

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA MIKROBIOLOGIJU**

**ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI
FORMIRANJA BIOFILMA U USLOVIMA
IN VITRO KOD RAZLIČITIH
SEROVARIJETA *SALMONELLA*
VRSTA IZOLOVANIH IZ UZORAKA
HRANE ZA ŽIVOTINJE**

Doktorska disertacija

Bojana Z. Prunić
Diplomirani veterinar

Beograd, 2017.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY**

**ANALYSIS OF POSSIBLE BIOFILM
FORMATION FROM DIFFERENT
SALMONELLA SEROVARS ISOLATED
FROM ANIMAL FOOD IN *IN VITRO*
CONDITIONS**

Doctoral dissertation

Bojana Z. Prunić
Graduated veterinarian

Belgrade, 2017.

Mentor 1

dr Dušan Mišić, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

Mentor 2

dr Dubravka Milanov, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad.

Članovi Komisije

1. dr Sonja Radojičić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
2. dr Radmila Marković, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
3. dr Snežana Bulajić, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

Datum odbrane doktorske disertacije

ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI FORMIRANJA BIOFILMA U USLOVIMA *IN VITRO* KOD RAZLIČITIH SEROVARIJETETA *SALMONELLA* VRSTA IZOLOVANIH IZ UZORAKA HRANE ZA ŽIVOTINJE

Rezime

Cilj ovog istraživanja je bio ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma kod serovarijeteta *Salmonella* izolovanih iz hrane za životinje, poreklom iz 18 mešaona stočne hrane na području Južnobačkog okruga. Izolati korišćeni u ispitivanju (n=100) izolovani su poreklom iz uzoraka hrane za životinje uzorkovanih tokom dve godine ispitivanja (period 2012-2014). Identifikacija izolata izvršena je na osnovu kulturelnih, biohemijskih i seroloških karakteristika na osnovu preporuka standarda SRPS EN ISO 6579:2008. Potvrda i serološka tipizacija izolata *Salmonella* izvedena je u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigela*, *Vibrio cholerae* i *Yersinia enterocolitica*, Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u Beogradu. Kao kontrolni sojevi, u ispitivanju su korišćene referentne kulture *S. Typhimurium* ATCC 14028 i *S. Enteritidis* ATCC 13076.

Kao supstrat za formiranje biofilma korišćene su površine od polistirena i nerđajućeg čelika. Sposobnost formiranja biofilma ispitana je primenom sledećih metoda: Congo red agar test, pelikula test, test na mikrotitracionim pločama upotrebom kristal violet boje, i skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM). Sva ispitivanja izvedena su upotrebom dve hranljive podloge (tripton soja bujona i Luria Bertani bujona) pri temperaturi inkubacije od 20°C i 37°C.

Iz hrane za životinje izolovani su sledeći serovarijeteti *Salmonella*: Tennessee (18%), Agona (9%), Montevideo (15%), Enteritidis (12%), Stanleyville (6%), Infantis (12%), Typhimurium (3%), Typhimurium monofazni (1%), Mbandaka (6%), Senftenberg (7%), Jerusalem (2%), Thompson (1%), Amsterdam (1%), Colindale (1%), Dahra (1%), Livingstone (1%). Kod četiri izolata nije ustanovljen serovarijetet (*Salmonella enterica* subspecies *enterica* (1,3,19:i:-)).

Prema rezultatima Congo red agar testa, na temperaturi od 20°C, 98% izolata *Salmonella* ekspresioniralo je jednu ili obe komponente matriksa biofilma i formiralo kolonije RDAR, PDAR i BDAR morfotipova. Na temperaturi od 37°C ni jedan izolat

nije produkovao ključne komponente matriksa biofilma i na Congo red agaru su formirali kolonije SAW morfotipa.

Izolati *Salmonella* spp. su za ispitivanje u pelikula testu i testu na mikrotitracionim pločama kultivisani u dve hranljive pologe: Luria-Bertani bujonu (LB) i tripton soja bujonu (TSB). Inokulum je pripremljen od kultura *Salmonella* spp. starih 24h, a gustina pripremljenih inokuluma iznosila je $1-5 \times 10^8$ CFU/ml. Ispitivanja su izvedena na temperaturama od 20°C i 37°C tokom 6 dana (pelikula test) i 48h (test na mikrotitracionim pločama). Rezultati testa na mikrotitracionim pločama očitani su spektrofotometrijski upotrebom filtera talasne dužine od 595 nm (kvantitativna metoda ispitivanja produkcije biofilm). Najviše vrednosti optičke prozračnosti (OD) izmerene su kultivacijom izolata u LB bujonu na temperaturi od 20°C ($OD_{595} = 1.814 \pm 0,135$). Pod tim uslovima, 50 izolata je procenjeno za jake, 38 izolata umerene, a 12 za slabe biofilm producere. Porastom temperature inkubacije na 37°C, samo su izolati *Salmonella* serovarijeteta Enteritidis (n=12) formirali biofilm i procenjeni su jakim biofilm producerima. Viša temperatura inkubacije i veća koncentracija hranljivih sastojaka u podlozi uticali su nepovoljno na sposobnost formiranja biofilma kod svih ispitanih sojeva.

