални тракт примарно место боравка, салмонеле с времена на време могу да се нађу и у другим деловима тела. Салмонеле се дисеминују фецесом, одакле могу инсектима да се разнесу на разна места. Инсекти и глодари могу да буду резервоари и преносници болести. Зато је од посебног значаја планирање и редовна дезинфекција, дезинсекција и дератизација.

2.5.1. Анализа ризика од појаве салмонелозе живине

Живинарска индустрија је данас грана производње меса од животиња која је, у односу на све друге индустрије меса, највише индустријализована. Производња живинског меса из године у годину бележи константан раст. Овакав тренд у производњи прате и специфични проблеми (контаминација патогеним микророганизмима, добробит јата и заштита животне средине).

Један од чинилаца који утиче на добробит и здравље живине, као и на квалитет меса живине је стрес. Бројлери под стресом ретко испољавају драматичне и видљиве клиничке знаке, тако да често ово стање организма пролази незапажено (Anthony, 2013). Током

узгоја бројлера утицај неких стресних фактора не може се избећи (вакцинација, поступање са бројлерима), међутим, утицај стресних фактора повезаних за добром хигијенском праксом и добром произвођачком праксом може се избећи. Код бројлера у стању стреса, имунитет слаби, што има за последицу увећање броја салмонела у кратком временском року. Према мишљењу Howarda и сарадника (2012) код кока носиља, као последица стреса повећава се пријемчивост гастроинтестиналног тракта за колонизацију салмонелама.

Инфекција бројлера салмонелама може да настане вертикалним и хоризонталним путем. Вертикални пут преноса салмонела настаје трансваријално, услед постојања инфекције оваријума и овидукта код родитељског јата или код латентно инфицираних кока носиља. Хоризонтални пут преноса салмонелама може да настане у инкубатору контактом инфицираних и неинфицираних једнодневних пилића или путем контаминирање хране и воде, као и из амбијента објекта на фарми (живи и неживи вектори).

2.5.2. Налаз *Salmonella* spp. на фарми

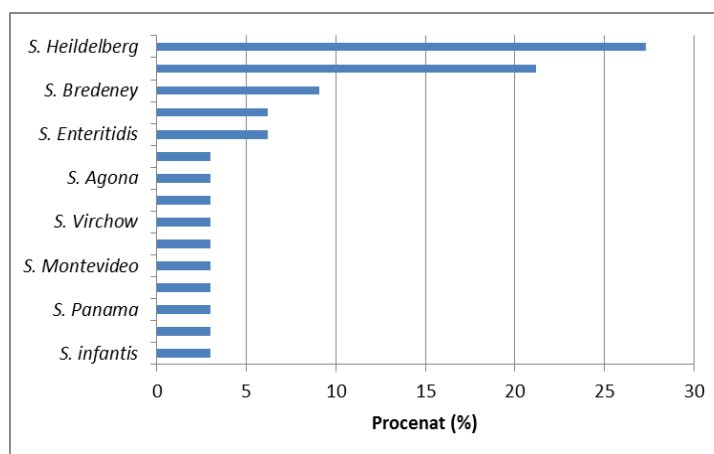
Пријемчивост једнодневних пилића на инфекцију салмонелама је веома велика како наводе Сох и сарадници (1990) који су утврдили да је за настајање салмонелозе акутног тока код пилића потребна инфективна доза од 100 CFU *S. Typhimurium*, апликована преко било којег телесног отвора. Слични резултати су добијени и у истраживањима Velhner и сарадника (2005).

Услови током тога бројлера у објекту на фарми, могу да се одреде на основу мерљивих параметара као што су: температура, релативна влажност, степен вентилације, подпритисак, присуство угљен диоксида и угљен монооксида, амонијака и густина насељености. Такође, при процени услова у објекту, узимају се у обзир и: прираст бројлера из предходних турнуса, степен конверзије хране, морталитет, степен униформности јединки у јату на крају тога, понашање јединки, мирис у објекту, распоређеност јата на поду објекта и утрошак воде и хране (Bosilj, Bosanac, 2013).

У индустријском живинарству, у примарној производњи, Velhner (2013) наводи да једном контаминирана фарма тешко може да се санира, што је везано за повећање утрошка радне снаге и средстава за дезинфекцију. Проблем је посебно присутан у старијим објектима, где

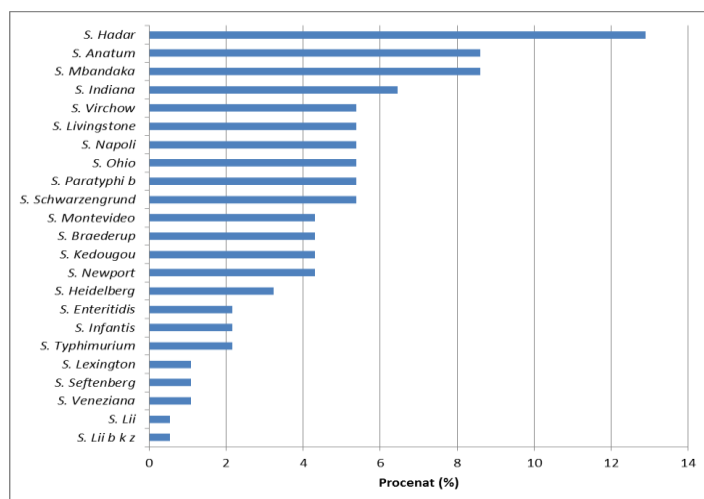
је процес темељног чишћења теже спровести. Фарме са таквим објектима углавном имају проблем у стриктном спровођењу биосигурносних мера. У овим случајевима се примењује поступак ацидификације хране, који се у многим земљама спроводи штедљиво, због повећања цене коштања држања бројлера (Mead, 2004). Провером хигијене у објектима за држање бројлера по завршетку това након поступака чишћења и санитације, утврђено је присуство салмонела у ниском броју које потичу од предходно држаног инфицираног јата (Wray *et al.*, 1999). Rose и сарадници (2000) су у Француској, испитујући ефикасност примењених мера санитације на фарми, утврдили присуство салмонела, након примене санитационих мера, у 33% испитаних објеката.

Објекат на фарми, на почетку това, услед неадекватне припреме за усељење, може да буде извор контаминације за једнодневне пилиће. Испитивања спроведена у Француској су показала степен присуства салмонеле у објектима, по изолованим сероваријететима (Bouquin *et al.*, 2010).



Графикон 1. Степен присуства салмонела, по сероваријететима изолованим у објектима пре усељења пилића у Западној Француској (Bouquin *et al.*, 2010)

У истраживањима Thakura и сарадника (2013) утврђено је присуство *S. Typhimurium* у амбијенту фарме (8,4%) и у фецесу живине (8,8%). У Француској је током 2005-2006. године утврђена преваленција салмонеле у јатима бројлера на крају турнуса. Салмонеле су утврђене у 8,6% узорака простирке. Изолати салмонела су најчешће идентификовани као сероваријетети: *S. Nadar*, *S. Anatum* и *S. Mbandaka*. Дистрибуција утврђених изолата сероваријетета салмонела је приказана на графикону 2 (Bouquin *et al.*, 2010).



Графикон 2. Преваленција салмонела у јатима бројлера на крају това у Француској у периоду 2005-2006. година (Bouquin *et al.*, 2010).

У Аустралији је доминантан сероваријетет салмонела који се среће код живине *S. Sofia*, са преваленцијом од 40 – 60%. Овај сероваријетет ретко изазива обољења људи, свега 0,3 % случајева, али је у производном објекту веома постојан (Lesley *et al.*, 2012).

Присуство *S. Infantis* у јату бројлера

Бројлери могу да буду резервоари бројних сероваријетета салмонела, од којих су многи инфективни за људе (Nógrády *et al.*, 2012). Програм праћења преваленције салмонела у јатима бројлера, у ЕУ, током 2005-2006. године идентификовао је три најчешће изолована сероваријетета у јату бројлера: *S. Enteritidis* (37,1%), *S. Infantis* (20,4 %) и *S. Mbandaka* (7,9%). Међу земљама чланицама ЕУ, преваленција *S. Infantis* у јату бројлера од 64% је забележена у Мађарској, затим у Пољској 8% и Чешкој Републици 2,5% (EFSA Report, 2007b).

Nógrády је са сарадницима (2008), у Мађарској спровео истраживање како би утврдио степен присуства салмонела на труповима бројлера, на линији клања у циљу утврђивања извора контаминације. У току једног производног турнуса на фармама испитали су храну, воду, фецес и простирку. Укупно је у истраживању изоловано 164 сероваријетета *S. Infantis*, а што је 43% од укупно изолованих салмонела на фармама. Испитивањем

антибиотске резистенције утврдили су резистенцију на налидиксичну киселину, сулфонамиде и тетрациклин.

У извештају Немачке агенције за безбедност хране (Bundesinstitut für Risikobewertung – BfR), у Немачкој је утврђена преваленција *S. Infantis* у јатима бројлера у 8,9% случајева (BfR, 2005, 2006). У табели 1 су представљени резултати заједничке студије EFSA и BfR о преваленцији салмонела у јатима бројлера у ЕУ и Немачкој.

Табела1. Резултати студије EFSA и BfR о присуству салмонела у јатима бројлера (Miller *et al.*, 2010)

Европска унија 2007	Немачка 2006
<i>S. Enteritidis</i> 3,8 %	<i>S. Enteritidis</i> 23,0%
<i>S. Infantis</i> 22,0 %	<i>S. Paratyphi B</i> 15,6%
<i>S. Mbandaka</i> 8,1 %	<i>S. Anatum</i> 14,7 %
<i>S. Hadar</i> 3,7 %	<i>S. Infantis</i> 8,9 %
<i>S. Typhimurium</i> 3,0 %	<i>S. Typhimurium</i> 8,4%

2.6. Патогенеза салмонелозе

Салмонеле су интрацелуларне бактерије, оне продиру у ћелије организма, ремете нормално одвијање физиолошких процеса, размножавају се и доводе до ћелијске смрти. Механизам патогеног деловања салмонела зависи од присутног сероваријетета, врсте намирнице која се употребљава у исхрани, као и од здравственог стања домаћина. Инфективна доза салмонела је $10^3 - 10^8$ CFU/g, и она варира у зависности од старости људи, имунолошког статуса организма, врсте хране.

Пут инфекције је алиментаран, путем контаминираних хране и воде. У гастроинтестиналном тракту домаћина салмонеле се адхерирају за епителне ћелије танког црева, преко маноза резистентних фимбрија. Нарушавају цревни епител директним

продором у ћелију епитела, рецепторима посредованом ендоцитизом или преко места везивања две суседне епителне ћелије. У епителу изазивају инфламаторни одговор организма.

Системска инфекција настаје када путем фагоцита салмонеле доспеју у крв (септикемични облик).

Колонизација и инвазија салмонела у гастроинтестиналном тракту домаћина зависиће од амбијенталне стимулације, активације гена који одређују адаптивне особине микроорганизама. Посебно је од значаја сама физиологија раста присутног сероваријетета, доступност хранљивих материја, рН цревног садржаја и микрофлора цревног тракта. Од микрофлоре посебно се издваја присуство лактобацила који спречавају колонизацију салмонела у цревима домаћина (Dunkley *et al.*, 2009). На ћелијском нивоу салмонела инвадира Б лимфоците и преживљава у њиховим ендозомално – лизосомалним одељцима. За инвазију Б лимфоцита потребан је настанак комплекса SPI-1 („*Salmonella* pathogenesis island 1’’). Процесом макропиноцитозе салмонела доспева у Б лимфоцит, у коме се онда дешава патолошко реаранжирање актинских филамената и микротубула, што за последицу има набирање површине лимфоцита, раст и настанак пространог фагозома (Rosales-Reyes *et al.*, 2012).

Фактори вируленције салмонела су: структуре ћелијске мембране (липополисахарид, порин); токсини (ендотоксин, 3 ентеротоксина, цитотоксин); сидерофоре (ентерохелин, аеробактин).

2.7. Клиничка слика салмонелозе

Салмонелоза је болест која настаје при уносу инфективне дозе салмонела у дигестивни тракт човека или животиње.

Клиничка слика салмонелозе код људи

Највећи број обољења протиче у благом току, са гастроинтестиналним симптомима и не захтева лечење антибиотицима. Инвазивна болест као бактеријемија или менингитис могу да настану код малог броја оболелих који имају имунокомпромитована стања (EFSA, 2009). Епидемиолошки посматрано при инфекцији салмонелама примарни интерес је

идентификација присутног сероваријетета, као и утврђивање његових карактеристика. За идентификацију сероваријетета развијене су бројне методе. Подаци о броју оболелих људи у Србији не одговарају стварном броју оболелих због тога што велики број људи нема навику да при појави симптома болести затражи помоћ лекара.

Особе које су у контакту са животињама, радници на фармама и у кланичној индустрији представљају део популације са повишеним ризиком за инфекцију салмонелама. Опште је прихваћено да се ризик увећава тамо где су ниски хигијенски стандарди, а клима је топлија. Клиничка слика салмонелозе људи карактерише се најчешће локализованим ентероколитисом са појавом дијареје и абдоминалног бола, мучнином, повраћањем, повишеном температуром и дехидрацијом. Клинички симптоми наступају након релативно кратке инкубације и трају неколико дана у зависности од вирулентности узрочника, степена инфекције, старости и здравственог стања пацијента (Resanović, Palić, 2013). Угрожене категорије становништва или критичне групе код којих болест чешће настаје су: деца, старије особе или особе које већ болују од неке примарне болести (малигнитет, имунодефицијентна стања - AIDS, алергијска стања, имуне болести; постојеће инфекције у организму вирусног или бактеријског порекла). Облици болести код људи су: системско обољење у облику тифоидне или паратифоидне грознице произведено сероваријететима адаптираним на домаћина (*S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* и *C*, *S. Sendai*); локална гнојна инфекција локализована на менингама, костима и зглобовима (*S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*, *S. Panama*, *S. Virchow*) и акутни гастроентеритис – салмонелоза (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Anatum*).

Сам ток болести зависи од типа сероваријетета салмонеле који је инфицирао организам. У случају системске инфекције сероваријететима којима је човек специфичан домаћин (*S. Typhi*) инкубациони период је 10-14 дана. У иницијалној фази болести главни симптоми су абдоминални бол, анорексија, главобоља, ремитирајућа грозница (телесна температура преко 40°C) и непродуктивни кашаљ. Стање констипације је чешће него појава дијареје. У току друге недеље болести појављују се црвени печати по кожи, спленомегалија и брадикардија. Морталитет је око 10%.

Код акутног гастроентеритиса инкубациони период износи 12-48 сати. Симптоми болести су: абдоминални бол, дијареја, благи скок телесне температуре, мучнина и повраћање.

Крвава столица није уобичајени симптом, али је забележена код 42% инфекције са *S. Typhimurium*.

Компликације салмонелозе су веома бројне и зависе првенствено од интеракције макроорганизам – салмонела током инфекције. Инвазију салмонела у гастроинтестиналном тракту домаћина прати локализовани ентероколитис кога могу да прате бројне компликације: септикемија, хемолитични уремични синдром, нодозни еритем, менингитис, остеомијелитис, септични ринитис, пнеумонија, холециститис, перитонитис, пијелонефритис, циститис и апсцес, као и ендокардитис, перикардитис и васкулитис. Наведене компликације могу да буду укључене у патогенезу Рајтеровог синдрома (тифоидни облик болести са симптомима артритиса праћеног неуролошким или неуромускуларним симптомима). У највећем броју случајева салмонелоза се оконча оздрављењем.

Клиничка слика салмонелозе код живине

Салмонелоза живине је локално или системско обољење, које може да има и хроничан и асимптоматски ток. Од салмонелозе обољева домаћа и дивља перната живина. Салмонелозе птица су и зоонозе изузев обољења живине узрокованих са *S. Gallinarum* и *S. Pullorum*. Салмонеле у живинарству изазивају више болести у зависности од сероваријетета узрочника, тифус живине (fowl typhoid, *S. Gallinarum*), бели пролив пилића (pullorum disease, *S. Pullorum*), паратифус (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) и аризоноза (*S. Arizonae*). Интензитет клиничке слике, као и степен морбидитета и морталитета, умногоме зависи од присутног сероваријетета у јату. Клиничку салмонелозу живине изазивају *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*, ређе други серотипови попут *S. Montevideo* и *S. Thompson* (Orlić, Kapetanov, 2007).

Код бројлера који нису долазили у контакт са салмонелом, након инфекције, инкубација је кратка и претежно траје 4-6 дана. Одрасла живина може дуго да болује инапарентно. Први знак болести у акутном току је повећање морталитета и смањење уноса хране, док је код кока носиља евидентно смањење носивости. Оболеле јединке су потиштене, накоштеног перја и затворених очију. Могу да се испоје и респираторни поремећаји,

са убрзаним дисањем и дахтањем. Могу бити присутни знаци ентеритиса, са накупљањем фецеса око клоаке.

Паратифус живине је зооноза, чији су узрочници *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*. Паратифоза може да се јави спорадично или као ензоотија на фармама. Најчешће оболи млада живина старости 2-4 недеље. Ток болести може да буде различит. Перакутни ток се јавља код пилића старих неколико часова. Такви пилићи угињавају нагло без клиничких симптома болести, док се на обдукцији констатује слика септикемије (љубичасте мрље по кожи, петехијална крварења по серозама и мукозама, крварења по епикарду, миокарду и перитонеуму). Акутни ток болести се јавља најчешће код пилића старости 5 дана-3 недеље. Болест траје око 8 дана, проценат морталитета је висок. Код инфициране јединке долази до поремећаја општег стања организма, са повишеном температуром и малаксалошћу, очни капци су затворени, перје накомештено.

Акутни ток болести код старијих јединки карактерише јак пролив жућкасте боје, тамно црвена боја кресте и подбрадњака, док је кожа прошарана црвеним пругама. Субакутни ток и хроничан ток болести се јавља у виду појединачних обољења у јату. Овај облик болести је много чешћи код одрасле живине, док је клиничка слика слична тифусу. Хроничан ток болести може да доведе до промена на зглобовима, што има за последицу отежано и успорено кретање.

Тифус живине је обољење живине чији је узрочник *S. Gallinarum*. Обољење се најчешће јавља код кокошака и ћурака. Код младих животиња обољење има слику као код инфекције *S. Pullorum* и *S. Typhimurium*. Код одрасле живине долази до пада апетита, прираста и носивости, а проценат угинућа се повећава. Јавља се воденаст слузав, пролив жућкасте боје који може да има примесе крви. Морбидитет износи 100%, а морталитет 50%. Одрасла живина може дуже времена да болује инапарентно или обољева у хроничном облику са променама на гениталним органима, јетри и слезини. До угинућа може да дође и услед руптуре јетре због присуства некротичних огњишта.

Бели пролив пилића – узрочник белог пролива пилића је *S. Pullorum*, која је веома слична *S. Gallinarum*. Болест има претежно акутан ток. *S. Pullorum* се најчешће преноси преко инфицираних јаја, инфицирају се ембриони и пилићи млађи од три недеље.

Новоизлежени пилићи се инфицирају у инкубатору преко љуске. Инфицирани ембриони у јајету угињавају најчешће 17. или 18. дана инкубирања, а пилићи који су се излегли из инфицираних јаја угињавају за 1-2 дана након излегања. Пилићи који се инфицирају у инкубатору аерогеним путем, угињавају 14. дана након инфекције, а у плућима имају промене у виду тифозних чворића. Могу да оболе и пилићи старости до 20 дана. Симптоми болести су потиштеност, инапетенца, респираторне сметње.

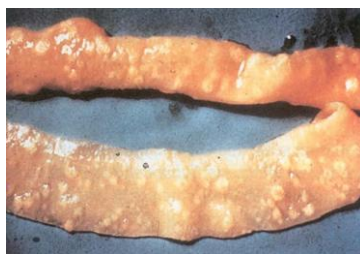


Слика 3. Клиничка слика оболелих пилића

(<http://veterina.info/vesti/25-goveda/bolesti-goveda/198-salmoneloze-opirniye>)

2.8. Патоанатомски налаз салмонелозе

Паратифус живине – код пилића уинулих од паратифуса налази се нересорбована жуманчана кеса, затим присутна су ситна тачкаста крварења по перикарду, перитонеуму и можданим овојницама. Органи трбушне дупље су пресвучени фибринским наслагама, а у трбушној дупљи се налази већа количина серозне течности. На слузокожи црева се запажа катарално запаљење са десквamacијом епитела и са тачкастим крварењем. У плућима може да се запази едем плућа са конгестијом и лобарна пнеумонија. Јетра, слезина и бубрези су хиперемични и пуни крви. Уколико болест дуже траје, могу да се јаве некробиотички процеси на слузокожи танких и дебelih црева у виду жућкастих огњишта. На јетри, плућима и срцу налазе се некротична жаришта жућкасте и сивкасте боје. Цекуми су исправљени, испуњени некротичним наслагама. Код старијих јединки уинулих од паратифуса промене се налазе на цревима, гениталним органима и зглобовима. Слузокожа црева је отечена и задебљала, са улцерацијама и десквamisаним епителом. Зглобови су задебљани и отечени. На јетри, слезини, бубрезима, срцу, мозгу и мишићима могу да се запазе некротични чворићи (паратифозни чворићи).



Слика 4. Паратифозни чворићи на цревима живине

(<http://veterina.info/vesti/25-goveda/bolesti-goveda/198-salmoneloze-opirniје>)

Тифус живине – патоморфолошке промене у акутном току болести се налазе на јетри која је увећана, зелено-смеђе боје, трошне конзистенције са некротичним огњиштима и крварењима. Слезина је такође увећана, са некротичним огњиштима. У цревима је присутан катарални ентеритис. У случају хроничног тока болести, на обдукцији се запажа кахексија, телесна дупља је испуњена сирастим ексудатом услед запаљења серозе проузроковане руптуром јајних фоликула.



Слика 5. Промене на јетри живине

(<http://veterina.info/vesti/25-goveda/bolesti-goveda/198-salmoneloze-opirniје>)

Бели пролив пилића – патоанатомски налаз може да буде негативан код пилића који су угинули неколико часова након излегања. У септикемичном облику болести запажају се крварења, иктерус, конгестија крвних судова, отечена јетра тамноцрвене или црне боје, трошне конзистенције, док је у цревима присутно катарално запаљење и слуз. Слезина је увећана и хиперемична. У акутном току болести, на јетри се налазе ситна некротична огњишта и може доћи до њене руптуре. Пилићи који су се инфицирали аерогено у инкубатору имају промене на плућима у виду гранулома и катаралне пнеумоније.

2.9. Терапија салмонелозе

Терапија салмонелозе код људи

Тифоидна и паратифоидна грозница се лече оралном антибиотском терапијом (амоксацилин, котримоксазол, цефтриаксон). Код хроничних инфекција се препоручује радикалан метод одстрањивања жучне кесе или другог инфицираног органа. Антибиотска терапија акутног гастроентеритиса није неопходна. Код свих инфекција салмонелама препоручује се надокнада течности и електролита.

Терапија салмонелозе код живине

Терапија се циљано спроводи на основу урађеног антибиограма. Терапија салмонелоза живине је могућа са апрамицином, цефтиофуrom, триметоприм/сулфаметоксазолом, флуорираним хинолонима, као и неомицином, гентамицином (Petričević, 2007). Развој резистенције углавном ограничава примену тетрациклина, спектиномицина и сулфонамида (Burch, 2002). Контрола ефекта терапије је обавезна, уз искључења из јата јединки које не одговарају на примењену терапију. Превентива салмонелозе може да се врши једнократном парентералном апликацијом гентамицина једнодневним пилићима (Petričević, 2007), а при томе је обавезна серолошка и микробиолошка контрола јата и јаја. Микробиолошка контрола инфекције салмонелама може једино да буде успешна ако се серопозитивне јединке уклањају из запата.