Sposobnost formiranja biofilma na površini nerđajućeg čelika, ispitano je kod odabranih izolata koji su procenjeni kao jaki biofilm produceri u testu na mikrotitracionim pločama i koji su na Congo red agaru formirali kolonije RDAR morfotipa. Ovaj deo ispitivanja izveden je primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Biofilmovi su formirani kultivacijom izolata u dve hranljive podloge (LB i TSB) na temperaturama od 20°C i 37°C tokom 48h. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom ustanovljene su varijacije u sposobnosti odabranih izolata da formiraju biofilm pod navedenim eksperimentalnim uslovima.

Statistički značajna korelacija ($p < 0,01$) ustanovljena je između rezultata dobijenih u pelikula testu i testu na mikrotitracionim pločama, kultivacijom izolata *Salmonella* u obe hranljive podloge (LB i TSB) i na obe temperature inkubacije (20°C i 37°C). Pozitivna korelacija je ustanovljena između rezultata Congo red agar testa, testa na mikrotitracionim pločama i pelikula testa, inkubacijom na temperaturi od 20°C u LB bujonu.

Izolati *Salmonella* serovarijeteta Tennessee (n=7/18), Montevideo (n=8/15) i Infantis (n=4/12) koji su tokom dve godine ponavljano izolovani iz hrane za životinje poreklom iz istih proizvodnih objekata, ispitani su na genetički diverzitet primenom elektroforeze u pulsirajućem polju (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE). Kod izolata serovarijeteta Montevideo i Infantis, potvrđena je pripadnost istom klonu, dok je kod izolata *S. Tennessee* ustanovljen manji genetički diverzitet (razlike među njima ne prelaze 10%).

U cilju procene značaja hrane za životinje kao izvora sojeva *Salmonella* sa rezistencijom ili multiplom rezistencijom na antibiotike, ispitana je njihova osetljivost na antibiotike primenom disk difuzione metode. Hrana za životinje nije procenjena kao izvor rezistentnih sojeva, jer je kod 99% izolata ustanovljena osetljivost na sve korišćene antibiotike.

Ključne reči: *Salmonella*, biofilm, Congo red agar, test na mikrotitracionim pločama, pelikula test, SEM, PFGE, antimikrobna rezistencija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

UDK broj: 619 : 579.62.842.IA2

ANALYSIS OF POSSIBLE BIOFILM FORMATION FROM DIFFERENT *SALMONELLA* SEROVARS ISOLATED FROM ANIMAL FOOD IN *IN VITRO* CONDITIONS

Summary

The aim of this research was the investigation into the biofilm-forming ability of *Salmonella* serovars isolated from animal feed samples originating from 18 feed-producing facilities located in South Bačka District. The isolates which were tested (n=100) were isolated from feed samples collected in a two-year period (from 2012 to 2014). The identification of the isolates was made based on the cultural, biochemical and serological characteristics, following the recommendations given in the SRPS EN ISO 6579:2008 standard. The conformation and serological typing of *Salmonella* isolates were done in the National Reference Laboratory for *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* and *Yersinia enterocolitica*, at the Institute of Public Health of Serbia 'Dr Milan Jovanović Batut' in Belgrade. In this study reference cultures of *S. Typhimurium* ATCC 14028 and *S. Enteritidis* ATCC 13076 were used as the control strains.

Surfaces made of polystyrene and of stainless steel were used as substrates for biofilm formation. The ability of *Salmonella* to form biofilm was tested with the following methods: Congo red agar test, pellicle test, microtiter plate assay with the use of crystal violet dye, and scanning electron microscopy (SEM). The whole investigation was carried out at two temperatures of incubation (20°C and 37°C).

The following *Salmonella* serovars were isolated from animal feed: Tennessee (18%), Agona (9%), Montevideo (15%), Enteritidis (12%), Stanleyville (6%), Infantis (12%), Typhimurium (3%), Typhimurium monofazni (1%), Mbandaka (6%), Senftenberg (7%), Jerusalem (2%), Thompson (1%), Amsterdam (1%), Colindale (1%), Dahra (1%), Livingstone (1%). In four isolates serovars were not determined (*Salmonella enterica* subspecies *enterica* (1,3,19:i:-)).