2.10. Превентива салмонелозе код бројлера

Јаја намењена за инкубацију обавезно морају да потичу из репродуктивних јата слободних од салмонелозе. Јаја морају редовно да се третирају средствима како би се превенирало присуство салмонела на љусци. Таква јаја онда морају да се чувају у темперираним и од инсеката излованим просторијама, до пребацивања у инкубаторе. Пре пребацивања у инкубаторе јаја треба тетирати одговарајућим дезинфицијентом.

Родитељско јато мора да буде узгајано и држано у најоптималнијем амбијенту уз стриктно поштовање свих биосигурносних мера. Запослени радници морају да се доследно придржавају прописаних хигијенско - санитарних процедура. Потребно је спроводити интензивну контролу родитељског јата, преко интензивног узорковања и

испитивања птица и њиховог окружења (Morgens, 2011). Посебну пажњу треба посветити репродуктивним јатима, како би постала слободна од салмонеле. Прво се санирају фарме које служе за одгој репродуктивних јата и сва позитивна јата треба да буду упућена на клање из нужде (Velhner *et al.*, 2013). Ако је родитељско јато позитивно на салмонелу, обавезно га треба искључити из даље експлоатације. Потребно је више година учесталих контрола како би сва јата за репродукцију била слободна од салмонеле.

Према регулативи ЕУ (ЕС 1003/2003), за свих 5 најучесталијих сероваријетета салмонела (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Virchow*, *S. Infantis*) преваленција не сме да буде већа од 1%. Тај циљ је 2011. године испуњен (EFSA, 2013). Потребно је и да се други сероваријетети региструју, да се пријаве и да се прати њихова заступљеност у целокупној живинарској производњи (ЕС 2160/2003). Паралелно са програмом санације родитељског јата, санира се и проблем у инкубаторским станицама и заштрава се контрола хране за живину (Velhner *et al.*, 2013). На крају долазе фарме за узгој товног материјала и за одгој носиља конзумних јаја.

Инкубација, излегање пилића, једнодневно пиле - Пре почетка инкубације, квалитет јаја намењених инкубацији је одређен генетском основом, старошћу и здравственим статусом родитељског јата (Roover *et al.*, 2013). Успешан процес инкубације има за циљ добијање једнодневног пилета оптималне кондиције. Једна инфицирана јединка током периода излегања, може да буде извор инфекције за остале. Добра хигијенска пракса током инкубације има велики значај у спровођењу програма контроле салмонеле (Morgens, 2011).

Квалитет једнодневног пилета након инкубације, у многоме зависи од услова у инкубатору, времена излегања као и од поступања са пилетом непосредно након излегања (Bergoug *et al.*, 2013). Бројлерски пилићи се излежу након 461-510 сати инкубације (Almeida *et al.*, 2008, Tong *et al.*, 2011). Јаја неуниформног порекла, када се инкубирају заједно, одликују се дугим временским интервалом између излегања првог пилета, до излегања последњег пилета (Descuere *et al.*, 2001). Предуг временски интервал при излегању доводи до слабљења кондиције првоизлежених пилића, јер они проводе и 50 сати у неодговарајућим условима (температура ваздуха 37°C, релативна влажност 80%, концентрација угљен диоксида око 1%) и немају приступ храни и води (Bergoug *et al.*,

2013). Након излегања врши се сортирање, одређивање пола, и у наредних 2-4 сата се спроводи вакцинација пилића. Након тога пилићи се припремају за транспорт на фарму који треба да отпочне у наредних 24 сата и да се оконча најкасније 72 сата након излегања (Council of the European Union, 2005).

Транспорт једнодневних пилића до фарме - Дужина транспорта и амбијентални услови током транспорта једнодневних пилића су два најважнија фактора који утичу на производне карактеристике (Bergoug *et al.*, 2013). Од посебног значаја као извор контаминације наводе се неопрани или недовољно опрани транспортни кавези од предходног јата које је одвежено у кланицу (Mead, 2004). Утврђено је да неопрани кавези са фецесом живине од преходне туре, могу да повећају степен инфекције јединки које се превозе у њима за 20-40%. Покретање пилића условљава већу дефекацију и ако пилићи имају салмонелу, она ће се пренети на кавезе. Транспортни кавези су врло чест извор унакрсне контаминације (Slader *et al.*, 2002; Berrang *et al.*, 2003). Тако су одређене студије довеле у директну везу налаз салмонела на линији клања и прљаве кавезе као извор контаминације (Corry *et al.*, 2002; Slader *et al.*, 2002). Потребно је да се кавези оперу, оставе да се осуше и складиште 48 сати до поновне манипулације.

Фарма, услови држања бројлера - Једна од основних карактеристика здравственог стања бројлера је здравствено стање његовог гастроинтестиналног тракта, на месту где се утицај исхране и морфологије организма преклапају. Степен искориштења нутрицијенаса у храни зависи од степена колонизације интестиналног система патогенима, као и од функционисања имуног система. Степен искоришћења нутрицијенаса у храни и здравствено стање гастроинтестиналног тракта бројлера одређују степен апсорпције нутрицијенаса, а самим тим и производне карактеристике (Van der Beek, 2013). Примена квасаца (*Saccharomyces boulardii*) у храни, значајно смањује колонизацију црева бројлера са *S. Typhimurium* (Line, 1998).

Употреба бактериофага представља добар начин превенције ширења салмонела и смањује инциденцију појаве салмонелозе живине. У експерименту (Lim *et al.*, 2012), једнодневни пилићи су били изложени салмонелама у концентрацији 5×10^7 CFU/пилету и онда им је даван бактериофаг у три концентрације (10^5 , 10^7 и 10^9 PFU/г) као адитив у храни 21. дан након излагања салмонелама. Дошло је до значајног смањења присуства салмонеле, 70%

пилића третираних бактериофагима највеће концентрације (10^9) није имало детектибилне концентрације салмонеле у свом дигестивног тракту.

Такође многи нутритивни састојци хране могу да делују на имуни систем. Сам концепт **нутритивне имуномодулације** подразумева употребу специфичног састојка у исхрани како би се постигла одређена производна предност. Овај концепт додатно добија на значају од како су антибиотици, као промотори раста, забрањени за употребу. Међутим, овом концепту треба приступити са опрезом због још непознатих механизма имуног одговора и случајева да подизањем имунитета живине за одређене болести, само их чини пријемчивијим за друга обољења (Korver, 2012).

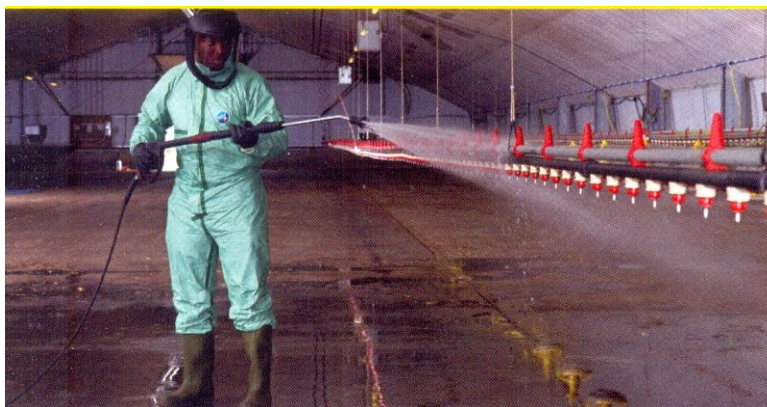
Као још један од видова контроле присуства салмонела наводи се повећање резистенције јата на колонизацију интестиналног тракта салмонелама, употребом компетитивне интестиналне микрофлоре одраслих бројлера. На овај начин се скраћује време потребно за настанак протективне микрофлоре која спречава ширење салмонеле на кожу и перје (Mead, 2004).

Путеви ширења салмонела су бројни и врло разноврсни. Фармска интензивна производња је од посебног интереса јер је могућност умножавања салмонеле веома велика, а настале штете, ако се правовремено не интервенише, могу да буду врло значајне, а у неким случајевима и пресудне за опстанак родитељског јата. Опсежним истраживањима спроведним у Данској, када је забележен пораст налаза салмонела на линији клања, утврђено је да инфицирана живина са фарме представља главни извор контаминације, па је покренута велика акција да би се искорениле салмонеле још на самој фарми (Stošić *et al.*, 2007). Како би се присуство салмонеле елиминисало или svelo на најмању могућу меру, на фарми се мора применити један од основних принципа, а то је концепт „све унутра, све напоље“, чиме се спречава да у истом објекту на фарми борави живина различитог узраста. Пре усељења и након исељења објекта на фарми, морају бити предузете све потребне биосигурносне мере, уз одмор објекта.

Биосигурносне мере представљају низ добро осмишљених препрека чији је циљ спречавање уноса салмонеле на фарму. Биосигурносне мере представљају „здравствени план“ или мере осмишљене да заштите популацију од преносивих инфективних агенаса

(Toma *et al.*, 1999). Циљ примене биосигурносних мера је да се смањи могућност инфекције, што треба да обезбеди производњу здравог и поузданог производа (Maslić-Stržak *et al.*, 2012). Константна примена биосигурносних мера је од пресудне важности за успех узгоја животиња (Gifford *et al.*, 1987, Shane 1993).

Биолошки агенси су бактерије, вируси, протозое, гљивице и паразити. За примену биосигурносних мера одговорни су сви који долазе у контакт са јатом. Извор или резервоар болести могу да буду друге животињске врсте (пси, мачке), глодари, инсекти, егзотичне и дивље животиње, птице, храна или вода у којима може да буде присутан инфективни биолошки агенс. Водом се преносе тифоидни сероваријети салмонела, док се нетифоидни сероваријетети салмонела углавном преносе путем хране. У земљама у развоју, епидемиолошке студије праћења присуства салмонела у води за пиће, су показале значај присуства сероваријетета *S. Typhi*, на настанак болести (Levantesi *et al.*, 2012). Опасност за јато представљају латентно инфициране јединке које немају симптоме болести, док се агенс налази у њиховом организму одакле се дисеминира у околину и угрожава остале здраве јединке. На фарми се доноси биосигурносни програм у циљу лакшег и свеобухватнијег координисања спровођења биосигурносних мера. Биосигурносни програм се базира на добрим фармским и управним поступцима са којима мора да буде упознат свако ко долази на фарму. Улазак глодара, паразита, дивљих птица и колико је то могуће, мува и инсеката у објектат мора да буде спречен, док сам објектат треба да буде тако конструкцијски решен да се лако одржава, чисти и дезинфикује. Потребно је осигурати исправност **хране и воде** на фарми. **Кућни љубимци** не могу да се држе на фарми. Простирка у објекту мора да буде сува. Простирка је сачињена од пиљевине, сламе, струготина бора или неког другог тврдог дрвета, љуске кикирикија или пиринча, док се користи и материјал од рециклираног папира (Russell, Lyon, 2006). Објекте треба насељавати једнодневним пилићима из родитељског јата слободног од болести. При насељавању објекта треба применити систем „сви унутра, сви напоље“ како би се спречило борављење на фарми јединки различитог узраста.



Слика 6. Дезинфекција хранилица и појилица од стране прописно обученог радника
(World Poultry, 2011)

Запослени на фарми треба да при уласку у објекат облаче чисту одећу (чизме, капа и рукавице). При обиласку објеката, у којима су јата различите старости, треба прво да се обиђу млађа јата, а затим старија.

Опрема која се користи на фарми треба да буде чиста и дезинфикована и не би требала да се износи са фарме. Сва коришћена опрема и прибор намењени за бацање, морају да буду складиштени у за то одговарајућим контејнерима.



Слика 7. Санитација обуће испред улаза у објекат на фарми (World Poultry, 2011)

При уласку на фарму, како за запослене тако и за возила, морају да буду постављене **дезобаријере**. Дезобаријера треба да буде напуњена водом са активним, свежим

раствором дезинфекционог средства. У кругу фарме, дезобаријера треба да буде постављена на улаз у сваки производни објект.

Редовно **узорковање** у оквиру плана самоконтроле фарме - у циљу праћења присуства салмонела на фарми и предузимања мера за смањење инфекције салмонелама у јатима бројлера узимају се узорци простирке, фецеса, назувки, као и брисева из објекта (Нiet *et al.*, 2007; Bailey *et al.*, 2001). Једна група истраживача сматра да је узорковање назувки јефтин и добар начин да се утврди присуство салмонела (McCrea *et al.*, 2005).

Један од приступа решавању проблема салмонелозе у индустријском живинарству је увођење имунопрофилактике родитељског јата. У оквиру примене програма за сузбијање салмонелозе, вакцинација је уврштена као специфична метода сузбијања салмонелозних инфекција живине (Wegener *et al.*, 2003).

Квалитет хране за тов бројлера је важан предуслов за постизање оптималних производних резултата, као и за очување здравственог статуса јата. Потребно је контролисати сировине које улазе у храну за тов, као и саму смешу (Каговић *et al.*, 2013). Последњих година, циљ у живинарској индустрији је био постизање што је могуће бржег раста у минималном времену (Longo *et al.*, 2013). Како би испунили тај циљ, бројлери током това морају да добијају избалансиране оброке са свим потребним нутрицијентима.

Једнодневни пилићи, по приспећу на фарму захтевају моменталан приступ свежој, чистој води. Унос воде је у корелацији са уносом хране и свако ограничавање имаће за последицу и смањен унос хране, у степену који зависи од старости јата и дужине рестрикције воде (Esmail, 2013). Истраживања су показала да додавање минерала и органских киселина у воду за пиће пилића, значајно снижава присуство салмонела на труповима бројлера (Byrd *et al.*, 2001; Byrd *et al.*, 2003). Количина и врста употребљене киселине морају да буду пажљиво одабрани. Вода са додатком киселине, пилићима мора да буде питка. Од стране FDA (Food and drug administration) препоручене су млечна, сирћетна киселина и натријум бисулфат.

2.11. Поступци са бројлерима у кланици

Непосредно пред клање, пилиће не треба хранити због аутоматске дефекације током омамљивања и могуће руптуре дигестивног тракта током евисцерације. Комплетна превенција микробиолошке контаминације није остварива у комерцијалним условима производње чак и ако се у производњи примени најбоља хигијенска пракса (Bunčić и Sofos, 2012). Зато рестрикција хране пред клање умногоме доприноси смањивању степена контаминације трупова бројлера током клања и обраде. На линији клања долази до контаминације трупова бројлера салмонелама у случајевима када је гастроинтестинални тракт колонизован овом бактеријом.

Контрола присуства салмонела на труповима бројлера, на линији клања након хлађења, је обавеза произвођача. Преко установљеног броја позитивних узорака у серијама испитивања, врши се процена целокупне хигијене процеса производње, која подразумева комплетан ланац производње (родитељско јато, инкубаторска станица, фарма - примарна производња, транспорт до кланице). У истраживањима више истраживача разматране су могућности деконтаминације трупова. Једна од могућности је примена раствора органских киселина. Процес деконтаминације је помоћно, а не главно средство у осигурању безбедности меса живине и не може да се користи као замена за правилну примену система добре хигијенске и произвођачке праксе (Bunčić и Sofos, 2012). Деконтаминација трупова на линији клања, такође може да се ради применом вруће воде или водене паре. Утврђено је да, ако се пилећи труп изложи деловању паре у времену > 12 секунди, долази до значајног смањења контаминације али и до скупљања и промене боје коже. Тако да је метода избора примена вруће воде температуре 80°C у трајању од 20 секунди, праћена брзим замрзавањем по површини (James, 2007), што није довело до мана изгледа пилећег трупа. Јонизујуће зрачење ефикасно елиминише присуство салмонела на месу живине, а при томе чува сензорна својства меса. Потпуна елиминација салмонела у месу је постигнута дозом од 3kGy (Bulatović *et al.*, 1996).

Технолошке операције на линији клања које носе посебно висок ризик за контаминацију трупа бројлера салмонелама јесу: омамљивање (због рефлексне дефекације), шурење, черупање и евисцерација.

Шурење треба да се обавља у проточним базенима за топлом водом (шурење потапањем – имерзионо шурење), са назнаком да смер кретања пилећих трупова треба да буде супротан струјању воде. Шурење је врло важна технолошка операција у контроли салмонеле, јер се највећа количина прљавштине, простирке, фецеса сапира са трупова. Температура воде у шурачу треба да износи 54-58°C (Grubić, 2009), самим тим се постиже контрола раста, обзиром да се салмонеле умножавају до температуре од 47°C (Compliance guideline for controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry, 2010). За правилно обављање ове технолошке операције са аспекта превенције ширења салмонела најпогоднији су вишефазни затворени шурачи (Humphrey, 1981). Сва органска материја у шурачу се понаша неутрално, као пуфер и тежи да одржи рН вредност у опсегу 6-7, док је салмонела најотпорнија при тим рН вредностима. (Humphrey, Lanning, 1987).

Черупање се врши машински, у черупачима. Черупач ради на принципу обраде трупова „гуменим прстима“, који долазе у директан контакт са труповима живине, при чему може да дође до унакрсне контаминације салмонелама (Allen *et al.*, 2003; Nunes, 2013). Након черупања, трупове је потребно испрати водом са додатком препарата који контролишу присуство салмонеле. То могу да буду хлорни препарати у дози 18 ppm-а (Mead *et al.*, 1994), сирћетна киселина или хидроген пероксид.

Евисцерација је, са аспекта контаминације трупова, посебно одговорна технолошка операција. Неадекватно обављање операције ручне или машинске евисцерације повећава степен контаминације трупова бројлера салмонелом за 50% (Byrd *et al.*, 2002). Највећи проблем за успешно обављање ове операције при машинској обради, може да представља неуједначеност јата, због повећане могућности руптуре гастроинтестиналног тракта и последичног проливања цревног садржаја по трупу. При ручној евисцерацији, сам поступак ретракције унутрашњих органа при евисцерацији, утиче на степен руптуре и последичну контаминацију трупова гастроинтестиналним садржајем (Buhr *et al.*, 2000).

2.12. Присуство салмонела на труповима бројлера

Током промета живинског меса на тржишту САД, у периоду 1994.-2002. године, главни разлог повлачења меса бројлера из промета је била бактеријска контаминација. Четири доминантна патогена микроорганизма, због којих је месо повучено из промета, су била:

Campylobacter jejuni/coli, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., и *Listeria monocytogenes* (FSIS, 1998).

Antunes и сарадници су (2003) испитивали присуство салмонела на 60 трупова живине (54 трупа бројлера и 6 трупова ћурака) узетих из промета у Португалији. У 60 % узорака је утврђено присуство салмонела и то 10 различитих сероваријетета. Доминантно присутни сероваријетети су били *S. Enteritidis* и *S. Hadar*.

Dominguez и сарадници (2002) су 1999. године испитивали присуство салмонела у свежем месу бројлера из промета. Салмонеле су детектовали у 71 (35,83%) узорку од укупно 198 испитаних узорака. Доминантни сероваријетети утврђени у овом истраживању били су: *S. Enteritidis* 47,88% и *S. Hadar* 25,35%.

Álvarez-Fernández и сарадници (2012), су у Шпанији у периоду 1993-2006. године, утврдили присуство салмонела у свежем месу бројлера у малопродаји (цели трупови и основни расечени делови: груди, батаци и крила). Испитано је укупно 226 узорака (73 узорка у 1993. и 153 узорка у 2005. години). Утврђено је присуство салмонела у 40 узорака (55%) у 1993. години и у 19 (12,4%) узорака у 2006. години. Као доминантни сероваријетети утврђени су: *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*.

У Белгији, Uyttendaele (1998) је представила резултате праћења присуства салмонеле на свежем месу живине у промету. Преваленција салмонеле је 1993. године била 19,4%; 1994. године 24,1%; 1995. године 21,9% и 1996. године 36,7%, при чему су трупови бројлера били контаминирани у већем степену него трупови ћурака. Сероваријетети који су најчешће изоловани су: *S. Enteritidis* (16.3%), *S. Hadar* (15.5%) и *S. Virchow* (14.1%), док је *S. Newport* често изолована из основних расечених делова меса ћурака.

У Јужној Африци, спроведно је испитивање степена микробиолошке контаминације трупова бројлера салмонелама у малопродаји, при чему је у 19,2% узорака утврђено присуство салмонела (van Nierop *et al.*, 2005).

У Кини је извршено испитивање присуства салмонела на труповима бројлера и на радним површинама у кланици. Испитано је 104 узорка (52 узорка са трупова бројлера и 52 са радних површина), при чему је у 23 узорка утврђено присуство салмонела. Типизацијом

је утврђено 6 различитих сероваријетета: *S. Indiana* (39%), *S. Infantis* (17,4%), *S. Derby* (13%), *S. Heidelberg* (8,7%), *S. Agona* (8,7%) и *S. Typhimurium* (4,34%), док два изолата нису могла да буду типизована (Wang *et al.*, 2013).

Присуство *S. Infantis* на труповима бројлера

Студија спроведена од стране EFSA о утврђивању преваленције салмонеле у месу бројлера је показала да је *S. Infantis* најфреквентнији сероваријетет у Европској унији, са просеком од 55%, док је у неким земљама Мађарска (96%), Словенија (55%) и Аустрија (44%) и најзначајнији сероваријетет (EFSA, 2007c).

Испитивање спроведено у Аустралији утврдило је да присуство *S. Infantis* у месу живине, бележи пораст од 3,7% у периоду 1993-1994. године, до 8,3% у периоду 2000-2001. године. Током ова два периода испитивања, примећена је промена присуства сероваријетета. *S. Nadar*, *S. Singapore* и *S. Anatum* су заменили: *S. Virchow*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka* и *S. Kiambu* (Sumner *et al.*, 2004).

Испитивање Carita са сарадницима, из 2007. је из 336 узорака трупова бројлера на линији клања изоловало 60 изолата салмонела (17,9%), од чега је утврђено присуство *S. Enteritidis* (60%), *S. Infantis* (10%), *S. Poona* (8,3%), *S. Typhimurium et Agona* (5%), *S. Virchow*, *Newport*, *Paratyphi* (3,3%) и *S. Derby* (1,7%).

Испитивањем узорака пилећег меса (трупови бројлера и основни расечени делови) узетих из малопродаје у Шпанији Álvarez-Fernández и сар. (2006.) су утврдили присуство *S. Infantis* у 2 од 19 узорка или 10,5%.

У Србији је током 2010. године утврђено 2.636 случајева салмонелозе људи, а 2.536 изолата *Salmonella* spp. је серотипизовано. У 2010. години у односу на 2009. годину смањена је преваленција салмонелозе људи за 490 случајева (WHO, 2013).

2.13. Антибиотска резистенција салмонела

Последњих деценија код живине, све је чешћи случај налаза зоонотских бактерија резистентних на антибиотике. Услед нерационалне примене антибиотика широког спектра, узимања лекова у концентрацији преко терапијске дозе, патогене бактерије су

биле излагане интензивној селекцији. Бактерије поседују високо ефикасне мобилне делове генома који имају способност размене и акумулације различитих гена за антимикробну резистенцију (Guerra *et al.*, 2004). Готово свакодневно се откривају нове мутације на генима одговорним за резистенцију у зависности од избора антибиотског лека у терапији салмонеле (Velhner *et al.*, 2013). Резистенција на антибиотике је посредована мобилним деловима генома као што су плазмиди, транспозони или геномска острвца (Velebit *et al.*, 2010). По препорукама EFSA и ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) из 2010. године у месу бројлера, са циљем утврђивања резистенције изолата салмонела из хране од значаја су: ампицилин, цефотаксим, хлорамфеникол, ципрофлоксацин, гентамицин, налидиксична киселина, сулфонамиди и тетрациклини.

Многи серотипови салмонела показују велику резистенцију према антибиотцима, што се користи у њиховом означавању. На пример *S. Typhimurim* DT104 (definitive type 104) карактерише отпорност према ампицилину, хлорамфениколу, стрептомицину, сулфа препаратима и тетрациклинима. Први пут је утврђена у Великој Британији 1984. године. Сероваријетету *Typhimurium* је припадало 7% од изолата у 1990. години, 28% у 1995. години и 32% у 1996. години. Временом *S. Typhimurim* DT104 је стекла резистентност према триметоприму и флуорохинолонима (James *et al.*, 2005).

У храни која је 2001. године увезена у САД, утврђено је присуство 11% изолата салмонела који су резистентни макар на један антибиотик, док је 3,4% било резистентно на три или више антибиотика. Најчешће је забележена резистенција на тетрациклине (9%), сулфаметоксазол (5%), стрептомицин (4%), налидиксичну киселину (3%) и триметроприм/сулфаметоксазол (2%). Изолат *S. Schwarzengrund* из лигњи, пореклом са Тајвана, показао је резистенцију на 8 антибиотика (ампицилин, хлорамфеникол, гентамицин, канамицин, налидиксичну киселину, сулфаметоксазол, тетрациклин и триметроприм/сулфаметоксазол (Zhao *et al.*, 2006).

S. Typhimurium изолована из фецеса живине, као и амбијента и околине фарме, у 46% случајева је била резистентна на стрептомицин, док је 31,5% изолата било резистентно на тетрациклин (Thakur *et al.*, 2013).

У табели 3. дати су подаци о резистенцији на антибиотике салмонела изолованих из мяса бројлера у неким од земаља ЕУ.

Табела 3. Приказ резистенције на антибиотике салмонела изолованих из мяса бројлера у неким од земаља ЕУ (EFSA, 2009)

Држава	Ампицилин (%)	Цефотаксим (%)	Хлорамфеникол (%)	Ципрофлоксацин (%)	Гентамицин (%)	Налидиксична киселина (%)	Сулфонамиди (%)	Тетрациклини (%)
Белгија	21	9	2	9	0	9	22	12
Чешка	30	0	0	55	0	55	55	75
Француска	0	0	7	0	0	0	7	7
Немачка	29	4	8	34	1	33	37	31
Ирска	39	5	5	6	3	6	41	28
Италија	50	0	6	39	0	44	50	72
Холандија	8	4	4	27	8	27	/	46
УКУПНО	27	5	5	22	1	22	33	28

Током утврђивања резистенције на антибиотике и хемиотерапеутике Velhner са сарадницима (2013.) је само код три, од 60 насумице одабраних изолата, утврдила резистенцију на више антибиотика.

У Холандији, Немачкој и Луксембургу током 2000. године, дошло је до експанзије мултирезистентног сероваријетета *S. Java*. Од укупног броја изолата у области живинарства у Холандији у 2002. години *S. Java*, у односу на друге сероваријетете, је

изолована у 61% случајева. Овај сероваријетет је показивао резистенцију на: триметоприм, канамицин, неомицин и налидиксичну киселину (Van Pelt *et al.*, 2003).

У Потугалији Antunes је са сарадницима 2003. године испитивао резистенцију изолованих салмонела из трупова бројлера и ћурака из промета. Утврђено је да је 75 % изолованих салмонела било резистентно на један или више антибиотика. Утврђена је резистенција на налидиксичну киселину и на енрофлоксацин у 50% случајева.

Антибиотска резистенција *S. Infantis*

Nógrády је са сарадницима у периоду 2004-2009. године, из девет земаља Европе, испитао 76 изолата *S. Infantis* изолованих из меса и фецеса бројлера. На основу PFGE испитивања поделио је изолате у две групе, при чему је друга група бројала 33 изолата, пореклом из Аустрије (14), Мађарске (9), Пољске (6), Немачке (1), Италије (1), Турске (1) и Румуније (1). Изолати из ове групе су показали резистенцију на: налидиксичну киселину, стрептомицин, сулфонамиде и тетрациклине (Nógrády *et al.*, 2012).

У Јапану је Shahada са сарадницима 2006. године испитивао антимикуробну резистенцију 135 изолата *S. Infantis* пореклом из живине. Утврђено је да је један изолат (0,7%) резистентан на ампицилин; 97% је резистентно на стрептомицин; 95,6% на сулфаметоксазол; 96,3% на окситетрациклин; 11,1% на канамицин и 36,3% на ципрофлоксацин. Јапан је 1999. године установио програм праћења антибиотске резистенције микроорганизама присутних код животиња намењених производњи хране. Укупно је изоловано 82 сероваријетета салмонеле, при чему је у просеку запажена резистенција на: ампицилин, дихидрострептомицин, канамицин и окситетрациклин (Esaki *et al.*, 2004).

2.14. Изолација и идентификација салмонела

Класичне методе за изолацију и идентификацију салмонела захтевају дужи временски период а и резултати у епидемиолошким студијама, због великог броја сероваријетета салмонела, су недовољно прецизни. У циљу побољшања јавног здравља неопходне су епидемиолошке студије како би се утврдио примарни извор инфекције. Стога је било потребно да се ради на изналажењу метода које ће дати поузданије резултате и омогућити довођење у везу извора инфекције и оболелог. У ту сврху користе се серолошке и

молекуларне методе. Врсте и сероваријетети салмонела се класификују у групе А, Б, Ц и на даље, у зависности од сличности и разлика које имају у О антигену. Тако су *S. Hirschfeldii*, *S. Choleraesuis*, *S. Oranieburg* и *S. Montevideo* класификовани у Ц1 групу јер имају заједничке 6 и 7 О антигене. *S. Newport* је класификована у групу Ц2 јер поседује К и 8 О антигена. За даљу класификацију користе се специфичности флагеларног Н антигена. Ови антигени могу да буду специфични 1 и неспецифични 2. Специфични Н антигени се обележавају малим словима, а неспецифични арапским бројевима. На тај начин се добија комплетна анализа, на пример: *S. Choleraesuis* 6,7,c,1,5 (6 и 7 се односе на О антигене, c је специфични Н антиген, а 1,5 су неспецифични Н антигени). Комбинацијом ових антигена је добијен велики број сероваријетета салмонела (што је приказано у табели 4.):

Табела 4. Антигена структура најчешће присутних салмонела (Jay *et al.*, 2005):

Група	Сероваријетет	О Антиген	Н Антиген	
			Фаза 1	Фаза 2
A	<i>S. Paratyphi A</i>	1, 2, 12	a	(1,5)*
B	<i>S. Schottmuelleri</i>	1, 4, (5), 12	b	1, 2
	<i>S. Typhimurium</i>	1, 4, (5), 12	i	1, 2
C ₁	<i>S. Hirschfeldii</i>	6, 7, (vi)	c	1, 5
	<i>S. Choleraesuis</i>	6, 7	(c)*	1, 5
	<i>S. Oranieburg</i>	6, 7	m, t	/
	<i>S. Montevideo</i>	6, 7	g, m, s (p)*	(1, 2, 7)*
C ₂	<i>S. Newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
D	<i>S. Typhi</i>	9, 12, (Vi)	d	/
	<i>S. Enteritidis</i>	1, 9, 12	g, m	(1, 7)*
	<i>S. Gallinarum</i>	1,9, 12	/	/
E ₁	<i>S. Anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6

* антигени који могу да буду присутни

Последњих година развијено је више молекуларних метода за типизацију патогених микроорганизама.

Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) - Електрофореза у пулсирајућем електричном пољу PFGE карактерише бактерије у субтипове дајући одговарајуће ДНК секвенце након дигестије бактеријске геномске ДНК рестрикционим ензимима. Током овог поступка, бактеријска ДНК се раздваја и касније исеца ензимима до ДНК фрагмената (Stjepanović *et al.*, 2007). Ови ензими врше исецање ДНК на местима где је присутна кратка, специфична секвенца. Рестрикциони ензими дају 8 – 25 трака ДНК (бендови) које садрже 40 – 600 килобазних парова (Wiedman, 2002). Обзиром на то да се фрагменти ДНК молекула ове величине не могу раздвајати стандардним електрофоретским техникама, користи се посебна техника електрофорезе, при чему се мења смер електричног поља, чиме се постиже раздвајање ДНК фрагмената који се касније визуелизују бојењем етидијум бромидом. Овако добијени фрагменти упоређују се са већ постојећом базом података и на тај начин се утврђује степен сродности проучаваног бактеријског соја. Током континуалне електрофорезе, ДНК фрагменти величине 30-50 kb мигрирају истом брзином без обзира на величину, што се на гелу уочава као једна дифузна трака. Међутим, уколико су фрагменти ДНК приморани да мењају смер кретања током електрофорезе, фрагменти различитих величина биће међусобно раздвојени. Са сваком новом преоријентацијом електричног поља, мањи ДНК фрагменти ће почети да се крећу у новом смеру брже него они веће молекулске масе. Услед тога, већи ДНК фрагменти заостају иза, обезбеђујући сепарацију од мањих ДНК фрагмената (Stjepanović *et al.*, 2007).

Ова метода је високо дискриминативна са високом стопом поновљивости. Метода PFGE се показала високо дискриминативном за типизацију *Salmonella* spp., као што је *S. Typhi* и *S. Typhimurium* (Thong *et al.*, 1996; Tsen *et al.*, 1999, 2001; Gorman, Adley, 2001). PFGE метода је врло ефикасна у епидемиолошким студијама сероваријетета салмонела (Murase *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995; Liebisch, Schwartz, 1996; Navaro *et al.*, 1996). У испитивањима сличности изолата *S. Enteritidis*, изолованих у Немачкој и Тајвану, методом PFGE утврђена је висока генетска сличност од 94%. Изолати су потицали из већег броја животиња (Chieh Pang *et al.*, 2007).

Више аутора сматра да је ова метода најдискриминативнија за одређивање сероваријетета *S. Enteritidis* (Olsen *et al.*, 1994; Thong *et al.*, 1995; Boonmar *et al.*, 1997; Tassios *et al.*, 1997; Laconcha *et al.*, 1998). Главни недостатак ове методе је тај што је она врло захтевна, захтева пуно интензивног рада, и недеља дана може да прође док резултати не буду доступни. Matushek и сарадници (1996) су развили брзи PFGE метод који може да да резултате за мање од три дана.

Метода **Polymerase Chain Reaction (PCR)** се заснива на селективном умножавању специфичних делова ДНК ланца.

Real Time PCR је метода која подразумева детекцију PCR производа током експоненцијалне фазе, када се процес умножавања ДНК најбрже дешава, док је сама реакција у овој фази високо специфична и тачна.

Multiplex PCR је варијанта традиционалних PCR метода и заснива се на умножавању већег броја антигена или генетских фрагмената истовременим коришћењем више сетова прајмера.

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) је метода у којој се користе кратки произвољно одабрани прајмери за умножавање делова ДНК методом PCR, при нерестриктивним условима.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) је „fingerprint” техника која не захтева информације о секвенци изучаваног организма. Поновљивост је већа него што је то случај код RAPD-а. Почетни корак подразумева дигестију целог генома рестрикционим ензимима, након чега следи лигација и PCR реакција. Фрагменти, добијени методом AFLP се раздвајају на денатуришућим геловима, а визуелизација фрагмената може да буде ауторадиографска или флуоресцентна.

Restriction Endonuclease Analysis (REA) метода се заснива на препознавању и сечењу укупне ДНК микроорганизма на одређеним местима у хромозому. Као последица дејства рестрикционих ендонуклеаза настају фрагменти различите дужине (Lakićević, 2012).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Према подацима из литературе у настајању салмонелозе људи значајну улогу имају месо и производи од меса живине, а повећана резистенција на антимикробне лекове отежава лечење салмонелозе људи. Стога је, у оквиру ове докторске дисертације, за циљ постављено да се сагледају извори инфекције живине на фармама, утврди учесталост налаза *Salmonella* spp. на труповима живине на линији клања и оцени да ли се применом биосигурносних мера на фарми смањује учесталост налаза салмонела на труповима закраних бројлера. Поред тога, циљ истраживања је и да се упореде изолати са трупова живине са сојевима салмонела изолованих у случајевима обољења људи, као и да се испита осетљивост изолата салмонела према антимикробним лековима.

За остваривање ових циљева постављени су следећи задаци:

3.1. Утврдити учесталост налаза *Salmonella* spp. на труповима живине на линији клања;

3.2. Утврдити изворе инфекције живине салмонелама на фарми;

3.3. Оценити да ли се применом биосигурносних мера на фарми смањује учесталост налаза салмонела на труповима закраних бројлера;

3.4. Упоредити изолате са трупова живине са сојевима салмонела изолованих у случајевима обољења људи;

3.5. Испитати осетљивост изолата салмонела према антимикробним лековима.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Узорци коже врата са трупова бројлера

Како би се утврдио степен присуства *Salmonella* spp., на линији клања бројлера, током четири године (2008-2011.) испитано је 520 узорака коже врата формираних од 1560 трупова бројлера узетих са линије клања у индустријском објекту. У циљу утврђивања учесталости налаза *Salmonella* spp. на труповима живине и сагледавања извора контаминације испитано је 200 узорака коже врата бројлера формираних од 600 трупова из три објекта различитог капацитета клања.

4.2. Сојеви микроорганизама

Салмонела изолована из узорака коже врата (17 изолата), 5 изолата салмонела изолованих у случајевима обољења људи и референти сој АТСС.

4.3. Хранљиве подлоге и реагенси

Пуферисана пептонска вода:

- Ензимски разграђени казеин	10,0 g
- Натријум хлорид	5,0 g
- Динатријум хидроген фосфат додекахидрат	9,0 g
- Калијум дихидроген фосфат	1,5 g
- Вода	1000 ml

рН вредност је $7,2 \pm 0,2$. Припремљена пуферисана вода је стерилисана 15 минута при 121°C . Раствор је чуван до употребе на $+25^{\circ}\text{C}$.

Пуферисана пептонска вода се инокулише на температури околине делом узорка за испитивање, а онда се инкубира на $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ током 18 сати ± 2 сата. У случају великих количина, пуферисана пептонска вода треба да се загреје до $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ пре инокулације са делом узорка за испитивање.

Rappaport Vassiliadis течна подлога са сојом (RVS подлога):

Подлога се састоји из три раствора (А, Б и Ц).

Раствор А има следећи састав:

- производ ензимског разлагања соје	5 g
- натријум хлорид	8 g
- калијум дихидроген фосфат (KH_2PO_4)	1,4 g
- дикалијум хидроген фосфат (K_2HPO_4)	0,2 g
- вода	1000 ml

Компоненте су растворене у води загревањем до око 70°C , ако је потребно. Раствори се морају припремити на дан припремања RVS подлоге.

Раствор Б има следећи састав:

магнезијум хлорид хексахидрат ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400 g
Вода	1000 ml

Магнезијум хлорид је растворен у води. Пошто је ова со врло хигроскопна, препоручује се да се раствор целокупан садржај $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ из новоотворене посуде у складу са формулом. На пример, 250 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ дода се у 625 ml воде, тако да се добије раствор укупне запремине од 788 ml и масене концентрације од око 31,7 g у 100 ml $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Раствор се може чувати у боци од тамног стакла са непропустљивим запушачем на собној температури најмање 2 године.

Раствор Ц има следећи састав:

- малахит зелени оксалат	0,4 g
- вода	100 ml

Малахит зелени оксалат је растворен у води. Раствор се може чувати у боци од смеђег стакла, на собној температури, најмање 8 месеци.

Комплетна RVS подлога се састоји од раствора А (1000 ml), Б (100 ml) и Ц (10 ml). Ако је било потребно, подешен је рН подлоге, тако да после стерилизације буде $5,2 \pm 0,2$. Пре употребе подлога је разливена у епрувете у количинама од по 10 ml и стерилише се 15 минута у аутоклаву подешеном на 115°C . Тако припремљена подлога се складишти на $+3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и користи се на дан припреме.

Rappaport – Vassiliadis подлога са сојом (RVS бујон) као и Muller – Kauffman тетрационат/новобиоцин бујон (МКТТн бујон) су инокулисани предходно добијеном културом. RVS бујон је инкубиран на $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, током 24 сата ± 3 сата, а на МКТТн бујону на $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, током 24 сата ± 3 сата.

Ксилоза лизин дезоксихолат агар (XLD агар):

Састав основне подлоге је:

- екстракт квасца у праху	3 g
- натријум хлорид	5 g
- ксилоза	3,75 g
- лактоза	7,5 g
- сахароза	7,5 g
- L лизин хидрохлорид	5,0 g
- натријум тиосулфат	6,8 g
- амонијум гвожђе (III) цитрат	0,8 g
- фенол црвено	0,08 g
- натријум дезоксихолат	1,0 g
- агар	9-18 g
- вода	1000 ml

Основне дехидриране компоненте су растворене или је дехидрирана комплетна основна подлога у води загревана до кључања, уз често мућкање. Ако је било потребно, подешен је рН подлоге, тако да након стерилизације буде $7,4 \pm 0,2$ на 25°C . Основна подлога је разливена у епрувете или балоне одговарајуће запремине. Загревана је, уз често мешање, док не прокључа и док се агар не раствори.

Подлога се одмах пренесе у водено купатило температуре од $44-47^{\circ}\text{C}$, промућка и разлива у Петри шоље и оставља се да очврсне. Непосредно пре коришћења, подлоге са агаром се

пажљиво осуше (пожељно са скинутим поклопцима и окренуте надолу) у пећи, на температури 37-55°C. Разливена подлога је складиштена до 5 дана на $+3^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Muller – Kauffman тетратионат – новобиоцин бујон (МКТТn)

Састав подлоге:

- екстракт меса	4,3 g
- производ ензимског разлагања казеина	8,6 g
- натријум хлорид	2,6 g
- калцијум карбонат	38,7 g
- натријум тиосулфат пентахидрат ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	47,8 g
- говеђа жуч за бактериолошку употребу	4,78 g
- брилијант зелено	9,6 mg
- вода	1000 ml

Основне дехидриране компоненте се растворе или се раствори дехидрирана комплетна подлога у води, на температури кључања у трајању од 5 минута. Ако је потребно, подешен је рН, тако да буде $8,0 \pm 0,2$ на 25°C. Подлога је темељно измешана. Основна подлога може да се складишти 4 недеље на $+ 3 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Рамбах агар (Rambach агар), комерцијално разливена подлога произвођача, Merck.

4.4. Утврђивање присуства антигена салмонела у узорцима

Применом ELFA метода рађена је детекција антигена салмонела. Реагенси за извођење анализа су паковани по 30, односно 60 тестова по паковању. Свако паковање садржи унапред издељене реагенс стрипове и наставке (пипете) са чврстом фазом, као и неопходне контроле и референтни материјал. Помоћу налепнице са бар кодом идентификује се врста анализе, серијски број, редни број, рок трајања теста. Сваки реагенс стрип садржи једно удубљење за узорак, осам удубљења за реагенс и једну оптичку кивету. За преношење узорка у китове користи се обликовани наставак пипете направљен од полипропиленског или полистиренског материјала. Током израде, унутрашња површина је обложена антителима за апсорпцију антигена салмонела.

Реагенси за VIDAS технику - Mini VIDAS је компактни имуноанализатор који се састоји од:

- централне обрадне јединице, која контролише цео систем и чини је тастатура са нумеричким и функционалним тастерима, LCD и термални принтер
- аналитичке јединице

Сви ови елементи су интегрисани у исти модул.

Китови - Пластични китови (произвођач Biomerieux, France) се састоје од пластичног рама са десет бунарчића који су са унутрашње стране обложени антителима према салмонела специфичним антигенима. Сваки кит има SLM код. Аутоматском пипетом се у први бунарчић кита преноси 0,1 мл испитиваног узорка и процес испитивања присуства антигена салмонела се обавља аутоматски. Ако су антигени салмонеле присутни у узорку, они ће се везати са унутрашње стране бунарчића, док се невезане компоненте избацују испирањем. Током последње фазе испитивања, додаје се супстрат 4 метил умбилиферил фосфат, који доводи до настанка флуоресцентног производа 4 метил умбилиферона, чија се флуоресценција мери на 450 nm. На крају анализе, за сваки узорак, резултати се аутоматски читавају. Добијени резултати се затим пореде са интерном референцом и интерпретирају се као позитивни/негативни.

Детекција антигена салмонела применом аутоматизованог квалитативног теста mini Vidas (Biomerieux Француска)

Под асептичним условима расецане су пластичне транспортне кесе и узорак је пинцетом пренет у лабораторијске пластичне кесе „Темпо“ (произвођач BIOMEREIUX Француска). Ове кесе садрже посебну газу која филтрира партикуле испитиваног узорка. Узорак је затим наливен са пуферисаном пептонском водом која се користи као подлога за предобогаћење. Узорак је потом хомогенизован у Stomacher-у 20 секунди. Након хомогенизације, узорак је инкубиран у термостату 24 сата при температури од 37°C.

По завршеној инкубацији из пептонске воде узорак је пресејан у салмонела SX2 бујон (произвођач BIOMEREIUX Француска) или у Rapport Vassiliadis подлогу. Из филтрираног дела кесе, аутоматском пипетом је, под стерилним условима, пренет 1 ml

узорка у течну SX2 подлогу. Засејане подлоге су инкубиране 48 сати у термостату на температури од 41,5°C.

Припрема узорка за израду имуноензимске пробе:

Након инкубације пептонске воде, 1 ml узорка је пренет у посебну епрувету. Преостали део узорка је обележен и одложен, до добијања резулата аутоматизованог квалитативног теста помоћу mini Vidas апарата (Biomerieux Француска). Одвојена количина узорка за имуноензимску методу је однета на деструктор како би се извршила деструкција ћелија салмонела топлотом. У деструктору (Techne, Dri Block DB 3D, слика 8.) на температури од 90°C у трајању од 15 минута, врши се разлагање ћелијског зида бактерије, како би антигени салмонеле били доступни за утврђивање имуноензимским реакцијама.



Слика 8. Деструктор (Techne, Dri Block DB 3D)

Након 15 минута, када је ћелијски зид бактерија разложен, 0,1 мл узорка је аутоматском пипетом пренет у пластични рам који се поставља у mini Vidas апарат.

SRP (Solid Phase Receptacle) је обликовани наставак врха пипете направљен од полипропиленског или полистиренског материјала. Током израде унутрашња површина је

обложена антигеном или антителом за апсорпцију што јој омогућава да апсорбује растворљиве протеине.