According to the results of Congo red agar test, when grown at 20°C, 98% of the isolates expressed one or both components of the *Salmonella* biofilm matrix and formed colonies of various morphotypes (RDAR, PDAR and BDAR). However, when

cultivated at 37°C none of the isolates produced the key components of biofilm matrix and formed SAW morphotype colonies on the Congo red agar.

For the investigation in the pellicle test and in the microtiter plate assay *Salmonella* isolates were grown in two media: Luria-Bertani broth (LB) and tryptic soy broth (TSB). Inoculums were prepared from 24-h-old cultures of *Salmonella* spp., and the density of the prepared inoculums was $1-5 \times 10^8$ CFU/ml. The isolates tested, which were prepared as described, were incubated at two different temperatures, 20°C and 37°C, for 6 days (pellicle test) and 48h (microtiter plate assay). The results of the test, that is, the values of optical density (OD) were read on a spectrophotometer, using the filter with a wavelength of 595 nm. The highest OD values were obtained with isolates incubated in LB broth at 20°C ($OD_{595}=1.814 \pm 0.135$), when 50 isolates were assessed as strong, 38 isolates as moderate and 12 as weak biofilm producers. At higher incubation temperature, at 37°C, only the isolates of *Salmonella* serovars Enteritidis (n=12) produced biofilm, and were assessed as strong biofilm producers. The increase in the incubation temperature, as well as the nutrient-rich medium had an unfavourable influence on the biofilm-forming ability of all strains which were tested.

Biofilm forming on a stainless steel surface was tested in certain isolates which had been assessed as strong biofilm producers in the microtiter plate assay and which formed colonies of RDAR morphotype on Congo red agar. For this segment of the research scanning electron microscopy (SEM) was used. The isolates were grown on both mediums (LB and TSB) and incubated at 20°C and 37°C for 48h. By means of scanning electron microscopy certain variations in the biofilm-forming ability of the selected isolates were detected in the experimental conditions which were used. According to the results which were obtained, there was a significant correlation ($p < 0.01$) between the results obtained in the pellicle test and microtiter plate assay performed with *Salmonella* isolates cultivated in both media (LB and TSB) and at both incubation temperatures (20°C and 37°C). In addition, a positive correlation was detected between the results of Congo red agar test, microtiter plate assay and pellicle test, obtained with isolates incubated at 20°C in LB broth.

Salmonella isolates of the serovars Tennessee (n=7/18), Montevideo (n=8/15), and Infantis (n=4/12) which were repeatedly isolated from animal feed originating from the same production facilities were tested for the genetic diversity using pulsed-field gel

electrophoresis (PFGE). It was confirmed that the isolates of the serotypes *S. Montevideo* and *S. Infantis* were of the same clone, whilst there was a slight genetic diversity in the *S. Tennessee* isolates (the differences between them do not exceed 10%).

To assess the importance of animal feed as source of *Salmonella* strains with resistance or multi-drug resistance to antibiotics, their susceptibility to antibiotics was tested in the disk diffusion assay. Given that 99% of isolates were susceptible to all tested antibiotics which were tested, animal feed was not assessed as a source of resistant strains.

Key words: *Salmonella*, biofilm, Congo red agar, microtiter plate test, pellicle test, SEM, PFGE, antimicrobial resistance

Scientific field: Veterinary Medicine

Field of academic expertise: Microbiology

UDK number: 619 : 579.62.842.IA2

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Istorijat, klasifikacija i taksonomija <i>Salmonella</i>	4
2.1.1. Osnovne karakteristike bakterija iz roda <i>Salmonella</i>	6
2.1.2. Mehanizmi patogenosti	8
2.1.3. Salmoneloze	9
2.1.4. Rasprostranjenost <i>Salmonella</i>	11
2.1.5. Epidemiološki podaci	12
2.2. Biofilm	15
2.2.1. Istorijat	15
2.2.2. Definicija biofilma	16
2.2.3. Faze formiranja biofilma	17
2.2.3.1. Vezivanje bakterija za površinu	18
2.2.3.2. Formiranje mikrokolonija	19
2.2.3.3. Sazrevanje (maturacija) biofilma.....	20
2.2.4. Disperzija ili osipanje zrelog biofilma	21
2.2.5. Quorum sensing	23
2.2.6. Ekstracelularna polimerna supstanca (EPS) ili matriks biofilma.....	25
2.2.7. Ključne komponente matriksa ili biofilma <i>Salmonella</i> spp. i njihova genetska regulacija.....	29
2.2.8. Fenotip <i>Salmonella</i> spp. u multicelularnim zajednicama	32
2.2.9. Otpornost bakterija u biofilmu na antimikrobne agense (antibiotike i dezinficijense)	37
2.2.10. Opstanak <i>Salmonella</i> spp. u fabrikama za proizvodnju hrane za životinje ..	42
2.2.10.1. Principi kontrole <i>Salmonella</i> spp. u procesu proizvodnje hrane za životinje.....	46
2.2.10.2. Primena mera za smanjenja i/ili eradikaciju <i>Salmonella</i> spp. u industriji proizvodnje hrane za životinje	49
2.2.10.3. Obezbeđenje kvaliteta hrane za životinje.....	50
3. CILJ I ZADACI STRAŽIVANJA	53
4. MATERIJAL I METODE	55
4.1. Uzorci hrane za životinje.....	55
4.2. Izolacija i identifikacija <i>Salmonella</i> spp. iz uzoraka hrane za životinje	56
4.2.1. Prethodno obogaćenje u neselektivnoj tečnoj podlozi.....	56