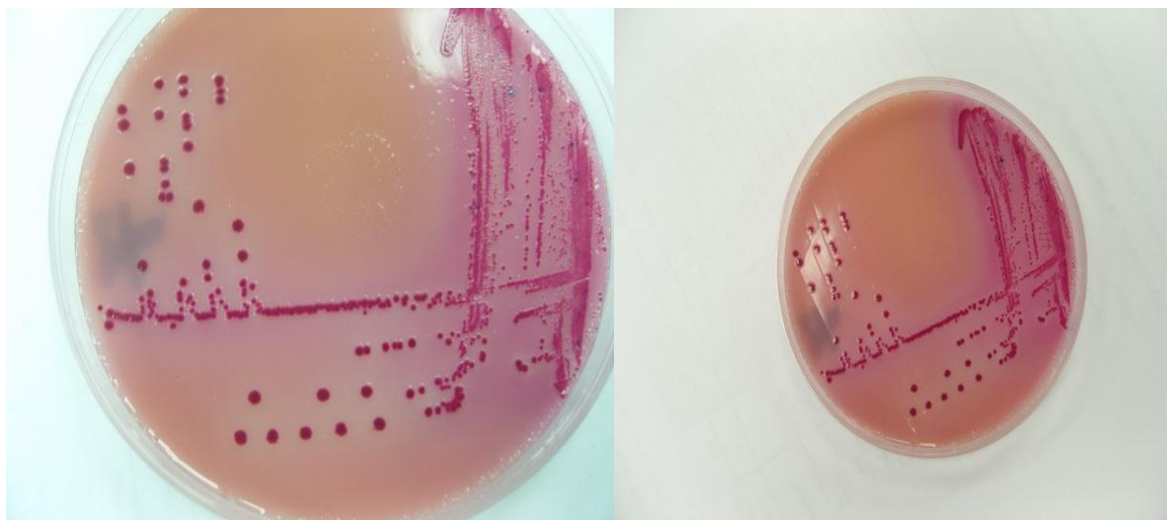
Сваки реагенс стрип садржи једно удубљење за узорак, осам удубљења за реагенс и једну оптичку кивету



Слика 9. Апарат miniVidas (Biomérieux France)

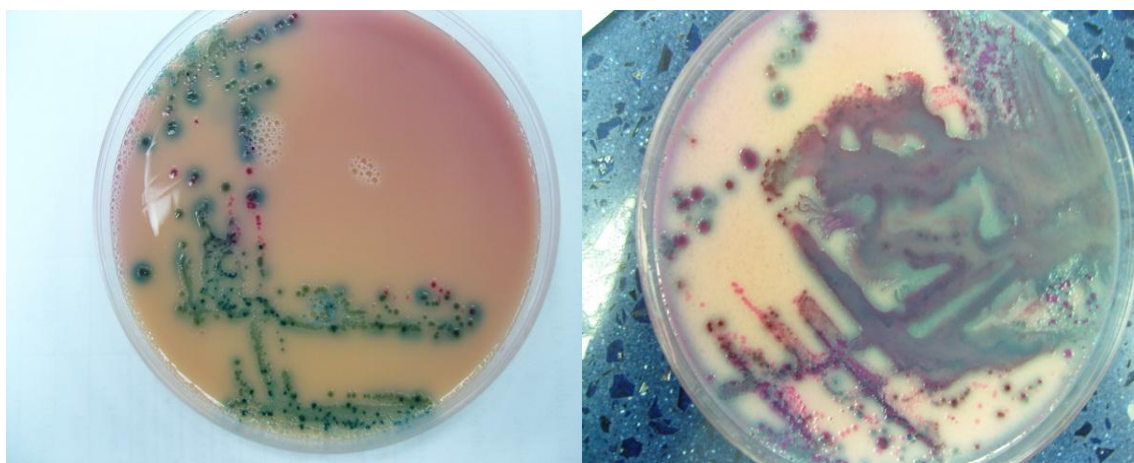
4.5. Засејавање узорака позитивних на присуство антигена салмонела на хранљиве подлоге

Након што су детектоване салмонеле у узорку преостали део пептонске воде, који је остављен до добијања резултата на mini Vidas апарату, засејан је на диференцијалне подлоге: ксилоза лизин дезоксихолат агар (XLD агар) и Рамбах агар (Rambach агар) како би се стандардним микробиолошким методама изоловале салмонеле. Засејане подлоге су инкубиране 24 сата на температури од +37°C. Карактеристичне колоније за салмонеле на Рамбах агару су црвене, од околине јасно диференциране колоније (слика 10.), док на XLD агару салмонела расте у виду колонија црвене боје са црним средиштем, док изоловане колоније могу да буду и жуте боје са црним средиштем.



Слика 10. Раст колонија салмонела на селективној подлози Рамбах

Поновно пресејавање на исте подлоге је вршено у случају израстања ситних, мутних црвених колонија, нејасно диференцираних од осталих колонија (слика 11.).



Слика 11. Прерасле колоније салмонела другим врстама бактерија

Овај процес пречишћавања је понављан више пута све до добијања чистих, јасно уочљивих и лепо диференцираних колонија. Такве колоније су у стерилним условима, езом пренете у криогене ампуле и замрзнуте на -18°C . При тој температури изолати салмонела су чувани за даља испитивања.

4.6. Идентификација салмонела поливалентним и моновалентним антисерумима према Kauffman – White схеми

Колоније суспектних салмонела су пресејане, затим су изоловане по предходно описаном поступку, а идентификоване су одговарајућим биохемијским и серолошким тестовима. За серолошку типизацију салмонела коришћени су антисеруми за салмонеле произвођача Statens Serum Institut Denmark.

Табела 5. Kauffman-White схема за идентификацију салмонела (http://en.wikipedia.org/wiki/Kauffman%E2%80%93White_classification)

Група	Сероваријетет	„О” антигени	Специфични „Н” антигени	Неспецифични „Н” антигени
A	S. Paratyphi A	1,2,12	a	
	S. Paratyphi A var. Durazzo	2,12	a	
B	S. Paratyphi B	1,4,5,12	b	1,2
	S. Paratyphi B var. Odense	1,4,12	b	1,2
	S. Java	1,4,5,12	b	(1,2)*
	S. Limete	1,4,12,27	b	1,5
	S. Typhimurium	1,4,5,12	i	1,2
	S. Typhimurium var. Copenhagen	1,4,12	i	1,2
	S. Agama	4,12	i	1,6
	S. Abortus-equi	4,12		e,n,x
	S. Abortus-ovis	4,12	c	1,6
	S. Agona	4,12	f,g,s	
	S. Brandenburg	4,12	l,v	e,n,z ₁₅
	S. Bredeney	1,4,12,27	l,v	1,7
	S. Derby	1,4,5,12	f,g	
	S. Heidelberg	1,4,5,12	r	1,2
	S. Saintpaul	1,4,5,12	e,h	1,2
	S. Salinatis	4,12	d,e,h	d,e,n,z ₁₅
	S. Stanley	4,5,12	d	1,2
C ₁	S. Pratyphi C	6,7,	c	1,5
	S. Choleraesuis	6,7	c	1,5
	S. Choleraesuis var. Kunzendorf	6,7	(c)	1,5
	S. Decatur	6,7	c	1,5
	S. Typhisuis	6,7	c	1,5
	S. Bareilly	6,7	y	1,5
	S. Infantis	6,7	r	1,5

	S. Menston	6,7	g,s,t	
	S. Montevideo	6,7	g,m,s	
	S. Oranienburg	6,7	m,t	
	S. Thompson	6,7	k	1,5
C ₂	S. Bovismorbificans	6,8	r	1,5
	S. Newport	6,8	e,h	1,2
D	S. Typhi	9,12,Vi	d	
	S. Ndolo	9,12	d	1,5
	S. Dublin	1,9,12	g,p	
	S. Enteritidis	1,9,12	g,m	
	S. Gallinarum	1,9,12		
	S. Pullorum	(1),9,12		
	S. Panama	1,9,12	l,v	1,5
	S. Miami	1,9,12	a	1,5
	S. Sendai	1,9,12	a	1,5
E ₁	S. Anatum	3,10	e,h	1,6
	S. Give	3,10	l,v	1,7
	S. London	3,10	l,v	1,6
	S. Meleagridis	3,10	e,h	1,w
E ₂	S. Cambridge	3,15	e,h	1,w
	S. Newington	3,15	e,h	1,6
E ₃	S. Minneapolis	(3),(15),34	e,h	1,6
E ₄	S. Senftenberg	1,3,19	g,s,t	
	S. Simsbury	1,3,19		z ₂₇
F	S. Aberdeen	11	i	1,2
G	S. Cubana	1,13,23	z ₂₉	
	S. Poona	13,22	z	1,6
H	S. Heves	6,14,24	d	1,5
	S. Onderstepoort	1,6,14,25	e,h	1,5
I	S. Brazil	16	a	1,5
	S. Hvitvingfoss	16	b	e,n,x
Остали	S. Kirkee	17	b	1,2
	S. Adelaide	35	f,g	
	S. Locarno	57	z ₂₉	z ₄₂

*Напомена: антигени у заградама су они који су ретко изражени у сероваријетету

4.7. Гел електрофореза у пулсном пољу

Употребљени реагенси и пуфери:

Пуфери:

TE пуфер (10 mM трис: 1 mM EDTA, pH 8,0)

Cell suspension пуфер (100 mM трис и 100 mM EDTA, pH 8,0)

Cell lysis пуфер (50 mM трис и 50 mM EDTA, pH 8,0 + 1% Sarcosyl)

Пуфер рестрикционог ензима XbaI: 33 mM Tris ацетата, 10 mM магнезијум ацетата и 66 mM калијум ацетата и 0,1 mg/ml BSA пуфера

1% SeaKem Gold агарозе

HPLC вода (Chromasolv, Sigma Aldrich)

Ензими

Протеиназа К јачине >600 u/ml (~20 mg/ml, Thermo Scientific, SAD)

XbaI (Thermo Scientific, SAD)

Раствор етидијум бромидида 20µg/ml

Употребом Гел-електрофорезе у пулсном пољу (Pulsed field gel electrophoresis-PFGE) извршена је генотипска идентификација изолованих сероваријетета салмонела и утврђен степен генетске сродности између идентификованих изолата салмонела пореклом са коже врата бројлера, у односу на изолате који су изоловани из фецеса оболелих људи.

PFGE метода се обављала по протоколу U.S. CDC PulseNet protocol (One-Day 24 – 28 h, Standardized Laboratory Protocol for molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Електрофореза је обављана системом CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California), уз употребу 1% SeaKem агарозе и Трис EDTA пуфера, на 220 V са временом рада од 17,5 сати.

Поређење добијеног PFGE профила је обављано помоћу програма Quantity One ver. 4.6.3. (Basic). Дендрограм који показује степен генетске сличности изолата је урађен помоћу програма FP Quest ver 4.5.

Из криогених ампула колоније су пренете на триптозни соја агар са додатком 5% дефибринисане овчије крви које су затим инкубиране 18 сати на 37°C.

По завршеној инкубацији израсле колоније су стерилним брисом пренете у кивете са Cell suspension пуфером. Из направљеног разређења градуисаном пипетом је пренето 2ml у кивету за мерење апсорбанце у спектрофотометру. Садржај је стерилним брисом измешан покретима благог трљања о унутрашњи зид кивете, како не би дошло до формирања аеросола у раствору. Тако припремљени раствор пуфера са изолатом у кивети је испитиван на спектрофотометру таласне дужине 610 nm (Thermo Scientific Helios Epsilon UV-VIS). Апсорбанса на спектрофотометру при читавању је била у опсегу 1,3 - 1,4.

Затим је припремљен раствор 1% SeaKem Gold агарозе (Lonza, Switzerland) у ТЕ пуферу. На аналитичкој ваги је одмерено 0,5 g агарозе и додато у 50 ml ТЕ пуфера у пластичној епрувети. Раствор је загреван минут у микроталасној пећници (Electrolux, Sweden) јачине 800 Watt. Предходно припремљени раствор ТЕ пуфера, је до додавања агарозе држан у воденом купатилу на 55-60°C. Поступак растварања се понављао више пута све док није добијен хомогени раствор агарозе у ТЕ пуферу. Време потребно да се агароза комплетно раствори је одређено емпиријски, на основу искуства у лабораторији.

Раствор изолата из кивета је затим, у ламинарној комори, пренет у пластичне конусне тубе (Eppendorf, Germany) које су предходно обележене и постављене на сталак. Аутоматском пипетом је пренето по 200 µl суспензије изолата у тубе. Након тога је у тубе пипетом додато по 20 µl ензима протеиназе К, 3600 јединица/ml (~20 mg/ml, Thermo Scientific, SAD). Протеиназа К спада у групу серин протеаза, то је ендолитични ензим који врши раскидање пептидне везе на карбоксилној страни алифатичних, ароматичних или хидрофобних аминокиселина. Протеиназа К се користи како би ослободио ДНК материјал из бактеријске ћелије. Обзиром да се ДНК-азе и РНК-азе могу налазити на рукама људи током рада у овој фази обавезна је употреба рукавица. Коришћене су плаве нитрилне рукавице без талка (Unigloves, Germany). По 100 µl тако направљене мешавине SeaKem

Gold agaroze, суспензије изолата и протеиназе K је пренето у пластични калуп (Disposable Plug Molds, Bio Rad Laboratories, USA) где је након 30 минута отврдно у мале гел плочице правоугаоног облика. Након тога су гел плочице агарозе пренете у Eppendorf тубе од 2 ml, у којима се налазио раствор протеиназе K и суспензија салмонела којој је додата протеиназа K и Cell lysis пуфер. Пребацивање је рађено помоћу металних лопатица, уз предходно скидање траке са доње стране рама пластичног калупа. Цео поступак је рађен у ламинарној комори. Тубе су затим пренете у мешач (Thermo shaker TS 100, Biosan, Switzerland), на програм од 17 сати. Гел плочице у којима су се налазиле заробљене салмонеле су интензивно мешане у условима регулисане и подешене температуре од 54°C.

Циљ овог поступка је да под утицајем протеиназе K и састојака пуфера за лизирање дође до разарања ћелијског зида бактерија без ломљења и кидања ланаца ДНК како би ДНК ланац у целости био доступан рестриктивним ензимима.

По завршетку инкубације испиране су плочице гела у тубама, које су везале генетски материјал салмонела из суспензије. Испирање је рађено седам пута, два пута са TE пуфером и пет пута са ултрапречишћеном водом (AccuGene, Molecular Biology Water, Lonza, Belgium), која је загрејана пре употребе у воденом купатилу на 56°C. На тај начин су уклоњени остаци протеиназе и непожељне партикуле које су настале као продукт лизирања, како би се добио геном салмонеле у што чистијем облику. Испирање туба је рађено у ламинарској комори помоћу пипете. Течни садржај са нечистоћама је отпипетиран, тако да у туби остану гел плочице агарозе, са фиксираним геномом салмонеле, на дну. Након тога, у тубе је додат раствор TE пуфера или пречишћене воде, при чему се пуне до врха и затварају затварачем. Напуњене тубе се односе и постављају у постоља мешалице. Процес мешања траје 30 минута. Процес испирања је понављан седам пута, уз редовно мењање наставка на пипети запремине 1000 µl (Expell, Mexico).

Након испирања, у тубу је додат ензим XbaI (Thermo Scientific, SAD) заједно са Tango пуфером. Ензим XbaI је концентрације 10 јединица/ µl. У сваку тубу је пипетом додато 200 µl ензима, који је по типу рестрикциона ендонуклеаза која врши раскидање генома салмонеле на више фрагмената. Једна јединица се дефинише као количина ензима која разгради 1µg ДНК материјала за 60 минута на 37°C, у 50 µl пуфера.

Након испирања плочице агарозе, са фиксираним ДНК материјалом салмонеле, су пренете из тубе на стерилну подлогу (Петри шоља), где је скалпелом (Romed, Ireland) пресечена једна плочица на три дела. Одвојени део је пренет у другу тубу са затварачем, где се налази пречишћена HPLC вода (Chromasolv, Sigma Aldrich) и третиран са пуферским раствором рестрикционог ензима XbaI (Thermo Scientific Tango buffer). Додавање XbaI ензима се врши пипетом у количини од 15 μ l. Када је додат ензим у раствор са делом плочице и пуфера, проверавано је да ли је гел остао залепљен за зид тубе или испод поклопца, јер тада рестрикција генома неће бити извршена. Након провере, тубе су остављене преко ноћи на 37°C. Након испирања, одвојене секвенце генома салмонеле су се налазиле фиксиране у гелу. Тиме је извршена припрема за финално испитивање.

Пулсна гел електрофореза је рађена на уређају Electrophoresis Cell (Bio Rad, USA). У постоље уређаја наливен је 1% TBE пуфер и формирана је гел плоча за електрофорезу. Гел плоча настаје у калупу стврдњавањем 1 % раствора агарозе, тако што је у 200 ml пречишћене HPLC воде (56°C) додато 2 g агарозе. Гел плоча је затим постављена у поље уређаја, на обележено место. У постоље уређаја наливен је 1% TBE пуфер и прављена гел плоча за електрофорезу.

Гел плочице из тубе су помоћу металне лопатице нанете на просечени пластични рам са правоугаоним изданицима као местима за прихват плочица. Плочице су постављене на врх изданака, док се на свакој шестој позицији налази стандард. Као стандард је коришћен сегментиран геном *Salmonella* Braenderup фиксиран у гел пољу, зато што делови његовог генома показују врло правилно померање и позиционирање у електричном пољу.

Пластични рам са изданицима је потом вертикално постављен у гел плочу која се налази у пољу уређаја за електрофорезу и прекривен је HPLC водом. Након тога је направљена пауза у раду од 40 минута како би гел могао до краја да се стегне. Уређај је подешен на 18 сати рада, при чему су сегменти ДНК материјала салмонела били изложени деловању електричног поља наизменичне струје.

Након завршене електрофорезе, гел је третиран раствором етидијум бромида који везује ДНК ланац и боји га. Сегменти ДНК су тако заузели одређено место, на коме су

фиксиран и обојен. Тада је утврђен карактеристичан положај, пикови, фрагменти на основу којих се утврђује степен генетске сличности.

4.8. Испитивање осетљивости салмонела на антимикробне лекове

Осетљивост изолата салмонела на антибиотике је испитана диск дифузионом методом на Mueller - Hinton агару према Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) упутству. Употребљени су дискови који су садржавали следеће антибиотике: 10 µg ампицилина (пеницилини), 30 µg цефотаксима (цефалоспорини), 5 µg ципрофлоксацина (хинолони), 10 µg гентамицина (аминогликозидни антибиотици), 30 µg налидиксичне киселине (хинолони), 30 µg тетрациклина (тетрациклини) и 30 µg триметроприм сулфаметоксазола (инхибитори фолне киселине), произвођача Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK).

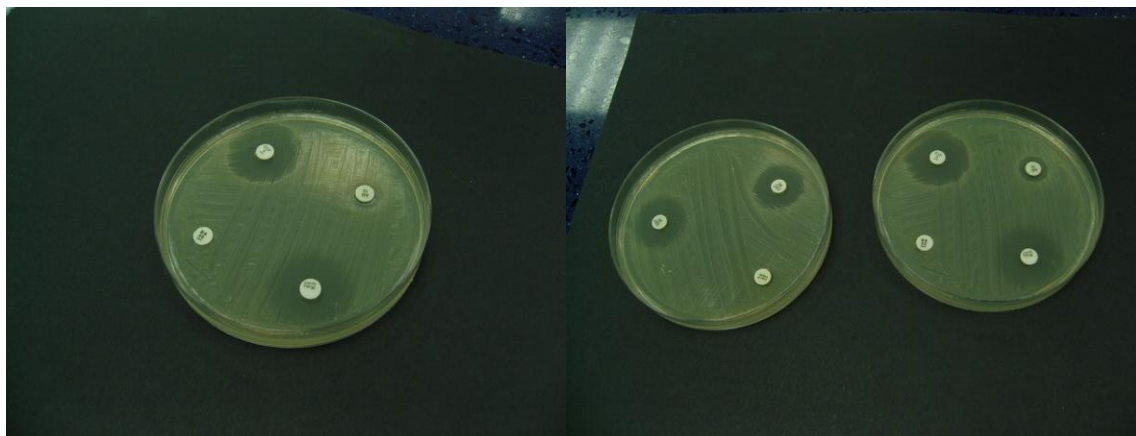
Суспензија микроорганизама се добија мануелним протресањем епрувете, да би се затим стерилном езом равномерно нанела на хранљиву подлогу. Након тога аутоматским уређајем (Oxoid, Velika Britanija) су постављени дискови на површину Mueller Hinton агара.

Тако припремљена подлога је инкубирана 24 сата на температури од 35°C. Након инкубације мерена је зона инхибиције раста испитујућих салмонела око диска са антибиотиком, и према упутству NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) резултати су читавани као: резистентан, интермедијаран и осетљив (табела 6.)

Табела 6. Тумачење и интерпретација резултата осетљивости салмонела на антимикробне лекове према препоруци CLSI:

Антибиотици са употребљеним дозама	Зона инхибиције раста (mm)		
	РЕЗИСТЕНТАН	ИНТЕРМЕДИЈАРАН	ОСЕТЉИВ
АМПИЦИЛИН 10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
ЦЕФОТАКСИМ 30 µg	≤ 22	23-25	≥ 26
ЦИПРОФЛОКСАЦИН 5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
ГЕНТАМИЦИН 10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
НАЛИДИКСИЧНА КИСЕЛИНА 30 µg	≤ 13	14-18	≥ 19
ТЕТРАЦИКЛИН 30 µg	≤ 11	12-14	≥ 15
ТРИМЕТОПРИМ / СУЛФАМЕТОКСАЗОЛ 1,25/23,75	≤ 10	11-15	≥ 16

Величина зоне инхибиције је мерена еталонираним нонијусом (шублер, кљунасто мерило).



Слика 12. Зоне инхибиције раста салмонела на Muller Hinton агару

4.9. Поступци предузети на фарми са које потиче највећи број бројлера код којих је утврђено присуство салмонела

Фарма 1 се састоји од 10 објеката од тврдог материјала, прекривених лимом. У сваком објекту се по турнусу смешта 15.000 – 17.000 пилића, што зависи од доба године, микроклимата и општих услова (интензитет допремања, радни план, доступност хране). Укупан капацитет фарме по турнусу је 150.000 – 170.000 бројлера. Годишње се на фарми реализује 5 – 6 турнуса.

Сваки објекат на фарми 1 је дужине 100 метара, ширине 12 метара, висине зида 1,8 метара од чијег врха почиње да се уздиже коси кров до средине објекта. На сваком објекту се налази вентилациони систем. Улаз објекта је окренут ка средишњем делу фарме и до њега води асфалтирани пут. Испед улаза се налази силос за храну. Под објекта је бетониран, на прозорима се налазе мрежице које спречавају улазак инсеката. На крају објекта налазе се врата кроз која се износи ђубре и употребљена простирка. Иза објеката налази се кружни пут који води до другог улаза/излаза.

На фарми 1 су предузете све биосигурносне мере (стриктна контрола хигијене запослених радника на фарми, санитација опреме при сваком уласку на фарму), затим одмор објекта пре усељавања новог производног турнуса у трајању од месец дана, набавка једнодневних пилића од проверених добављача који могу да документују да пилићи нису инфицирани салмонелом, провера хране, појачане мере дезинфекције, дезинсекције и дератизације, са

циљем уништавања сваког потенцијалног вектора у којем би салмонела могла да презистира до доласка новог пријемчивог јата.



Слика 13. „Одмор” објекта на фарми 1

Три дана пред усељење новог јата, у објекте је унета простирка од сламе и извршено је третирање парама формалдехида у трајању 12-24 сата. По извршеном третману, објекти су проветрени.



Слика 14. Припрема објекта за усељење новог турнуса



Слика 15. Постављени метални рам са коцком формалдехида на поду објекта где је размакнута простирка

Једнодневни пилићи су камионом допремљени на фарму. Истовар је вршен од стране радника у чистим, уредним оделима са маскама преко лица. Једнодневни пилићи су се пребацивали ручно у гајбама, преко улазног дела објекта на фарми, који је био посут кречом. Прва тријажа је рађена при насељавању објекта. Одвојени су сви пилићи који су проглашени неодговарајућим за тов (мала тежина, постојање телесних оштећења). При уселењу, сам објекат је подељен на три дела. Једнодневни пилићи су уведени само у један део, који је предходно темперiran (32-33°C). Одвајање објекта је урађено коцкама сламе. Временом током трајања това, како пилићи буду расли, тако се коцке сламе померају све више ка зиду, све док цео објекат не постане доступан јату. Током това простирка није изношена, већ је по потреби додавана нова, посебно по влажним местима и угловима објекта. Тов бројлера је трајао 42 дана, са просечном тежином на крају 1,8-1,9 кг.

Током това, на недељном нивоу је вршено испитивање присуства салмонела у објекту на фарми, узимањем брисева са опреме (хранилица, појилица) и зида објекта (место спајања пода и зида). Такође испитивано је присуство салмонела у узорцима хране и воде, стандардном методом SRPS ISO 6579.

5. РЕЗУЛТАТИ

Резултати добијени испитивањем извора инфекције живине на фармама и учесталости налаза *Salmonella* spp. на труповима живине на линији клања; резултати добијени упоређивањем изолата са трупова живине са сојевима салмонела изолованих у случајевима обољења људи; резултати испитивања осетљивости изолата салмонела према антимикуробним лековима; резултати испитивања ефикасности биосигурносних мера на фарми на смањење учесталости налаза салмонела на труповима закраних бројлера су приказани у пет подпоглавља.

5.1. Резултати утврђивања учесталости налаза салмонела на труповима бројлера на линији клања

Испитивања налаза салмонела на труповима живине су рађена у једној кланици да би се сагледала величина проблема који салмонеле представљају у производњи меса бројлера. У периоду од 2008 до 2011. извршено је праћење присуства *Salmonella* spp. на кожи врата бројлера. Резултати овог четворогодишњег испитивања су приказани у табели 7.

Табела 7. Приказ броја утврђених случајева присуства салмонела на кожи врата бројлера, за период 2008-2011. године

Серија испитивања	Позитивни узорци коже врата бројлера на присуство <i>Salmonella</i> spp. у 50 узорака из десет узастопних испитивања			
	2008. година	2009. година	2010. година	2011. година
1	4	6	5	4
2	5	5	5	4
3	5	4	5	3
4	4	5	4	3
5	5	5	5	2
6	6	4	5	1
7	6	5	5	1
8	5	4	6	0
9	5	4	6	0
10	6	5	6	0
11	5	5	7	1
12	5	5	7	2
13	5	6	7	2
14	6	6	7	2
15	6	6	7	3
16	5	7	6	3
17	6	7	7	3
18	6	7	7	3
19	6	7	7	2
20	7	6	7	2
21	6	6	6	2
22	7	6	6	3
23	7	6	6	3
24	7	5	6	3
25	6	5	6	3
26	6	5	6	4
Средња вредност	5,65	5,46	6,04	2,27
Стандардна девијација	0,85	0,95	0,87	1,19
Максимум	7	7	7	4
Минимум	4	4	4	0

Резултати испитивања узорака коже врата, узетих у циљу оцене хигијене у процесу производње трупова бројлера у периоду 2008.-2010. година, су показали уједначену хигијенску слику. Налаз *Salmonella* spp. на труповима заклане живине се кретао од $5,46 \pm 0,95$ до $6,04 \pm 0,87$ позитивних узорака. У 2011. години услови хигијене процеса производње су побољшани и просечан налаз *Salmonella* spp. на труповима заклане живине се смањио на $2,27 \pm 1,19$ позитивних узорака.

У 2011. години је у Републици Србији, доношењем Правилника о општим и посебним условима хигијене хране у било којој фази производње, прераде и промета („Сл. Гласник” бр. 72/10), уведено обавезно праћење салмонела на труповима мяса бројлера као показатељ свих мера које се примењују у живинарству и производњи живине. Стога су испитивања присуства *Salmonella* spp. на труповима бројлера у оквиру ове дисертације настављена у 2012. години у три кланице. Резултати испитивања су представљени у табели 8.

Табела 8. Резултати испитивања присуства салмонела на труповима бројлера, на линији клања у три кланице:

Објекат:	Број испитаних узорака:	Утврђено присуство салмонела:	
		Број:	%
Кланица 1	50	0	0
Кланица 2	50	17	34
Кланица 3	50	0	0
Укупно	150	17	11,3

Салмонеле су изоловане у 17 узорака (34%) из коже врата узетих из кланице 2. У узорцима пореклом из кланице 1 и 3 није утврђено присуство салмонела.

Живина клана у кланици 2 је потицала са три фарме. Резултати налаза салмонела на труповима бројлера са те три фарме приказани су у табели 9.

Табела 9. Резултати налаза салмонела у узорцима коже врата бројлера узетих из кланице 2

Објекат	Број испитаних узорака:	Утврђена <i>Salmonella</i> spp.	
		Број:	%
Фарма 1	20	11	55
Фарма 2	15	6	40
Фарма 3	15	0	0
Укупно	50	17	34

Највећи број позитивних узорака 11 (55%) од укупно 20 испитаних, у којима су доказане *Salmonella* spp., потицао је са фарме 1. Мањи број позитивних узорака (40%) у којима је доказано присуство *Salmonella* spp., потицао је са фарме 2, док ни у једном узорку пореклом са фарме 3 није доказано присуство *Salmonella* spp.

5.2. Резултати испитивања извора инфекције бројлера на фарми

Како би се утврдио извор инфекције салмонелама на фарми 1, извршено је укупно три серије узорковања: хране и воде за напајање пилића, као и узимање брисева са хранилице, појилице и са пода/зида објекта. Резултати испитивања су приказани у табели 10.

Табела 10. Резултати испитивања на присуство *Salmonella* spp. узорака хране, воде и брисева у објекту током това бројлера

Датум узорковања	Узорак хране за пилиће	Узорак воде за напајање	Брис са хранилице	Брис са појилице	Брис са зида/пода објекта
21.09.2012.	Није утврђено (Стартер)	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено (под објекта)
09.10.2012.	Није утврђено (Гровер)	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено (зид објекта)
16.10.2012.	Није утврђено (Гровер)	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено (зид објекта)
23.10.2012.	Није утврђено (Финишер I)	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено (зид објекта)
31.10.2012.	Није утврђено (Финишер II)	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено	Није утврђено (зид објекта)

Ни у једном узорку брисева са појилица, хранилица и зидова објекта на месту где се спајају са подовима, као и два узорка хране за бројлере и воде за напајање није утврђено присуство салмонела.

Друго узорковање је извршено једнократно на истој фарми, током другог производног турнуса, у другој недељи това бројлера. Циљ овог узорковања је утврђивање перзистентног присуства салмонеле на фарми, у другом добу године. Резултати испитивања су представљени у табели 11.

Табела 11. Резултати испитивања присуства салмонеле, у објекту на фарми 1, на средини това

Испитивани материјал	Број узорака	Утврђено присуство салмонела
Назувке	5	5
Простирка	5	5
Шкартирани трупови	5	5
Инсекти (муве, бубе, пауци)	5	1 (муве)
Укупно	20	16

Од укупно испитаних 20 узорака, у 16 узорака (80%) утврђено је присуство салмонела и то из: амбијента (назувке, простирке), живих вектора (муве, бубе и пауци) и шкартираних трупова. *Salmonella* spp. је изолована из свих испитаних узорака назувки, простирке и шкартираних трупова бројлера, као и из 20% узорака инсеката.

Треће узорковање је извршено једнократно. Узорковани су једнодневни пилићи уинули у транспорту, непосредно пре насељавања у објект на фарми 1. Узорковање је спроведено са циљем утврђивања извора контаминације, тј. да ли салмонела на фарму доспева преко једнодневних пилића или је извор контаминације везан за сам микроклимат и амбијент фарме. Резултати испитивања су представљени у табели 12.

Табела 12. Резултати испитивања присуства салмонеле у труповима једнодневних пилића

Испитивани материјал	Број узорака	Утврђено присуство салмонела
Трупови једнодневних пилића	20	/
Укупно	20	/

Ни из једног од укупно 20 испитаних трупова једнодневних пилића, нису изоловане *Salmonella* spp.

Салмонеле изоловане из узорака коже врата бројлера су серолошки идентификоване. Резултати тих испитивања су приказани у табели 13.

Табела 13. Серолошка идентификација салмонела изолованих из узорака коже врата узетих са трупова бројлера

Број серолошки испитаних изолата салмонела	Сероваријетет салмонела
17	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serovar Infantis (6,7 : r : 1,5)

Свих 17 изолата салмонела су идентификовани као *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Infantis (6,7 : r : 1,5).

5. 3. Резултати оцене примене биосигурносних мера на фарми на смањење налаза салмонела на труповима бројлера на линији клања

У предходном испитивању утврђено је да са фарме 1 потиче 11 од укупно 17 узорака позитивних на присуство салмонела.

Након предузетих свих биосигурносних мера на фарми 1, у кланици 2, на линији клања је утврђено присуство салмонеле у узорцима коже врата бројлера, пореклом искључиво са фарме 1. Резултати су приказани у табели 14.

Табела 14. Резултати испитивања присуства салмонела на труповима бројлера пореклом са фарме 1, у кланици 2:

Кланица/објект	Број испитаних узорака	Утврђена <i>Salmonella</i> spp.	
		Број	%
Кланица 2/Фарма 1	50	5	10

Резултати праћења налаза *Salmonella* spp. на труповима бројлера, приказани у табели 14. показују да је, након доследног предузимања биосигурносних мера на фарми 1, налаз салмонела смањен са 55% на 10% узорака коже врата бројлера.

Изолати *Salmonella* spp. су серолошки типизовани. Резултати тих испитивања су приказани у табели 15.

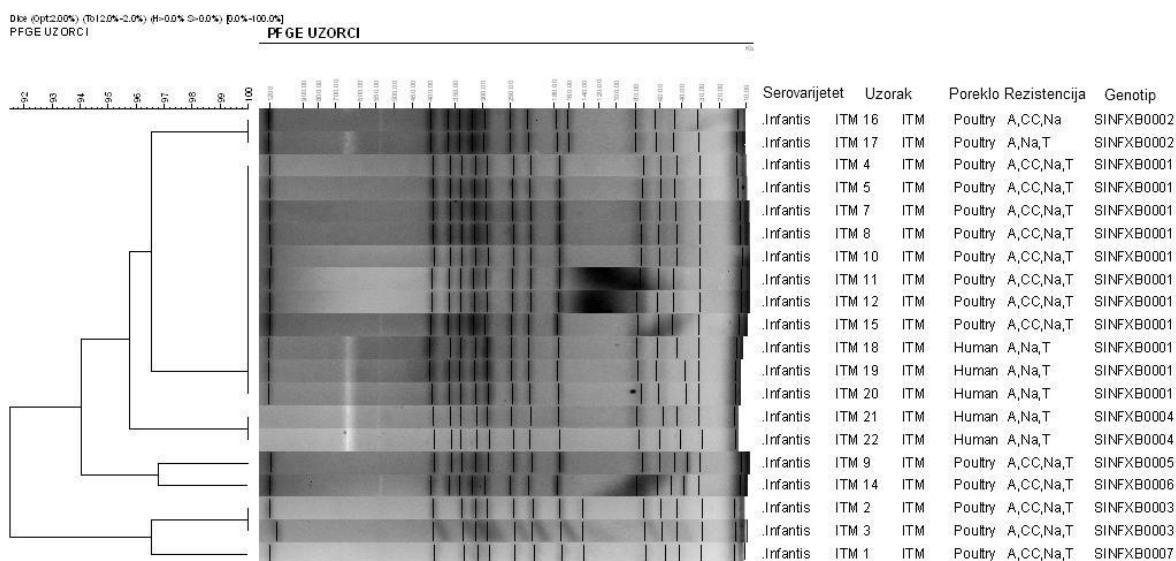
Табела 15. Резултати серолошке идентификације салмонела изолованих у поновном испитивању на фарми.

Број серолошки испитаних узорака:	Утврђени микроорганизам и антигенска грађа:
5	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serovar Infantis (6,7 : r : 1,5)

Салмонеле изоловане из узорака коже врата бројлера са фарме 1 су серолошком типизацијом идентификоване као сероваријетет *S. Infantis* (6,7 : r : 1,5) исто као и сви изолати салмонела из узорака коже врата из кланице 2 приказани у табели 13.

5.4. Резултати упоређивања генетске сличности салмонела изолованих са трупова бројлера са салмонелама изолованим у случају обољења људи

Резултати PFGE салмонела изолованих из узорака коже врата и у случајевима обољења људи, серолошки идентификованих као *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Infantis* (6,7 : r : 1,5) су приказани на слици 16.



Слика 16. Дендрограм електрофоретске схеме, добијене са ензимом *XbaI* – разложени геном ДНК изолата *S. Infantis*, из FPQuest програма који показује коефицијент сличности (Dice koeficijent, UPGMA) између испитиваних изолата са пореклом и антибиотском резистенцијом испитиваних изолата (А – ампицилин; СС – цефотаксим/клавуланска киселина; На – налидиксична киселина; Т – тетрациклини)

Испитивањем генетске сличности салмонела пореклом са кожа врата бројлера и од оболелих људи, добијено је укупно 7 генотипова, међусобне генетске сличности $\leq 92\%$, док је генетска сличност изолата сврстаних у исти генотип износила 100%.

На основу резултата PFGE, салмонеле изоловане из узорака коже врата бројлера, су сврстане у 7 генотипова или генетских профила. Изолати салмонела у оквиру истог генетског профила су показивали степен генетске сличности од 100%. Назив сваког генетског профила је формиран тако што се прво слово односи на врсту микроорганизама, следећа три слова на утврђени сероваријетет, затим се следећа два слова односе на употребљени ензим, уз четири броја који започињу са 0001. Профил SINFXB0001 је утврђен код 11 изолата од којих су 8 пореклом са коже врата бројлера (4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15), док су три соја изолована у случају обољења људи (18,19, 20). Профиле SINFXB0002 (16, 17) и SINFXB0003 (2, 3) је утврђен код изолата пореклом са коже врата бројлера, док је профил SINFXB0004 (21, 22) утврђен код сојева изолованих у случају обољења људи. Профиле SINFXB0005 (9), SINFXB0006 (14) и SINFXB0007 (1) су утврђени код по једног изолата. Коефицијент сличности између генетских профила износи 92%.

5.5. Резултати испитивања осетљивости на антимикробне лекове салмонела изолованих са трупова бројлера и у случајевима обољења људи

Успех у сузбијању салмонелозе живине зависи поред осталог и од осетљивости салмонела на антимикробне лекове. Антибиотици који се користе у ветеринарској медицини често припадају истим групама као и антимикробни лекови који се користе у хуманој медицини. Као последица употребе истих антимикробних лекова код људи и животиња развија се антимикробна резистенција (EFSA, 2012b). Зато употреба антимикробних лекова код животиња, намењених за производњу хране, може да има за последицу појаву резистенције бактерија у организму лечених животиња и трансфер гена резистенције путем хране на људе. Стога је у оквиру ове докторске дисертације испитивана осетљивост на антимикробне лекове салмонела изолованих са трупова бројлера и у случају обољења људи. Резултати осетљивости на антимикробне лекове добијени диск дифузионом методом представљени су у табели 16.

Табела 16. Резултати испитивања осетљивости на антибиотике *Salmonella* spp. изолованих из узорака коже врата и у случају обољења људи (зона инхибиције у mm)

Редни број	Ампицилин	Цефотаксим и Клавуланска киселина	Ципрофлоксацин	Гентамицин	Налидиксична киселина	Тетрациклин	Триметоприм/ Сулфаметоксазол
1.	0	16,93	22,11	17,25	0	0	16,18
2.	0	19,75	22,7	15,96	0	0	16
3.	0	15,91	23,23	17,06	0	0	17,8
4.	11,61	18,13	25,26	13,98	0	6,89	21,66
5.	0	19,85	21,31	16,93	0	7,58	21,19
6.	0	19,64	17,45	15,11	25,5	19,72	23,68
7.	11,52	20,01	26,63	17,15	0	0	21,64
8.	6,73	23,51	23,05	21,54	0	7,02	20,21
9.	10,08	18,3	26,3	13,90	0	7,63	20,94
10.	9,75	17,04	27,1	15,54	0	8,5	20,23
11.	10,19	16,47	56,65	15,00	0	8,18	18,05
12.	9,22	19,85	20	16,70	0	0	20,77
13.	8,83	19,97	16,9	15,54	0	8,01	25,61
14.	12,88	21,35	23,27	13,75	0	9,38	20,48
15.	11,22	19,25	22,84	20,34	0	8,92	21,17
16.	10,44	17,13	25,94	14,00	0	19,65	21,25
17.	15,84	27,77	31,05	18,78	0	8,91	24,72
18.	12,63	37,63	34,88	21,43	0	11	38,15
19.	10,21	38,45	34,85	23,71	0	9,86	36,17
20.	13	23,02	36,77	25,45	0	8,05	24,01
21.	0	30,69	29,61	20,00	0	0	19,67
22.	11,7	32,26	34,41	22,34	0	9,68	33,58

Изолати означени бројевима од 1-17 су пореклом са трупова бројлера, а изолати означени са 18 до 22 су изоловани у случајевима обољења људи. Сви изолати салмонела пореклом од људи и 16 од 17 узорака пореклом са трупова бројлера су били резистентни на налидиксичну киселину.

Збирни приказ резултата испитивања осетљивости на антибиотике *Salmonella* spp. представљен је у табели 17.

Табела 17. Резултати испитивања осетљивости на антимикробне лекове салмонела изолованих са трупова бројлера и у случајевима обољења људи

Антибиотик	Број испита - них изолата	Осетљив		Интермедијарно осетљив		Резистентан	
		Број	%	Број	%	Број	%
Ампицилин	22	0	0	1	4,5	21	95,5
Цефотаксим	22	5	22,8	2	9,0	15	68,2
Ципрофлокса- цин	22	19	86,4	3	13,6	0	0
Гентамицин	22	18	81,8	4	18,2	0	0
Налидиксична киселина	22	1	4,5	0	0	21	95,5
Тетрациклин	22	2	9,0	0	0	20	91,0
Триметоприм сулфаметокса- зол	22	22	100	0	0	0	0

Испитивањем резистенције изолованих *S. Infantis*, утврђено је да су сви изолати били осетљиви на триметоприм сулфаметоксазол (100%), који је лек избора у терапији. Такође висок степен осетљивости је утврђен за лекове: ципрофлоксацин (86,4%) и гентамицин

(81,8%). Изолати су показали висок степен резистенције према лековима: ампицилин и налидиксична киселина (95,5%), затим тетрациклин (91,0) и цефотаксим (68,2%).

6. ДИСКУСИЈА

Утврђивање учесталости налаза салмонела на труповима бројлера на линији клања

Салмонелоза људи је једно од обољења најчешће преносивих храном. Према епидемиолошким подацима у случајевима салмонелозе настале после конзумирања хране, као најчешћи вектор у преношењу салмонела наводи се месо бројлера. Преваленција салмонела у свежем месу бројлера је у директној вези са налазом код живих животиња и хигијенским и технолошким поступцима при производњи меса бројлера (Karabasil *et al.*, 2012). Стога је у циљу смањења салмонелоза животиња и људи донет читав низ превентивних мера. Будући да је месо живине, због прихватљиве цене, лаке сварљивости и добре нутритивне вредности, често саставни део obroка становништва, у производњи ове врсте меса примењују се свеобухватне превентивне мере, које контаминацију трупова салмонелама треба да смање на најнижи реално достижан ниво. Ефикасност примењених превентивних мера на фарми се проверава кроз преглед узорака коже врата бројлера на линији клања, а резултати добијени тим испитивањима показују и хигијену у процесу производње.

Према подацима из литературе у настајању салмонелозе људи значајну улогу имају месо и производи од меса бројлера. Стога је један од циљева ове докторске дисертације био да се сагледају извори инфекције бројлера на фармама, утврди учесталост налаза *Salmonella* spp. на труповима бројлера на линији клања и да се оцени да ли се применом биосигурносних мера на фарми смањује учесталост налаза салмонела.

Резултати испитивања узорака коже врата, узетих у периоду 2008-2010. добијени у нашим испитивањима (табела 5), показују да је тренд налаза салмонела на труповима бројлера на истом нивоу. Ни у једној години тренд налаза салмонела на труповима бројлера током године, анализиран методом помичног оквира, није био изнад 7 на 50 испитаних трупова. У 2008. години установљено је $5,65 \pm 0,85$ позитивних случајева; у 2009. години $5,46 \pm 0,95$, а у 2010. години $6,04 \pm 0,87$.

Ова испитивања су рађена према прописима Европске уније, пошто у Републици Србији такав прилаз у надзору над хигијеном процеса производње није био законски регулисан. У 2010. години, на основу Закона о безбедности хране, донет је Правилник о општим и

посебним условима хигијене хране у било којој фази производње, прераде и промета („Сл. Гласник” бр. 72/10) у којем су дефинисани Критеријуми хигијене у процесу производње као и методе за узимање узорак коже врата бројлера. Наведеним правилником је дефинисано да се сваке недеље узима пет узорак формираних од 15 трупова и да се резултати анализирају после десет узостопних недеља методом помичног оквира. У случају када добијени резултати покажу да је у серији од десет недеља број узорак у којима је доказано присуство салмонела већи од 7, примењују се корективне мере које укључују појачану хигијену у процесу производње меса бројлера у кланици, као и преношење информације вертикално у ланцу производње хране, до примарне производње (фарме). Резултати добијени праћењем хигијене у процесу производње, у нашим испитивањима а на основу обавезе која проистиче из истог Правилника, показују да је у 2011. години смањен налаз салмонела у узорцима коже врата на просечно $2,27 \pm 1,19$ позитивних узорак.

Да би сагледали изворе контаминације трупова бројлера салмонелама извршили смо испитивање узорак коже врата узетих у три кланице. Резултати испитивања присуства салмонела на труповима бројлера на линији клања у три кланице, показали су да је у узорцима пореклом из кланице 2, у 17 односно 34% узорак од укупно 50 испитаних утврђено присуство салмонела. Међутим, када се преваленција салмонела на труповима бројлера анализира по кланицама, у којима је изведено испитивање, запажа се да је присуство салмонела утврђено само у једној (кланица 2) од три испитиване кланице. Анализом података о пореклу бројлера закланих у кланици 2, утврђено је да од укупно 17 позитивних узорак, 11 узорак (55%) потиче са фарме 1.

Учесталост налаза салмонела на труповима бројлера (11,3%) утврђена у нашем испитивању је мања од учесталости налаза на труповима бројлера (22,7%) коју су Álvarez-Fernández и сарадници (2013) утврдили у Шпанији, а већа од просечне учесталости салмонела на труповима бројлера у земљама ЕУ. Према подацима EFSA из 2013. године преваленција салмонела на труповима бројлера је 5,9%. Мања учесталост салмонела на труповима бројлера (7,52%) у односу на резултате добијене у нашим испитивањима је утврђена 2008. године у Француској, а серолошком типизацијом изолата утврђено је 13

различитих сероваријетета (*S. Indiana* 33,3%, *S. Kottbus* 13,9%, *S. Enteritidis* 2,8% и *S. Typhimurium* 1,4%) (Hue *et al.*, 2011).

У истраживању спроведеном у Тајланду, 209 узорака мяса бројлера је испитано на присуство *Salmonella* spp. Том приликом је утврђено присуство салмонеле у 5,26% узорака (Akbar, Kumar Anal, 2013).

Већа учесталост налаза салмонела на труповима бројлера, у односу на резултате наших истраживања, утврђена је у Кини. Wang и сарадници (2013) из узорака узетих на линији клања са трупова бројлера изоловали су салмонеле у 19% случајева. У другој студији спроведеној у Кини испитивањем трупова бројлера, узетих из промета, салмонеле су чешће изоловане (41,6%). Већа преваленција салмонела је била у летњим месецима (јул и август), што се може објаснити оптималним температурама при којима се размножавају салмонеле. Чешће су салмонеле доказали на неупакованим труповима бројлера (45,1%) у односу на упаковане трупове бројлера (37,4%) (Jianghui *et al.*, 2014).

У студији коју је спровео Antunes са сарадницима 2003. године, утврђен је знатно виши степен присуства салмонела на труповима бројлера (60%) него у нашим испитивањима.

Већа учесталост налаза салмонела је доказана и у Турској у периоду од годину дана (април 2005. године - мај 2006. године). Из 200 узорака охлађених упакованих трупова бројлера салмонеле су изоловане из 34%. Серолошком типизацијом утврђено је десет сероваријетета, од којих су доминантни били *S. Typhimurium*, *S. Infantis* и *S. Heidelberg* (Yildirim *et al.*, 2011). Слични резултати су добијени и у једном испитивању спроведеном у САД-у, у периоду септембар 2002 - август 2003. године, у којем су салмонеле утврђене на 44% трупова, а као доминантни сероваријетети доказани су *S. Typhimurium* и *S. Kentucky* (Cui *et al.*, 2005). У испитивању спроведеном у Вијетнаму, током 2007-2009. године испитано је 268 узорака мяса бројлера из промета и из 42,9% узорака изоловане су салмонеле које су серолошком типизацијом сврстане у 14 сероваријетета (*S. Anatum* 15,8%, *S. Infantis* 13,3%, *S. Emek* 10,4%, *S. Derby* 9,5%, *S. Risen* 9,5%, *S. Typhimurium* 9,1%, *S. Reading* 7,5%, *S. London* 6,2%) (Ha Thai *et al.*, 2012).

Серолошком типизацијом салмонела изолованих из различитих ткива бројлера у Етиопији утврђено је присуство следећих сероваријетета *S. Braenderup* (53,7%), *S. Typhimurium*

(30,0%), *S. Anatum* (10,0%), *S. Kottbus* (6,2%), као и *S. Bovismorbificans*, *S. Hadar* и *S. Infantis* (Molla, Mefsin, 2003).

У истраживањима спроведеним 2008. -2012. године у Естонији је испитано присуство салмонела у месу живине. Чешће су салмонеле доказали у месу бројлера (4%) него у месу пореклом од млађих кока (2,22). Изолати салмонела су сврстани у 24 различита сероваријетета (*S. Typhimurium* 26,9%, *S. Derby* 17,5%, *S. Enteritis* 8,37%, *S. Newport* 7,57%) (Kramarenko *et al.*, 2014).

Резултати наших испитивања и подаци из литературе показују да су салмонеле увек у ниском проценту присутне на труповима бројлера. Разлика у учесталости налаза произилази из разлике у условима узгоја бројлера и мера које се примењују у ланцу производње меса. Подаци из ЕУ и резултати наших испитивања показују да мере за смањење налаза салмонела на фарми и њихова примена, поступци при клању бројлера, праћење хигијене у процесу производње на основу налаза салмонела у узорцима коже врата бројлера, као и примена корективних мера на фарми доводе до смањења учесталости налаза салмонела.

Налаз *S. Infantis* у производњи и промету меса бројлера

Последњих година је бележен константан пораст присуства *S. Infantis* у месу бројлера у производњи и промету. То потврђују и резултати добијени у нашим испитивањима у којима су сви изолати салмонела идентификовани као сероваријетет *S. Infantis*.

У више истраживања у свету су добијени резултати слични нашим. Анализом података из литературе запажа се да у периоду до 2000. године *S. Infantis* није изолована из узорака бројлера. Међутим, од 2004. године у литератури има све више података о изоловању *S. Infantis* из узорака узетих са трупова бројлера. У ранијим испитивањима спроведеним у Шпанији (Álvarez-Fernández *et al.*, 1993) ни један од изолата из 40% позитиваних узорака није припадао сероваријетету *S. Infantis*, а у 2006. години исти аутори су сероваријетет *S. Infantis* доказали у 10,5% узорака.

У седмомесечном испитивању спроведеном у Турској, у периоду децембар 2004 - јун 2005. година, присуство салмонела је утврђено у 0,24% случајева, које су идентификоване

као *S. Infantis* (Cetinkaya *et al.*, 2012). У другом испитивању спроведеном у Турској, регија Анкаре, током 2005-2006. године изоловано је 100 изолата салмонела, од чега је најчешћи налаз сероваријетета *S. Infantis* (13%) (Avsaroglu D *et al.*, 2011). У трећем испитивању спроведеном у Турској, укупно је из столице, крви и урина оболелих људи изоловано 53 изолата салмонела из групе С. Том приликом изоловано је 2 изолата *S. Infantis* (Erdem, 2005).

У истраживању спроведеном 2008. године у Аделаиди, Јужна Аустралија, урађено је поређење сероваријетета салмонела изолованих у случајевима обољења људи (94 изолата) са сероваријететима салмонела који су изоловани из свежег меса живине и јаја у промету. Идентификован је 31 сероваријетет, при чему је *S. Typhimurium* била узрочник код 61,7% случајева салмонелозе код људи. У недељи која је предходила појави симптома болести, 62,8% оболелих је изјавило да је конзумирало месо бројлера, док је 47,9% оболелих изјавило да је конзумирало јаја. У испитивању свежег меса бројлера из промета, салмонела је утврђена код 38,8% узорака, при чему су најчешће изоловани сероваријетети *S. Infantis* и *S. Typhimurium*. Сероваријетет који се налазио код оболелих људи, на труповима бројлера и на јајима је *S. Infantis* (Feranley *et al.*, 2008). За разлику од резултата добијених у нашим испитивањима Велхнер и сарадници (2011) су поред *S. Infantis* утврдили присуство и других сероваријетета салмонела (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*).

Toiduamet (2012) наводи да су најчешћи узрочници салмонелозе људи сероваријетети *S. Enteritidis* (60,2%), *S. Typhimurium* (10,6%) и *S. Infantis* (5,7%). Салмонела је доминантан узрочник обољења преносивих храном, и одговорна је за 9 од укупно 13 случајева у 2011. години у Естонији (Kramarenko *et al.*, 2014).

Утврђивање извора инфекције бројлера на фарми

На фарми, јато бројлера може да се инфицира хоризонтално путем фецеса, простирке, хране, воде, опреме, глодара, оболелих дивљих птица, запосленог особља (Barrell, 1982; D'Aoust, 1989; Porpe, 2000; Sapkota, 2014). Како би се утврдио извор контаминације

трупова бројлера салмонелама на линији клања, праћено је порекло бројлера који су допремани на клање. Највећи број трупова бројлера на којима је доказано присуство салмонела је потицао са фарме 1. У циљу утврђивања извора контаминације бројлера салмонелама на наведеној фарми је изведено више испитивања током наредног производног циклуса това бројлера. У првом циклусу испитивања није утврђено присуство салмонела на појилицама, хранилицама и зидовима објекта, као и у два узорка хране за бројлере и воде за напајање. Будући да салмонеле нису утврђене у предходном испитивању, у другој серији испитивања, на истој фарми поред узорака који су раније били предмет испитивања укључени су и живи вектори, инсекти (муве, бубе и пауци) затечени у објекту током това, затим назувке, простирка и шкартирани трупови пилића. Салмонеле су изоловане из свих узорака назувака, простирке и шкартираних трупова пилића, и из 20% узорака живих вектора. Brunet (1989) наводи да инсекти (муве, бубе и ваши) могу да буду вектори узрочника болести живине, што је у складу са нашим налазом салмонела у узорцима мува.

Како би се утврдило да ли контаминација салмонелама потиче из предходног производног корака (инкубаторска станица), испитани су на присуство салмонела узорци једнодневних пилића угинулих у транспорту. Ни из једног трупа угинулих пилића нису изоловане салмонеле. Извори контаминације салмонелама на фарми су бројни, при чему посебну пажњу треба посветити једнодневним пилићима који се након излегања допремају на фарму. За разлику резултата добијених у нашим истраживањима, Кутага и сарадници (2010.) су утврдили присуство салмонела у 37,8% инкубаторских станица.

Резултати наших испитивања показују да су као извор салмонела на фарми најчешћи извори назувке, простирка и трупови шкартираних пилића. Опстанку и ширењу салмонела на фарми посебно доприноси присуство глодара (Meerburg, Kijlstra, 2007), те је стога потребно редовно вршење мера ДДД-а. Присуство салмонела умногоме отежава редовну радну динамику на фармама, обзиром да се тешко искорењује и изискује повећане трошкове санитације и дезинфекције (Rajagopal, Mini, 2013). Присуство салмонеле у јатима бројлера може да знатно варира, мада се обично налази у оквирима 6-30% (Liljebjelke *et al.*, 2005; van der Giessen *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2009), док је у студији Thakura и сарадника (2013) утврђено присуство у 70% објеката за тов бројлера.

У Малезији је спроведена студија којом је требало да се утврди извор контаминације трупова бројлера салмонелама. Испитана је простирка и храна са фарми за узгој родитељских јата и јата бројлера. Укупна преваленција салмонеле је износила 35,5%, при чему је на месу бројлера износила 50%, желудачноцревном садржају 14,3%, простирци 20%. Испитивањем позитивних узорак утврђено је присуство 15 сероваријетета (*S. Enteritidis*, *S. Muenchen*, *S. Kentucky*, *S. Blockley*) (Rusul *et al.*, 1996).

За разлику резултата добијених у нашим истраживањима, више аутора је утврдило да је извор инфекције бројлера храна и вода. Присуство *S. Infantis* у амбијенту фарме (простирка) и храни и води је потврђено и у САД-у (Sapkota *et al.*, 2014). Поред хране и воде као извора инфекције на фарми у Индији (Singh *et al.*, 2013), Чаду (Tabo *et al.*, 2013), Нигерији (Ogji *et al.*, 2005) је као извор инфекције бројлера на фарми доказан и фецес.

Испитивањем амбијента као извора инфекције салмонелама код бројлера Thakura и сарадници (2013) су слично резултатима добијеним у нашим истраживањима утврдили присуство салмонела у простирци, међутим, за разлику од наших резултата присуство салмонела су доказали и у узорцима хране на фарми.

Салмонела на нивоу примарне производње представља велики здравствено економски проблем у земљама где се не примењују адекватне и благовремене мере контроле или на подручјима где клима погодује опстанку и ширењу овог микроорганизма (Barrow, Freitas Neto, 2011).

Утицај примене биосигурносних мера на фарми на смањење налаза салмонела на труповима бројлера на линији клања

Биосигурносне мере представљају низ добро осмишљених препрека чији је циљ спречавање уноса салмонеле на фарму (Maslić-Strizak *et al.*, 2012). Циљ је био да се доследном применом биосигурносних мера, смањи или елиминише могућност инфекције јата бројлера салмонелама. Степен реализације планираних биосигурносних мера зависи од њихове доследне примене. Rancicota и сарадници (2012) су утврдили да су континуирани програми тренинга запосленог особља имали позитиван утицај на степен реализације мера, а да је примена видљиве камере на улазу у објект на фарми тренутно повећавала степен реализације мера, али се временом тај ефекат постепено губи, да би био

веома низак након шест месеци. Стога континуиране обуке запослених и инсистирање на високом степену реализације прописаних мера у биосигурносном програму доприносе смањењу налаза салмонела на фарми.

У нашим испитивањима смо утврдили да највећи број бројлера код којих је утврђено присуство салмонела у узорцима коже врата потиче са фарме 1. Стога смо на тој фарми у наредном циклусу това пилића посебну пажњу посветили примени биосигурносних мера. Након примене биосигурносних мера налаз салмонела на труповима бројлера је смањен са 55% на 10%, што показује да је доследна примена биосигурносних мера на фарми утицала на смањење налаза салмонела на труповима бројлера.

Упоређивање генетске сличности салмонела изолованих са трупова бројлера и у случају обољења људи

За објашњење епидемија салмонелозе људи важно је да се утврди извор инфекције. У ту сврху користе се серолошке и молекуларне методе. Резултати наших истраживања добијени серолошком типизацијом су показали да су испитивани изолати идентичног сероваријетета *S. Infantis* (6,7 : r : 1,5). Према мишљењу више аутора за одређивање сероваријетета *S. Enteritidis* најдискриминативнија је метода PFGE (Olsen *et al.*, 1994; Thong *et al.*, 1995; Boonmar *et al.*, 1997; Tassios *et al.*, 1997; Laconcha *et al.*, 1998). У испитивањима сличности изолата *S. Enteritidis* спроведеним у Немачкој и Тајвану, методом PFGE утврђена је висока генетска сличност од 94%. Изолати су потицали из већег броја животиња (Chieh Pang *et al.*, 2007).

Генотипизацијом салмонела изолованих у нашим испитивањима методом PFGE добијено је укупно 7 генотипова или генетских профила изолата салмонела. Изолати салмонела у оквиру истог генетског профила су показивали степен генетске сличности од 100%. Назив сваког генетског профила је формиран тако што се прво слово односи на врсту микроорганизма, следећа три слова на утврђени сероваријетет, затим се следећа два слова односе на употребљени ензим, уз четири броја који започињу са 0001. Профил SINFXB0001 је утврђен код 11 изолата од којих су 8 пореклом са коже врата бројлера (4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15), док су 3 пореклом из фецеса оболелих људи (18,19, 20). Профили SINFXB0002 (16, 17) и SINFXB0003 (2, 3) су утврђени код изолата пореклом са коже врата

бројлера, док је SINFXB0004 (21, 22) утврђен код изолата пореклом из фецеса оболелих људи. Профили SINFXB0005 (9), SINFXB0006 (14) и SINFXB0007 (1) су утврђени код по једног изолата. Коефицијент сличности између генетских профила је 92%. Изолати означени са бројевима 6 и 13 нису могли да буду типизовани.

Резултати наших испитивања су у сагласности са налазима Nógrády и сарадника (2012) који су, код 76 изолата *S. Infantis*, изолованих у периоду 2004-2009. године у Мађарској, из мяса и из фецеса бројлера, утврдили исти степен сличности генома. Разлика у односу на резултате из Мађарске је у броју генетских профила у које су подељени изолати, у нашем испитивању је утврђено седам генетских профила, док су у Мађарској сви изолати подељени у два профила. Испитивањем присуства *S. Infantis* на фармама у Мађарској, у периоду 2006-2007. година, утврђено је укупно 164 изолата, са сличношћу генетског материјала од $\geq 88,7\%$. Резултати у овом истраживању су показали, да се исти мултирезистентни клон *S. Infantis* проширио са фарме у клинику и одатле у малопродају, при чему се појавио и као узрочник обољења људи у региону, а да је притоме раније одређен као доминантни клон карактеристичан за бројлере и људе у целој земљи (Nógrády *et al.*, 2008). Слични резултати су добијени и у нашем истраживању, са том разликом што директна епидемиолошка веза између налаза салмонела на труповима бројлера и од оболелих људи, није успостављена. Упркос томе што нису нађени директни епидемиолошки докази да су оболели људи јели контаминирано месо бројлера, идентични профили PFGE генотипизације указују на ту могућност (Tenover *et al.*, 1995). Током 2005-2006. године у Италији је испитана генетска сличност изолата *S. Infantis* изолованих од оболелих људи, животиња, из воде и хране. Утврђена је генетска сличност $> 90\%$. *S. Infantis* може да представља убиквитарни патоген, који може да користи гене антибиотске резистенције из околине (други микроорганизми) и да представља резервоар гена резистенције за друге хумане ентеричне патогене микроорганизме (Dionisi *et al.*, 2011).

EFSA је 2007. године објавила да је у Мађарској преваленција *S. infantis* у јатима бројлера 68%. У ранијој студији Nógrády са сарадницима је утврдио (2007) присуство мултирезистентног клона, изолованог у периоду 2004-2005. година из фецеса оболелих људи, фецеса бројлера и мяса бројлера који су пореклом били из различитих делова земље. У испитивањима спроведеним у Бразилу у периоду 1984 – 2009. године Almeida и сарадници су утврдили патогени потенцијал *S. Infantis* пореклом од оболелих људи (25 узорака) и хране (10 узорака). Том приликом је код 34 изолата утврђен степен генетске сличности $\geq 93,7\%$, код 32 изолата је утврђен степен генетске сличности $\geq 80,6\%$.

Посматрањем доминантног профила SINFXB0001 запажа се да постоји различити антимикробни профил код изолата са 100% генетском сличности. Профил SINFXB0002 је утврђен код два изолата пореклом са кожа врата бројлера, при чему је један показивао резистенцију на ампицилин, цефотаксим/клавуланску киселину и налидиксичну киселину, док је други изолат био резистентан на ампицилин, налидиксичну киселину и тетрациклине. Профили SINFXB0003, SINFXB0005, SINFXB0006 и SINFXB0007 су показивали идентичну антимикробну резистенцију на ампицилин, цефотаксим/клавуланску киселину, налидиксичну киселину и тетрациклине, пореклом су са кожа врата бројлера. Профил SINFXB0004 је показивао идентичну антимикробну резистенцију као и доминантни профил SINFXB0001 на ампицилин, налидиксичну киселину и тетрациклине. Антимикробни профил испитиваних изолата салмонела више зависи од лека којим се третирају бројлери него од лека избора који се користи у терапији људи.

Према подацима из литературе последњих година се као узрок салмонелозе људи све чешће доказује *S. Infantis*. Scuderi и сарадници (2000) су утврдили да у Италији преко 70% инфекција људи изазивају сероваријетети *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* и *S. Infantis*.

Испитивање осетљивости изолованих салмонела са трупова бројлера према антимикробним лековима

Проблем повезан са салмонелама и салмонелозом људи и животиња постаје све сложенији за решавање, због повећане отпорности салмонела на различите факторе спољашње средине и развоја резистенције на антимикробне лекове. Распрострањеност употребе антибиотика у примарној производњи је довела до појаве резистентних сојева салмонеле, нарочито код сероваријетета *Typhimurium* и *Infantis* (Hamada *et al.*, 2003).

У нашем истраживању профил резистенције на антибиотике салмонела пореклом са трупова бројлера и изолованих у случајевима обољења људи се разликовао. Утврђена је резистенција на ампицилин и налидиксичну киселину (95,5%), тетрациклин (91%) и на цефотаксим (68,25%). Изолати салмонела су били осетљиви (интермедијарно и комплетно) на триметоприм/сулфаметоксазол, ципрофлоксацин и на гентамицин, који су уједно и лекови избора у терапији. Додатним поређењем антимикробних профила

утврђено је да су изолати пореклом од бројлера резистентни на ампицилин, цефотаксим/клавуланску киселину, налидиксичну киселину и тетрациклине, док су изолати пореклом од оболелих људи резистентни на ампицилин, налидиксичну киселину и тетрациклине. Резултате сличне нашим добили су Wang и сарадници (2013) који су утврдили резистенцију на ампицилин код 78,3% изолата салмонела пореклом са трупова бројлера и радних површина у кланици. За разлику од резултата добијених у нашем испитивању, Nógrády и сарадници (2008) су испитивањем осетљивости *S. infantis*, изоловане на фармама живине, поред резистенције на антимикробне лекове утврдили и резистенцију на стрептомицин и сулфонамиде.

Подаци из литературе показују да је сероваријетет *S. Infantis* резистентан на већи број антимикробних лекова него што је добијено у нашем испитивању. Испитивањем осетљивости 70 изолата *S. Infantis* из хуманог и анималног материјала, Dionisi и сарадници (2011) су у Италији у периоду од 2005 до 2006. године, утврдили резистенцију на ампицилин, хлорамфеникол, стрептомицин, сулфонамиде, тетрациклин, канамицин и триметоприм/сулфаметоксазол. Испитивањем резистенције на фармама у Мађарској током 2006-2007. године, утврђена је резистенција *S. Infantis* на налидиксичну киселину, стрептомицин, сулфонамиде и тетрациклине (Nógrády *et al.*, 2008). Испитивањем антибиотске резистенције 106 сероваријетета *S. Infantis*, у Пољској у периоду 2008-2012. године, утврђена је резистенција на налидиксичну киселину (52,8%), тетрациклин (32,1%), ампицилин (28,3%), стрептомицин (28,35%) и сулфонамиде (26,4%), док су сви испитивани изолати били осетљиви на цефотаксим и ципрофлоксацин. Од изолата *S. Infantis*, 73,3% је резистентно на налидиксичну киселину, 66,7% на сулфонамиде, 60% на стрептомицин и тетрациклине (Łukasz *et al.*, 2013).

У истраживању спроведеном у Тајланду, 209 узорак меса бројлера је испитано на присуство *Salmonella* spp. Том приликом је утврђено присуство салмонеле у 5,26% узорак. Испитивањем антибиотске резистенције изолат утврђена је резистенција на тетрациклин 73%, налидиксичну киселину 54%, гентамицин 36%, ципрофлоксацин 27%, ампицилин 27% и триметоприм/сулфаметоксазол 27% (Akbar, Kumar Anal, 2013).

У нашим истраживањима сви изолати *S. Infantis* су били осетљиви на ципрофлоксацин. Резултате сличне нашим добили су Singh и сарадници (2012) који су у Индији утврдили да су сви испитивани изолати салмонела били осетљиви на ципрофлоксацин. Насупрот резултатима добијеним у нашим испитивањима Wang и сарадници (2013) су у Кини

утврдили резистенцију на цiproфлoксaцин код 13 % изолaтa, a Chia и сaрaдници (2009) су у Мaлeзији, утврдили резистенцију на цiproфлoксaцин код 3% изолaтa салмонeлa из мaлoпрoдaјe. У нaшим испитивaњимa осeтљивoсти *S. Infantis* утврђeнo јe дa су сви изолaти били осeтљиви нa тримeтoприм/сулфaмeтoксaзoл, a дa јe 95,5% изолaтa билo резистeнтнo нa aмпикцилин, штo сe рaзликујe од рeзултaтa Shahada и сaрaдникa (2006) који су у Јaпaну, испитујући осeтљивoст сoјeвa *S. Infantis*, изoлoвaних из брoјлeрa у Кaгoшими, утврдили резистeнцију нa сулфaмeтoксaзoл код 95,6% изолaтa и 0,7% нa aмпикцилин.

Другa истраживaњa у нaшoј зeмљи су указaлa дa сe салмонeлa лaкo прeнoси крoз јaтa и дa сe тeшкo eлиминирa нa фaрми и из инкубaтoрa. При тoмe су изoлoвaнe салмонeлe из брoјлeрa и нa фaрми углaвнoм осeтљивe нa вeћину испитивaних антибиoтикa. Вишeструкa резистeнцијa сe јaвљaлa вeмa рeткo, дoк јe 20% узoрaкa билo резистeнтнo нa хинoлoнe. Резистeнцијa нa флуoрoхинoлoнe нијe oткривeнa. Мeђутим, салмонeлe су вeмa резистeнтнe нa нaлидиксичну кисeлину и пoкaзaлe су смaњeну осeтљивoст нa цiproфлoксaцин. Слични извeштaји су дoбијeни и приликoм испитивaњa салмонeлa изoлoвaних из фецeсa људи (Velhner *et al.*, 2013).

У Турскoј јe испитивaњeм осeтљивoсти нa aнтимикрoбнe лeкoвe салмонeлa изoлoвaних сa свeжe oхлaђeних упaкoвaних трупoвa брoјлeрa, утврђeнa резистeнцијa нa aмпикцилин (85,2%), тeтрaциклин (67,6%), гeнтaмицин (14,7%) и цeфoтaксим (2,9%) (Yildirim, 2011). У другoм испитивaњу спрoвeдeнoм у Турскoј, рeгијa Анкaрe, тoкoм 2005-2006. гoдинe изoлoвaнo јe 100 изолaтa салмонeлa, од чeгa јe нaјчeшћи нaлaз сeрoвaријeтeтa *S. Infantis* (13%). Сви изолaти су били резистeнтни нa тeтрaциклин, нaлидиксичну кисeлину и тримeтoприм/сулфaмeтoксaзoл, дoк јe нa цiproфлoксaцин утврђeнa смaњeнa осeтљивoст (Avsaroglu, 2011). У другoм сeдмoмeсeчнoм испитивaњу осeтљивoсти *S. Infantis* нa aнтимикрoбнe лeкoвe у Турскoј, утврђeнa јe резистeнцијa нa тeтрaциклин, сулфoнaмидe, тримeтoприм-сулфaмeтoксaзoл и нaлидиксичну кисeлину (Cetinkaya *et al.*, 2008).

У истраживaњу спрoвeдeнoм у Вијeтнaму 2007-2009. гoдинe, испитивaњeм стeпeнa антибиoтскe резистeнцијe изолaтa салмонeлa пoрeклoм сa трупoвa брoјлeрa, утврђeнa јe резистeнцијa нa бaрeм јeдaн антибиoтик код 78,4% узoрaкa. Нaјвeћи стeпeн антибиoтскe резистeнцијe изолaти су пoкaзaли нa тeтрaциклин (58,5%), сулфoнaмидe (58,1%),

ампицилин (39,8%), триметоприм (34%) и налидиксичну киселину (27,8%) (Ha Thai *et al.*, 2012).

Током 2005. године, забележен је пораст антимикуробне резистенције међу изолатима *S. Infantis*. 5,4-6,5% изолата је било мултирезистентно (ампицилин, хлормафеникол, канамицин, триметоприм/сулфаметоксазол) (Dionisi *et al.*, 2011).

Иако је степен резистенције салмонела на антибиотике из групе хинолона низак, ипак су забележени случајеви појављивања обољења људи проузрокованих хинолон-резистентним салмонелама у САД (CDC, 2010).

Напори који су до сада чињени да се салмонеле употпуности елиминишу из ланца хране нису дали успех. Примењене мере су довеле само до редукције налаза салмонела, па успостављање критеријума „нулте толеранције” односно потпуног одсуства салмонела на труповима бројлера је практично немогуће. У више студија о процени ризика од налаза салмонела на труповима бројлера се наводи да и поред свих примењених мера у ланцу производње меса живине салмонеле су и даље присутне на труповима бројлера. Стога приступ процене ризика од налаза салмонела у производњи и доследна примена мера у управљању ризиком су основ за постизање најнижег реално достижног нивоа ризика који храна животињског порекла, када су салмонеле у питању, представља за људе.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата испитивања изведени су следећи закључци:

1. На линији клања бројлера, након хлађења, у кланици 2 утврђено је присуство салмонела на кожама врата бројлера у 17 узорака од укупно испитаних 50 узорака, при чему је 11 узорака потицало са исте фарме. У узорцима пореклом из кланица 1 и 3 није утврђено присуство салмонела. Током 2008-2011. године, на линији клања, налаз *Salmonella* spp. на труповима заклане живине се кретао од $5,46 \pm 0,95$ до $6,04 \pm 0,87$ позитивних узорака. У 2011. години услови хигијене процеса производње су побољшани и просечан налаз *Salmonella* spp. на труповима заклане живине се смањио на $2,27 \pm 1,19$ позитивних узорака.
2. Присуство салмонеле није утврђено у узорцима брисева узетих у објекту (појилице, хранилице, зидови и подови) током това бројлера, као ни у узорцима хране и воде за пиће. Присуство салмонеле је утврђено у узорцима шкартираних трупова, затим у назувкама, простирци и инсектима (муве), током това бројлера. Код једнодневних пилића, непосредно пред насељавање објекта на фарми, није утврђено присуство салмонеле.
3. Стриктним спровођењем биосигурносних мера, наведених у биосигурносном програму фарме, са које је потицао највећи број узорака у којима је утврђено присуство салмонела, постигнуто је смањење присуства салмонела на труповима бројлера са 55% на 10%.
4. Типизацијом салмонела изолованих из узорака коже врата бројлера и у случајевима обољења људи утврђено је присуство идентичног сероваријетета *S. Infantis* (6,7 : r : 1,5).
5. Испитивањем изолата салмонела добијено је укупно 7 генотипова или генетских профила изолата салмонела. Међусобна генетска сличност између генетских профила је износила $\geq 92\%$. Изолати салмонела у оквиру истог генетског профила су показивали степен генетске сличности од 100%.
6. Профил резистенције на антибиотике салмонела пореклом са трупова бројлера и изолованих у случајевима обољења људи се разликовао. Утврђена је резистенција на ампицилин и налидиксичну киселину (95,5%), тетрациклин (91%) и на цефотаксим (68,25%).

7. Сви изолати *S. Infantis* били су осетљиви на триметоприм/сулфаметоксазол, 86,4% изолата је било осетљиво на ципрофлоксацин и 81,8% изолата је било осетљиво на гентамицин

ЖИТЕПАТҮПА

1. Akbar A., Kumar Anal A., 2013. Prevalence and antibiogram study of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in poultry meat, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Vol. 3, No. 2, 163-168
2. Álvarez-Fernández E., Alonso-Calleja C., García-Fernández C., Capita R., 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. International Journal of Food Microbiology 153 (2012) 281–287
3. Allen V.M., Tinker D.B., Hinton M.H., Wathes C.M., 2003. Dispersal of microorganisms in commercial defeathering systems. Broiler Poultry Science Vol. 44, No 1, 53-59
4. Almeida J.G., Vieira S.L., reis R.N., Berres J., Barros R., Ferreira A.K., Furtado F.V.F., 2008. Hatching distribution and embryo mortality of eggs laid by broiler breeders of different ages. Revista Brasileira de Ciencia Avicola, Vol.10, No 2, 89 – 96
5. Almeida F., Pitondo S.A., Aparecida O.M., Pfrimer F.J., 2013. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. Infection, Genetics and Evolution, 19:145–151
6. Antunes P., Reu C., Carlos Sousa J., Peixe L., Pestana N., 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. International Journal of Food Microbiology, Vol. 82, No 2, 97 – 103
7. ANZFA, 1999. Food safety standards costs and benefits, Commonwealth of Australia, Canberra
8. Arslan S. , Eyi A., 2010. Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products, Journal of Food Protection, Vol. 73, No 9, 1613-1617
9. Avsaroglu D., Junker E., Helmuth R., Schroeter A., Akcelik M., Bozoglu F., Noeckler K., Guerra B., 2011. Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in Turkish *Salmonella* infantis isolates from chicken and minced meat

10. Bailey J.S., Stern N.J., Fedorka Clay P., Craven S.E., Cox N.A., Cosby D.E., Ladley S., Musgrove M.T., 2001. Sources of movement of *Salmonella* through integrated poultry operations: a multistate epidemiological investigation. *Journal of Food Protection* 64(11): 1690-1697
11. Barrell R.A., 1982. Isolations of *Salmonellas* from human, food and environmental sources in the Manchester area 1976-1980. *Journal of Hygiene London*, Vol. 88, 403-409
12. Barrow P.A., Freitas Neto O.C., 2011. Pullorum disease and fowl typhoid new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathology* Vol. 40, 1-13
13. Bergoug H., Burel C., Guinebretiere M., Tong Q., Roulston N., Romanini C.E.B., Exadaktylos V., McGonnel I.M., Demmers T.G.M., Verhelst R., Bahr C., Beckermans D., Eterradossi N., 2013. Effect of pre-incubation and incubation conditions on hatchability, hatch time and hatch window, and effect of post-hatch handling on chick quality at placement. *World's Poultry Science Journal*, Vol 69, No 2, 313 - 334
14. Berrang M.E., Meinersmann R.J., Buhr R.J., Philips R.W., Harrison M.A., 2003. Presence of *Campylobacter* in the respiratory tract of broiler carcasses before and after commercial scalding, *Poultry Science* 82: 1995 – 1999
15. BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) 2005. Pilotstudie zum Vorkommen von *Salmonella* spp. bei Herden von Legehennen in Deutschland. <http://www.bfr.bund.de/cm/208/pilotstudie_zum_vorkommen_von_salmonella_spp_bei_herden_von_legehennen_in_deutschland.pdf>
16. BfR 2006. Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von Salmonellen in Broilerbetrieben. http://www.bfr.bund.de/cm/208/grundlagenstudie_zur_erhebung_der_praevalenz_von_salmonellen_in_gallus_gallus_broilerbetrieben.pdf
17. Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornrunangwong, S., Terajima, J., Watanabe, H., Kaneko, K., Ogawa, M., 1997. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from humans and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 4, 971 – 974

18. Bosilj K., Bosanac D., 2013. Maksimalna ventilacija, *Živinarstvo*, vol. XLVIII, No 1/2, 39 - 46
19. Botey-Saló Pilar, Anyogu Amara, Varnam H. Alan, Sutherland P. Jane, 2012. Survival of inoculated *Salmonella* on the shell of hens' eggs and its potential significance, *Food Control*, Vol. 28, 2, 463–469
20. Bouquin S., Allain V., Rouxel S., Petetin I., Picherot M., Michel V., Chemaly M., 2010. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period, *Preventive Veterinary Medicine*, Vol. 97, 3-4, 245 – 251
21. Brunet P.Y., 1989. Biosecurity for poultry: lock, diseases out. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, 9 pp.
22. Bryan, F.L. (1980) Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. *Journal of Food Protection* Vol. 43, 140-150
23. Byrd J.A., Hargis B.M., Caldwell D.J., Bailey R.H., Herron K.L., McReynolds J.L., Brewer R.L., Anderson R.C., Bischoff K.M., Calaway T.R., Kubena L.F., 2001. Effect of lactid acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. *Poultry science* 80:278-283
24. Byrd J.A., Hargis B.M., Corrier D.E., Brewer R.L., Caldwell D.J., Bailey R.H., McReynolds J.L., Herron K.L., Stanker L.H., 2002. Fluorescent marker for the detection of crop and upper gastrointestinal leakage in poultry processing plants. *Poultry Science* 81:70-74
25. Byrd J.A., Anderson R.C., Callaway T.R., Moore R.W., Knape K.D., Kubena L.F., Ziprin L.F., Nisbet D.J., 2003. Effect of experimental chlorine product administration in the drinking water on *Salmonella typhimurium* contamination of broilers, *Poultry Science* 82:1403-1406
26. Buhr R.J., Cason J.A., Dickens J.A., Marshall D.E. 2000. Extraction load and intact crop removal in modified manual evisceration of male broilers. *Journal of Applied Poultry Research* 9:371-374
27. Bulatović Vesna, Todorović Miroslava, 1996. Radiosenzitivnost patogenih *Salmonella* spp. u živinskom mesu, *Tehnologija mesa* god. 37, br. 1, 13-15

28. Bunčić O., Katić V., 2011. Food safety and microbiological criteria. Tehnologija mesa Vol. 52, No 1, 47 - 52
29. Bunčić S., Sofos J. 2012. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. Food Research International, Volume 45, Issue 2, 641–655
30. Burch D.G.S., 2002. Antimicrobial sensitivity data for the mayor poultry bacterial pathogens, www.octagon-services.co.uk
31. Buxton, A. and Gordon, R.F. (1946) The epidemiology and control of *Salmonella* Thompson infection of fowls. Poultry Science Vol. 25, 265 - 281
32. Capita R., Alonso Calleja A., Prieto M., 2007. Prevalence of *Salmonella* Enterica serovars and genovars in slaughterhouses in Spain. Journal of Applied Microbiology, Vol. 103, No 5, 1366 – 1375
33. CDC, 2010. The Centers for Disease Control and Prevention. (2010). National Antimicrobial Resistance Monitoring System for enteric bacteria (NARMS): Human isolates final report, 2008. Atlanta, GA: The Centers for Disease Control and Prevention.
34. Cetinkaya F., Cibik R., Soyutemiz G.E., Ozakin C., Kayali R., Levent B., 2008. *Shigella* and *Salmonella* contamination in various foodstuffs in Turkey, Food Control, Vol. 19, No 11, 1059–1063
35. Chia T. W. R., Goulter R. M., McMeekin T., Dykes G. A., Fegan N. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. Food Microbiology, 26, 853-859.
36. Chieh Pang J., Tsai Hsin C., Helmuth R., Schroeter A., Guerra B., Hau Yang T., 2007. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of *Salmonella* *Enterica* var. *Enteritidis*. International Journal of Food Microbiology, Vol. 116, 305–312
37. COMMISSION REGULATION (EC) No 2160/2003 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 November 2003 on the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents

38. COMMISSION REGULATION (EC) No 852/2004 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs
39. COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs
40. COMMISSION REGULATION (EC) No 1091/2005 of 12 July 2005 implementing Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council as regards requirements for the use of specific control methods in the framework of the national programmes for the control of salmonella
41. COMMISSION REGULATION (EC) No 646/2007 of 12 June 2007 implementing Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council as regards a Community target for the reduction of the prevalence of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in broilers and repealing Regulation (EC) No 1091/2005
42. COMMISSION REGULATION (EC) No 584/2008 of 20 June 2008 implementing Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council as regards a Community target for the reduction of the prevalence of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in turkeys
43. COMMISSION REGULATION (EU) No 1086/2011 of october 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 2160/2006 of the European Parliament and the Council Annex I to Comission Regulation (EC) No 2073/2005 as regards salmonella in fresh poultry meat
44. Compliance Guideline for Controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry, 2010, third edition, FSIS, 1 – 52
45. Corry J.E.L., Allen V.M., Hudson W.R., Breslin M.F., Davies R.H., 2002. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *Journal for Applied Microbiology* Vol. 92, No 3, 424 – 432
46. Corry J.E.L., James J.S., Purnell G., Barbedo-Pinto S.C., Chochois Y., Howell M., James C., 2007. Surface pasteurization of chicken carcasses using hot water, *Journal of Food Engineering*, Vol. 79, No 3, 913–919

47. Cox N.A., Bailey J.S., Berrang M.E., 1996. Alternative routes for *Salmonella* intestinal tract colonization of chickens. *Journal of Applied Poultry Research* Vol. 5, No 3, 282-288
48. Council of the European Union, 2005. Council Regulation (EC) No 1/2005 of 22 december 2004 on the protection of animals during transport and related operations and amending directives 64/432/EEC and 93/119/EC regulation (EC) No 1255/97. *Official Journal of The European Union*. Brussels, Belgium L3/1-44
49. Cui S., Ge B., Zheng J., Meng J., 2005. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* Serovars in Organic Chickens from Maryland Retail Stores, *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 7, 4108-4111
50. Curtis Patricia, Butler Jessica, 2009, Controlling *Salmonella* in poultry plants, Workshop presentation for the FSIS „How to”, Auburn University
51. Dallal M. M. S., Doyle M. P., Rezadehbashi M., Dabiri H., Sanaei M., Modarresi S., 2010. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control*, 21, 388-392
52. Dionisi A.M., Lucarelli C., Benedetti I., Owczarek S., Luzzi I., 2011. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Infantis from humans, animals and the environment in Italy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 38, No 5, 384–389
53. De Boer E., Hahne M., 1990. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp from raw chicken products during food preparation. *Journal of Food Protection* 53, 1067–1068
54. Dominguez C., Gomez I., Zumalacarregui J., 2002. Prevalence of salmonella and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 72, No 1-2, 165 – 168
55. Dosković V., Bogosavljević – Bošković S., Pavlovski Z., Milošević B., Škrbić Z., Rakonjac S., Petričević V., 2013. Enzymes in broiler diets with special reference to protease. *World's Poultry Science Journal*, Vol. 69, No 1, 343 - 360

56. Duffy L. Lesley, Dykes A. Gary, Fegan Narelle, 2012, A review of the ecology, colonization and genetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Sofia, a prolific but avirulent poultry serovar in Australia, Food Research International, Vol. 45, No 2, 770–779
57. Dunkley D.K., Callaway R. T., Chalova I.V., McReynolds L.J., Hume E.M., Dunkley C.S., Kubena F.L., Nisbet J.D., Ricke C.S., 2009. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract, Anaerobe, Vol. 15, No 1–2, 26–35
58. D'Aoust Y., 1989. *Salmonella*. In: Doyle MP, editpr. Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekka, 327-445
59. EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commision related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. The EFSA Journal 114, 1-74
60. EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. The EFSA Journal (2005) 297, 1-27
61. EFSA 2007a. Report of the Task Force on Zoonoses. Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flock. The EFSA Journal. 97:1-85
62. EFSA 2007b. Report of the Task Force on Zoonoses. Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in broiler flocks Part A. The EFSA Journal. 98:1-85.
63. EFSA 2007c. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. The EFSA Journal. 130:1-353
64. EFSA, 2008a. The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. The EFSA Journal, 1658, 1-261

65. EFSA, 2008b. A quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat, Source attribution for human salmonellosis from meat, The EFSA Journal 625, 1-32
66. EFSA, 2009., EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food, EFSA Journal 2011: 9 (7): 2154
67. EFSA, 2010, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010 , The EFSA Journal 2597, 442
68. EFSA, 2012a, Scientific report of EFSA and ECDC „The European Union Summary Report on Trends and sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010, EFSA journal 2012; 10 (3):2579
69. EFSA, 2013, Scientific report of EFSA and ECDC „ The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011, EFSA journal 2013; 11(4):3129
70. Erdem B., Ercis S., Hascelik G., Gur D., Aysev A.D., 2005. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* group C strains isolated from humans in Turkey, 2000–2002, International Journal of Antimicrobial Agents, Volume 26, Issue 1, July 2005, Pages 33–37
71. Esaki H., Morioka A., Ishihara K., Kojima A., Shiroki S., Tamura Y., Takahashi T., 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): Report from Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 53. No 2, 266 - 270
72. Esmail H. S., 2013. Factors affecting feed intake of chickens. World Poultry, Vol. 29, No 1, 15 - 17
73. EU directive 2003/99/EC of The European Parliament and of The Council, 2003. On the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC
74. Fonseca da G.A.B., Brooks M.T., Mittermeier R.A., Gerlach J., Hoffmann M., Lamoreux J.F., Pilgrim J.D., 2006. Global Biodiversity Conservation Priorities. Science Vol 313, No 5783, 58 – 61
75. Fearnley E., Raupach J., Lagala F., Cameron S., 2008. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008, International Journal of Food Microbiology, Vol. 146, 219–227

76. FSIS, 1998. Pathogen reduction and HACCP systems and beyond. The new regulatory approach for meat and poultry safety. Backgrounders. USDA. Available: <http://www.fsis.usda.gov/oa/background/bkbeyond.htm>
77. Galanis E., Wong L.F., Patrick D.M., Binsztein M.E., Cieslik N., Chalermchikit A., Aidara-Kane T., Ellis A., Angulo A., Wegener F.J., 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerging Infectious Diseases journal* 12, 381–388
78. Gifford D.H., Shane S.M., Hugh-Jones M., Weigler B.J., 1987. Evaluation of biosecurity in broiler breeders. *Avian Diseases* 31, 2, 339–344.
79. Gorman, R., Adley, C.C., 2004. Characterization of *Salmonella* enteric serotype Typhimurium isolates from human, food, and animal sources in the Republic of Ireland. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 42, No 5, 2314–2316
80. Grubić Mirjana, 2009. Priručnik za rad u klanici živine – Faze tehnološkog procesa proizvodnje živinskog mesa, prvo izdanje, Zrenjanin, 42
81. Guerra B., Junker E., Miko A., Helmuth R., Mendoza M.C., 2004. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug resistant integron-carrying *Salmonella enterica* serotype typhimurium strains. *Microbial Drug resistance*, Vol. 10, No 1, 83-91
82. Guerrant R.L., Van Gilder T., Steiner T.S., Thielman N.M., Slutsker L., Tauxe R.V., Hennessy T., Griffin P.M., DuPont H., Sack R.B., Tarr P., Neill M., Nachamkin I., Reller L.B., Osterholm M.T., Bennish M.L., Pickering L.K. 2001. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, Vol.32 No 3, 331 – 351
83. Gumulka M., Kapkowska E., 2005. Age effect on broiler breeders on fertility and sperm penetration of the perivitelline layer of the ovum. *Animal Reproduction Science*, Vol. 90, No 1-2, 135 – 148
84. Gutierrez M., Fanning J., Murphy A., Murray G., Griffin M., Flack A., Leonard N., Egan J., 2009. *Salmonella* in broiler flocks in the Republic of Ireland. *Foodborne Pathogens and disease*, Vol. 6, 111-120

85. Ha Thai T., Hirai T., Thi Lan N., Yamaguchi R., 2012. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam, International Journal of Food Microbiology, Vol. 156, No 2, 147–151
86. Hamada K., Oshima K., Tsuji H., 2003. Drug resistance genes encoded in integrons and in extra-integrons: their distribution and lateral transfer among pathogenic enterobacteriaceae including enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Infantis. Japanese Journal of Infectious Diseases, Vol. 56, No 3, 123-126
87. Hasenson L., Gericke B., Liesegang A., Claus H., Poplawskaja J., Tscherkess N., Rabsch W., 1995. Epidemiological and microbiological studies on salmonellosis in Russia. Zentrablatt fur Hygiene Umweltmedizin, Vol. 198: 97-116
88. Hiatt K.L., Stern N.J., Fedorka Cray P., Cox N.A., Seal B.S., 2007. Molecular phylogeny of the *flaA* short variable region among *Campylobacter jejuni* isolated collected during an annual evaluation of poultry flocks in the southeastern United States. Foodborne pathogens and disease 4(3): 339 – 347
89. Howard R. Zoe, O'Bryan A. Corliss, Crandall G. Philip, Ricke C. Steven, 2012. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control, Food Research International, Vol. 45, No 2, 755–764
90. Hue O., Bouquin S., Lalande F., Allain V., Rouxel S., Petetin I., Quesne S., Laisney M.J., Gloaguen P.Y., Picherot M., Salvat G., Bougeard S., Chemaly M., 2011. Prevalence of *Salmonella* spp. on broiler chicken carcasses and risk factors at the slaughterhouse in France in 2008, Food Control Vol. 22, 1158-1164
91. Humphrey T.J., 1981. The effects of pH and levels of organic matter on the death rates of *Salmonella* in chicken scald tank water. Journal of Applied Bacteriology 51:27-39
92. Humphrey T.J., Lanning D.G., 1987. *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broiler chicken carcasses and scald tank water: the influence of water pH. Journal of Applied Bacteriology 63:21-25

93. Hur Ji, Chetan Jawale Chetan, John Hwa Lee John, 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review, Food Research International, Volume 45, Issue 2, Pages 819–830
94. Ishihara K., Takahashi T., Morioka A., Kojima A., Kijima M., Asai T. 2009. National surveillance of *Salmonella enterica* in food-producing animals in Japan. Acta Veterinaria Scandinavica Vol. 51, No 1, 35
95. James C., James J.S., Hannay N., Purnell G., Barbedo-Pinto C., Yaman H., Araujo M., Gonzales M.L., Calvo J., Howell M., Corry E.L.J., 2007. Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces, International Journal of Food Microbiology, Vol. 114, No 2, 195 - 203
96. James M. Jay. Loessner J. Martin, Golden A. David, 2005., Modern Food microbiology, 7th edition, Food Science Text series, 620
97. Jianghui Zhu, Yeru Wang, Xiaoyu Song, Shenghui Cui, Haibin Xu, Baowei Yang, Jinlin Huang, Guihua Liu, Qian Chen, Gang Zhou, Qiuxia Chen, Fengqin Li, 2014. Prevalence and quantification of *Salmonella* contamination in raw chicken carcasses at the retail in China, Food Control, Vol. 44, 198–202
98. Jorgensen, F., Bailey, J.S., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R.A., Bolton, F.J., Frost, J.A., Ward, J., Humphrey, T., 2002. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. International Journal of Food Microbiology 76, 151–164
99. Jorgensen H. James, Ferraro J. Mary, 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clinical Infectious Diseases 2009; 49:1749–55
100. Karabasil N., Dimitrijević M., Lakićević B., 2013. Important bacterial hazards in pork production. International 57th Meat Industry Conference, June 10 – 12, Belgrade, Serbia, 132 – 136

101. Karabasil N., Pavličević N., Galić N., Dimitrijević M., Lončina J., Ivanović J., Baltić Ž.M., 2012. Nalaz salmonela na trupovima svinjsa tokom klanja i obrade. Veterinarski glasnik Vol. 66, No 5 – 6, 377 – 386
102. Karović D., Đermanović V., Mitrović S., Radović V., Okanović D., Filipović S., Đekić V., 2013. The effect of mineral adsorbents in poultry production. World's Poultry Science Journal, Vol. 69, No 2, 335 - 342
103. Kessel A.S., Gillespie I.A., O'Brien S.J., Adak G.K., Humphrey T.J., Ward L.R., 2001. General outbreaks of infectious intestinal disease linked with the poultry, England and Wales, 1992 – 1999. Commun. Dis. Public Health 4:171 – 177
104. Kirk, M., 2004. Foodborne disease surveillance needs in Australia: harmonisation of molecular laboratory testing and sharing data from human, animal and food sources. New South Wales Public Health Bulletin 15, 13–17
105. Korver D.R., 2012. Implications of changing immune function through nutrition in poultry, Animal Feed Science and Technology, Vol.173,1-2, 54-64
106. Kumar Y., Sharma A., Sehgal R., Kumar S., 2009. Distribution trends of *Salmonella* serovars in India (2001–2005), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Vol. 103, No 4, 390–394
107. Kumar T., Mahajan N.K., Rakha N.K., 2010. Epidemiology of fowl typhoid in Haryana, India, World Poultry Science, Vol. 66, 503-510
108. Kumpula B.L., Fasenko G.M., 2005. Comparing incubation, duration, hatchability, and chick quality parameters of chicks from three eggs sizes and two modern strains. Poultry And Avian Biology Reviews, Vol. 16, No 1, 57 – 58
109. Laconcha, I., LoÂpez-Molina, N., Rementeria, A., Audicana, A., Perales, I., Garaizar, J., 1998. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. International Journal of Food Microbiology, Vol. 40, 27 – 34

110. Lakićević B., 2012. Primena klasičnih, molekularno bioloških i imunoenzimskih metoda u izolaciji, detekciji i karakterizaciji bakterija iz roda *Listeria*. Doktorska disertacija, Fakultet Veterinarske Medicine Beograd
111. Levantesi C., Bonadonna L., Briancesco R., Grohmann E., Toze S., Tandoi V., 2012. *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission, Food Research International, Vol. 45, No 2, 502-531
112. Lesley L.D., Gary A.D., Narelle F., 2012. A review of the ecology, colonization and genetic characterization of *Salmonella* Enterica var. Sofia, a prolific but avirulent poultry serovar in Australia, Food Research International, Vol. 45., No 2, 770 - 779
113. Liljebjelke K.A., Hofacre C.L., Liu T., White D.G., Ayers S., Young S., Maurer J.J., 2005. Vertical and horizontal transmission of *Salmonella* within integrated broiler production system, Foodborne Pathogens and Disease, Vol. 2, 90-102
114. Lim H.T., Kim S.M., Lee H.D., Lee N.Y., Park K.J., Youn N.H., Lee J. H., Yang Y.,S., Cho W.Y., Lee B.J., Park Y.S., Choi S.I., Song S.C., 2012. Use of bacteriophage for biological control of *Salmonella Enteritidis* infection in chicken, Research in Veterinary Science, Vol. 93, No 3, 1173-1178
115. Line J.E., Bailey J.S., Cox N.A., Stern N.J., Tompkins T., 1998. Effect of yeast supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. Poultry Science, Vol. 77, No 3, 405 - 410
116. Liebisch, B., Schwarz, S., 1996. Evaluation and comparison of molecular techniques for epidemiological typing of *Salmonella* Enterica subsp. Enterica serovar Dublin. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 3, 641 – 646
117. Lolin Miroslava, 1991. Zarazne bolesti životinja bakterijske etiologije, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, II izdanje, 1 – 120, 95
118. Longo F.A., Menten J.F.M., Pedroso A.A., Figueiredo A.N., Racanicci A.M.C., Sorbara J.O.B., 2007. Performance and carcass composition of broilers fed different carbohydrate and protein sources in prestarter phase. Journal of Applied Poultry Research, Vol. 16, No 2, 171 – 177

119. Łukasz M, Maćkiwa E, Ścieżyńska H, Pawłowska K, Popowska M. 2013. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from retail meat products in Poland between 2008 and 2012. *Food Control* 2013, 36: 199–204
120. Makela P., Boelaert F., Beloeil P.A., Rizzi V., Takkinen J., 2012. Monitoring of biological hazards in animals and food in the EU. *Biological Food Safety & Quality, Proceedings of the International Conference*, 4 – 5 october 2012, BFSQ Belgrade, Serbia, 6 – 8
121. Martelli F., Davies H. Robert, 2012. *Salmonella* serovars isolated from table eggs: An overview, *Food Research International*, Vol. 45, No 2, 745–754
122. Maslić-Strižak D., Spalević Lj., Resanović R., 2012. Biosigurnosne mere u industrijskom živilarstvu, *Živilarstvo*, Vol. 46, No 9/10, 2-15
123. Maslić-Strižak Danka, Spalević Lj., Rašeta M., Branković-Lazić I., 2012. Uticaj Gumboro bolesti na kvalitet pilećeg mesa. *Tehnologija mesa* Vol 53, No 1, 1-7
124. Matushek, M.G., Bonten, M.J.M., Hayden, M.K., 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 10, 2598 - 2600
125. McCrea B.A., Norton R.A., Masklin K.S., Hess J.B., Bilgili S.F., 2005. Recovery and genetic similarity of *Salmonella* from broiler house drag swabs versus surgical shoe covers. *Journal for Applied Poultry Research* Vol. 14, No 4, 694-699
126. Mead G.C., 2004. Current trends in the microbiological safety of poultry meat, *World's Poultry Science Journal* Vol. 60, No 1, 112-11
127. Mead G.C., Lammerding M.A., Cox N., Doyle P.M., Humbert F., Kulikovskiy A., Panin A., Pinheiro do Nascimento V., Wierup M. and the *Salmonella* on raw poultry writing Committee. 2010. Scientific and Technical Factors Affecting the Setting of *Salmonella* Criteria for Raw Poultry: A Global Perspective. *Journal of Food Protection*, Vol. 73, No 8, 1566 - 1590

128. Mead G.C., Hudson W.R., Hinton M.H., 1994. Use of a marker organism in poultry processing to identify sites of cross-contamination and evaluate possible control measures. *Poultry Science* Vol. 35, No 3, 345-354
129. Meldrum, R.J., Wilson, I.G., 2007. *Salmonella* and *Campylobacter* in United Kingdom retail raw chicken in 2005. *Journal of Food Protection* 70, 1937–1939
130. Meerburg B.G., Kijlstra A., 2007. Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*, *Journal of Food Science and Agriculture*, Vol. 70, 2466-2472
131. Merino L.A., Ronconi M.C., Navia M.M., Ruiz J., Sierra J.M., Cech N.B., 2003. Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Infantis by different typing methods. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine*, Vol. 45, 119 - 123
132. Miller T., Prager R., Rabsch W., Fehlhaber K., Voss M., 2010. Epidemiological relationship between *Salmonella* Infantis isolates of human and broiler origin. *Lohmann information*, Vol. 45, No 2, 27 - 31
133. Molla B., Mesfin A., 2003. A survey of *Salmonella* contamination in chicken carcass and giblets in central Ethiopia, *Revue de Medecine Veterinaire*, Vol. 154, No 4, 267–270
134. Murase, T., Okitsu, T., Suzuki, R., Morozumi, H., Matsushima, A., Nakamura, A., Yamai, S., 1995. Evaluation of DNA Fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbiological Immunology*, Vol. 39, 673 – 676
135. National Standard method, 2006. Detection of salmonella species W7, Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Centre for Infections, Issue No3, 1 – 16
136. Navarro, F., Llovet, T., Echeita, M.A., Coll, P., AladuenÄa, A., Usera, M.A., Prats, G., 1996. Molecular typing of *Salmonella Enterica* serovar Typhi. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 11, 2831 – 2834
137. Nógrády N., Kardos G., Bistyák A., Turcsányi I., Mészáros J., Galántai Z., Juhász A., Samu P., Kaszanyitzky J.E., Pászti J., Kiss I., 2008. Prevalence and characterization of *Salmonella infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken-human

- food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 127, No 1-2, 162-167
138. Nógrády N., Király M., Davies R., Nagy B., 2012. Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe, *International Journal of Food Microbiology* Vol. 157, 108–112
139. Nunes G.F., 2013. Tackling carcass contamination at the source. *World Poultry*, Vol. 29, No 2, 26 – 28
140. O'Brien S.J., De Valk H., 2003. *Salmonella* – ‘old’ organism, continued challenges. *Eurosurveillance* Vol. 8, No 1, 29-31
141. Olsen, J.E., Skov, M.N., Threlfall, E.J., Brown, D.J., 1994. Clonal lines of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis-, and RFLP typing. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 40, 15 – 22
142. Olsen, S.J., Bishop, R., Brenner, F.W., Roels, T.H., Bean, N., Tauxe, R.V., Slutsker, L., 2001. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987–1997. *The Journal of Infectious Diseases* 183, 753–761
143. Orji U.M., Onuigbo C.H., Mbata I.T., 2005. Isolation of *Salmonella* from poultry droppings and other environmental sources in Awka, Nigeria, *International Journal of Infectious Diseases* Vol. 9, 86-89
144. Orlić D., Kapetanov M., 2007. *Zarazne bolesti živine*, Naučni Institut za veterinarstvo, Novi Sad
145. Petričević M.S., 2007. Kontrola bakterijskih enteritisa pilića. *Živinarstvo*, Vol. XLII, br. 5, 19 – 24
146. Poppe C., 2000. *Salmonella* infections in the domestic fowl in Wray C., Wray A. (Eds.), *Salmonella* in domestic animals, CAB International, New York 2000, 107–132

147. Rajagopal Ramachandranpillai, Mini Mangattumuruppel, 2013. Outbreaks of salmonellosis in three different poultry farms in Kerala, India, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Vol. 3, No 6, 496-500
148. Racicot M., Venne D., Durivage A., Vaillancourt J.P., 2012. Evaluation of strategies to enhance biosecurity compliance on poultry farms in Quebec: Effect of audits and cameras. Preventive Veterinary Medicine, 103, 208 – 218
149. Report, 1996. Report on Poultry Meat, Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, HMSO, London
150. Resanović Radmila, Palić Todor, 2013. Vakcinacija i imunski odgovor živine protiv specijes nespecifičnih salmonella, Zbornik predavanja XXXIV seminara za inovacije znanja veterinarara, Fakultet Veterinarske medicine Beograd, 63 - 74
151. Resanović R., Rašić Z., Kureljušić B., Vučićević I., 2008. Salmoneloza u živinarstvu, Živinarstvo, Vol. 43, No 8/9, 2 – 24
152. Roover Rejirink I., 2013. Incubation affects chick quality. World Poultry, Vol. 29, No 3, 22 – 23
153. Pessoa-Silva, C. L., Toscano C.M., Moreira B.M. 2002. Infection due to extended-spectrum β -lactamase- producing Salmonella enterica subsp. enterica serotype Infantis in a neonatal unit, Journal of Pediatrics, Vol. 141, No 3, 381–387
154. Pravilnik o kvalitetu mesa pernate živine („Sl. List SFRJ", br. 1/81)
155. Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Sl. glasnik RS br. 72/10)
156. Pravilnik o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje infekcija živine određenim serotipovima salmonella („Sl. glasnik RS" broj 7/10)
157. Pravilnik o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje infekcija živine određenim serotipovima salmonella („Sl. Glasnik RS", br. 7/10)

158. Rosales-Reyes Roberto, Pérez-López Araceli, Sánchez-Gómez Concepción, Hernández-Mote Ruth Rosaura, Castro-Eguiluz Denisse, Ortiz Navarrete Vianney, Alpuche Aranda Mercedes Celia, 2012. *Salmonella* infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival, *Microbial Pathogenesis*, Vol. 52, No 6, 367–374
159. Rostagno H.M., Callaway R.T., 2012. Pre-harvest risk factors for *Salmonella enterica* in pork production. *Food Research International* Vol. 45., No 2, 634 - 640
160. Resanović R., Rašić Z., Kureljušić B., Vučićević I., 2008. Salmoneloza u živinarstvu *Živinarstvo*, Vol. 43, No 8/9, 2 – 24
161. Roberts, D. (1982) Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales, 1970-1979. *Journal of Hygiene* Vol. 89, 491-498
162. Rose N., Beaudreau F., Drouin P., Toux Y.J., Rose V., Colin P., 2000. Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses, *Preventive Veterinary Medicine* Vol. 44, No 1-2, 9-20
163. Rychlik Ivan, Barrow A. Paul, 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 29, No 5, 1021–1040
164. Russell M.S., Lyon P. S, 2006. Designer bedding for poultry, *Poultry international* Vol. 45, No 9, 42 – 47
165. Rusul G., Khair J., Radu S., Cheah C.T., Yasin R.M., 1996. Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 33, No 2-3, 183–194
166. Sauli I., Danuser J., Geeraerd A.H., Van Impe J.F., Rufenacht J., Bissig-Choisat B., Wenk C, Stark K.D.C., 2005. Estimating the probability and level of contamination with *Salmonella* of feed for finishing pigs produced in Switzerland – the impact of the production pathway, *International Journal of Food Microbiology*, Vol 100, No 1-3, 289 – 310

167. Sapkota R.A., Kinney L.E., Ashish G., Hulet M.R., Cruz-Cano R., Schwab J.K., Zhang G., Joseph W.S., 2014. Lower prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella* on large-scale U.S. conventional poultry farms that transitioned to organic practices, *Science of the Total Environment* 476–477, 387–392
168. Scuderi G, Fantasia M, Niglio T, 2000, Results of the three year surveillance by the Italian SALM-NET System: human isolates of *Salmonella* serotypes. *European Journal of Epidemiology*, 16, 377–383
169. Shahada F., Chuma T., Tobata T., Okamoto K., Sueyoshi M., Takase K., 2006. Molecular epidemiology of antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar *Infantis* from poultry in Kagoshima, Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 28, No. 4, 302–307
170. Shane S.M., 1993. Preventing erosive diseases in broiler parents. *Zootechnica International* 16, 5, 58–60.
171. Silliker, J.H. (1980) Status of *Salmonella*-Ten years later. *Journal of Food Protection* 43, 307-313
172. Singh S., Agarwal R. K., Tiwari S. C., Singh H., 2012. Antibiotic resistance pattern among the *Salmonella* isolated from human, animal and meat in India. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 665 - 674
173. Singh R., Yadava S.A., Tripathi V., Singh P.R., 2013. Antimicrobial resistance profile of *Salmonella* present in poultry and poultry environment in north India, *Food Control*, Vol. 33, No 2, 545–548
174. Slader J., Dominique G., Johrensens F., McAlpine K., Owen R.J., Bolton F.J., Humphrey T.J. 2002. Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens, *Applied Environmental microbiology* Vol. 68, No 2, 713-719

175. Spector P. Michael, Kenyon J. Wiliam, 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses, Food Research International, Vol.45, No 2, 455–481
176. Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J., Keersmaecker S. 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication, Food Research International, Volume 45, Issue 2, March 2012, Pages 502–531
177. Stjepanović A., Marković B., Vesković Moračanin S., 2007. Molekularno – biološke metode u mikrobiološkoj kontroli mesa i proizvoda od mesa. Tehnologija mesa Vol. 48, No 1-2, 123 - 130
178. Stošić Zorica, Karabasil N., Mitrić M., Teodorović V., Špegar V., 2007. Salmonela putevi kontaminacije i kontrola u lancu proizvodnje mesa brojlera, Živinarstvo, Vol. 42, No 1/2, 2 – 14
179. Sumner J., Raven G., Givney R., 2004. Have changes to meat and poultry food safety regulation in Australia affected the prevalence of Salmonella of of salmonellosis? International Journal of Food Microbiology, Vol. 92, No 2, 199 – 205
180. Sumner J., Mc Meekin T., Ross T., 2000a. States of poisoning in Australia. Medical Journal of Australia, Vol. 172, No 9, 462 – 463
181. Sumner J., Mc Keekin T., Ross T., 2000b. Food poisoning rates in Australia: an alternative view. Food Australia, Vol. 52, 274 - 276
182. Suzuki, Y., Ishihara, M., Matsumoto, M., Arakawa, S., Saito, M., Ishikawa, N., Yokochi, T., 1995. Molecular epidemiology of Salmonella enteritidis. An outbreak and sporadic cases studied by means of pulsed-Feld gel electrophoresis. Journal of Infectious Disease, Vol. 31, 211 – 217
183. Tabo D. Diguimbaye D.C., Granier A.C., Moury F., Brisabois A., Elgroud R., Milleman Y., 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* serotypes isolated from laying hens and broiler chicken farms in N'Djamena, Chad, Veterinary Microbiology, Vol. 166, No 1–2, 293–298

184. Taskila Sanna, Tuomola Mika, Ojamo Heikki, 2012, Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*, Food Control, Vol. 26, No 2, 369–377
185. Tassios, P.T., Markogiannakis, A., Vatopoulos, A.C., Katsanikou, E., Velonakis, E.N., Kourea-Kremastinou, J., Legakis, N.J., 1997. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella enteritidis* during a 7-year period in Greece. Journal of Clinical Microbiology Vol. 35, 1316 – 1321
186. Tauxe, R.V. (1991) *Salmonella* post-modern pathogen. Journal of Food Protection Vol. 54, 563-568.
187. Todd, E.C.D. (1989) Foodborne and waterborne Disease in Canada-1984 Annual Summary. Journal of Food Protection Vol. 52, 503-511
188. Tenover C.F., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced, by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. Journal of Clinical Microbiology, 2233:9
189. Thakur S., Brake J., Keelara S., You M., Susick E., 2013. Farm and environmental distribution of *Campylobacter* and *Salmonella* in broiler flocks, Research in Veterinary Science, Vol. 94, No 1, 33 – 42
190. Thong, K.L., Passey, M., Clegg, A., Combs, B.G., Yassin, R.M., Pang, T., 1996. Molecular analysis of isolates of *Salmonella typhi* obtained from patients with fatal and nonfatal typhoid fever. Journal of Clinical Microbiology Vol. 34, No 4, 1029 – 1033
191. Thong, K., Ngeow, Y., Altwegg, M., Navaratnam, P., Pang, T., 1995. Molecular analysis of *Salmonella Enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 33, 1070 – 1074
192. Thong, K. L., & Modarressi, S. 2011. Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods. Food Research International, 44, 2641 - 2646

193. Toma B., Vaillancourt J.P., Dufour B., Eloit M., Moutou F., Marsh W., B  net J.J., Sanaa M., Michel P., Kass P., Bigras-Poulin M., 1999. Dictionary of Veterinary Epidemiology. Wiley-Blackwell, pp 284
194. Tong Q., Mc Gonnell I.M., Romanini C.E.B., Exadaktylos V., Beckermans D., Bergoug H., Guinebretiere M., Eterradosi N.R., Garain N., Demmers T., 2011. Monitoring environmental conditions during incubation of chicken eggs. 15th International Congress on animal Hygiene, Vienna, Austria, 117 - 119
195. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA journal 2011; 9 (7):2154
196. Tsen, H.Y., Lin, J.S., Hu, H.H., Liu, P.R., Wang, T.K., 1999. Use of pulsed field gel electrophoresis as an epidemiological tool for analysis of sporadic associated strains of *Salmonella* Typhi isolated in Taiwan. Journal of Applied Microbiology Vol. 86, No 3, 761–768.
197. Tsen, H.Y., Lin, J.S., 2001. Analysis of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from food-poisoning cases in Taiwan by pulsed field gel electrophoresis, plasmid profile and phage typing. Journal of Applied Microbiology Vol. 91, No 1, 72–79
198. Uyttendaele M.R., Debevere J.M., Lips R.M., Neyts K.D., 1998. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. International Journal of Food microbiology, Vol. 40, No 1 – 2, 1 – 8
199. Yan S. Steve, Pendrak L. Micheael, Abela-Riddeer Bernadette, Punderson W. Julie, Fedorko P. Daniel, Foley L. Steven, 2004. An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives, Clinical and Applied Immunology Reviews, Vol. 4, No 3, 189–204
200. Yildirim Y., Gonulalan Z., Pamuk S., Ertas N., 2011. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses, Food Research International, Vol. 44, No 3, 725–728

201. Yegani M., 2006. Vaccine reaction in poultry: what do we know?. World Poultry, Vol. 22, No 3, 34 - 35
202. Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, prvo izdanje, jul 2011. godine
203. Van Pelt W., van der Zee H., Wannet W.J.B., van de Giessen A.W., Mevius D.J., Bolder N.M., Komjin R.E., van Dynhoven Y.T.H.P. 2003. Explosive increase of of *Salmonella* Java in poultry in Netherlands: consequences for public health. Eurosurveillance 2003; 8 (2): pii = 398. Available online :[http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx? ArticleId = 398](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=398)
204. van der Beek V., 2013. Feed will only get more important in the future. World Poultry. Vol. 29, No 3, 18 - 20
205. van de Giessen A.W., Bouwknegt M., Dam-Deisz W.D., van Pelt W., Wannet W.J., Visser G., 2006. Surveillance of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in poultry production flocks in The Netherlands. Epidemiology and Infection, Vol. 134, 1266-1275
206. van Nierop, W., Duse, A.G., Marais, E., Aithma, N., Thothobolo, N., Kassel, M., Stewart, R., Potgieter, A., Fernandes, B., Galpin, J.S., Bloomfield, S.F., 2005. Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. International Journal of Food Microbiology 99, 1–6
207. Velebit Branko, Lilić Slobodan, Borović Branka 2010. Ispitivanje rezistentnosti bakterija *Salmonella* spp. Izolovanih sa trupova goveda prema antimikrobnim supstancama, . Tehnologija mesa Vol. 51, No 2, 154 - 158
208. Velhner M., Stojanov I., Potkonjak Dubravka, Kapetanov M., Orlić D., Rašić Z., 2005. *Salmonella* Enteritidis isolation from broiler chickens infected with low doses. Acta Veterinaria, Vol. 55, No 2-3, 183 – 191
209. Velhner M., Potkonjak D., Stojanov I., Stojanović D., Petrović J., Kozoderović G. 2011. *Salmonella* control in poultry production and resistance monitoring in Serbia. Arhiv veterinarske medicine Beograd 2011, 4:2:11-22

210. Velhner M., Potkonjak D., Stojanović D., Mitevski D., Stojanov I., Petrović J., 2013. Resistance to antimicrobial drugs and control measures of *Salmonella* spp. in the poultry industry. Veterinarski Glasnik, Vol. 67, No 1-2, 87-95
211. Waldroup A.L., Rathgeber B.M., Forsythe R.H., Smoot L., 1992. Effects of six modifications on the incidence and levels of spoilage and pathogenic organism on commercially processed post-chill broilers. Journal of Applied Poultry Research 1:226 - 234
212. Wang H., Ye K., Wei X., Cao J., Xu X., Zhou G., 2013. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China, Food Control 33, 378 - 384
213. Wegener H.C., Hald T., Wong Lo Fo DMA, Madsen M., Korsgaard H., Bager F., Gerner Smidt, Molbak K., 2003, Salmonella control programs in Denmark, Emerging Infectious Diseases, 9, 774 – 780
214. Wegener C.H., Baggesen D.L., 1996. Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Infantis by use of pulsed field gel electrophoresis, International Journal of Food Microbiology 1996, Vol. 32, 125-131
215. Wiedmann M., 2002. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. Journal AOAC International, Vol. 85, 524 - 531
216. Wilson H.R., 1991. Interrelationships of egg size, chick size, posthatching growth and hatchability. World's Poultry Science Journal, Vol 47, No 1, 5 - 20
217. Wolanski N.J., Renema R.A., Robinson F.E., Carney V.L., Fancher B.I., 2007. Relationships among egg characteristics, chick measurements and early growth traits in ten broiler breeder strains. Poultry Science, Vol. 86, No 8, 1784 - 1792
218. WHO, 2002. Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens, Microbiological Risk Assessment Series 2, 1-301
219. Wray C., Davies H.R., Evans S.J., 1999. *Salmonella* infection in poultry: the product environment, pages 257 – 275 in Poultry Meat Science. R.I.Richardson and G.C.Mead, ed. CABI Publishing, Wallingford, Oxford, UK

220. Zakon o dobrobiti životinja („Sl. Glasnik RS”, br. 41/2009)
221. Zakon o bezbednosti hrane („Sl. Glasnik RS”, br. 41/2009)
222. Zhao S., McDermott P.F., Friedman S., Qiayumi S., Abbot J., Kiessling C., Ayers S., Singh R., Hubert S., Sofos J., White D.G., 2006. Characterization of Antimicrobial-Resistant Salmonella Isolated from Imported Foods, Journal of Food Protection, Vol. 69, 3, 500-507

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Младен П. Рашета је рођен 30.03.1979. године у Смедереву. Основну школу и Гимназију је завршио у Смедереву. Године 1998. уписао је Факултет ветеринарске медицине у Београду и дипломирао је 2005. године са просечном оценом 8,35. Уписао је последипломске студије на Факултету ветеринарске медицине у Београду, смер технологија намирница анималног порекла. Од 2007. године запослен је на Институту за хигијену и технологију меса у Београду, у Одељењу за научно-стручну сарадњу са индустријама меса.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Младен Раушета

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Учесћаност намага *Salmonella* spp. на илутровима
брујера и њихов значај за безбедност хране

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.06.2014.

Младен Раушета

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Младен Раушета

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Учешћемост напаса *Salmonella* spp. на мјуновима бројера и њихов
значај за безбедност хране

Ментор проф др Владо Шесдровић

Потписани Младен Раушета

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.06.2014.

Младен Раушета

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Учеснички налог Salmaella spp. на штрџовица брјера
и њихов значај за безбедност хране

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 24. 06. 2014.

Младен Вукотић