4.2.2. Obogaćenje u selektivnim tečnim podlogama	56
4.2.3. Izolacija <i>Salmonella</i> na selektivnim podlogama.....	56
4.2.3.1. Biohemijsko potvrđivanje izolata <i>Salmonella</i> spp.	57
4.2.4. Serološka tipizacija <i>Salmonella</i> spp.....	58
4.3. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma	59
4.3.1. Congo Red agar test	59
4.3.2. Pelikula test	61
4.3.3. Test na mikrotitracionim pločama upotrebom boje kristal-violet.....	62
4.3.3.1. Priprema suspenzija izolata <i>Salmonella</i> spp. za izvođenje testa na mikrotitracionim pločama	62
4.3.3.2. Izvođenje testa na mikrotitracionim pločama sa kristal violet bojom	63
4.3.4. Skening elektronska mikroskopija	66
4.4. Ispitivanje izolata na genetički diverzitet primenom – Pulsed - field gel electrophoresis (PFGE)	68
4.5. Ispitivanje osetljivosti <i>Salmonella</i> spp. na antibiotike u uslovima <i>in vitro</i>	69
4.6. Statistička obrada podataka	71
5. REZULTATI	73
5.1. Izolacija i identifikacija izolata <i>Salmonella</i>	73
5.2. Congo Red agar test.....	78
5.3. Pelikula test	84
5.4. Test na mikrotitracionim pločama upotrebom boje kristal-violet	92
5.5. Skening elektronska mikroskopija (SEM)	110
5.6. Pulsed-field gel elektroforeza (PFGE)	116
5.7. Ispitivanje osetljivosti <i>Salmonella</i> spp. na antibiotike u uslovima <i>in vitro</i>	122
6. DISKUSIJA	
6.1. Učestalost nalaza <i>Salmonella</i> serovarijeteta u hrani i komponentama hrane za životinje	123
6.2. Congo red agar test	125
6.3. Pelikula test	126
6.4. Test na mikrotitracionim pločama upotrebom boje kristal-violet	128
6.5. Skening elektronska mikroskopija (SEM)	131
6.6. Elektroforeza u pulsnom polju (PFGE)	132
6.7. Osetljivosti <i>Salmonella</i> spp. na antibiotike	136
7. ZAKLJUČCI	139
8. LITERATURA	141

Spisak skraćenica

„H“f1	Flagelarni antigen faze 1
„H“f2	Flagelarni antigen faze 2
„O“	Somatski antigen
adrA	eng. „ <i>agfD</i> -dependent regulator“
AI	eng. Autoinducer
ATCC	eng. „American Type Culture Collection“
ATR	eng. Acid Tolerance Response
aw	Aktivnost vode
BapA	eng. „biofilm-associated protein A“
BDAR	eng. „brown dry and rough“
bsc	eng. „bacterial cellulose synthase“
CAC	eng. Codex Alimentarius Commission
c-di-GMP	Ciklični di-guanozin mono fosfat
CFU	eng. „colony forming unit“
CLSI	eng. „Clinical and Laboratory Standards Institute“
CLSM	Konfokalna laserska skening mikroskopija
csg	eng. „curli subunit gene“
curli	tanke agregativne fimbrije-tafi
CV	Kristal violet test
ECM	Ekstracelularni matriks
EFSA	eng. „European Food Safety Authority“
EPS	Ekstracelularna polimerna supstanca
FAO	eng. „Food and Agriculture Organization“
Fim	fimbrije tipa 1
GHP	dobra higijenska praksa
GMP	dobra proizvođačka praksa
HACCP	engl. Hazard Analysis and Critical Control Points
LB	Luria-Bertani bujon
Lpf	eng. <i>long polar fimbriae</i> (duge polarne fimbrije)
McF	McFarland standard
MHB	Mueller-Hinton bujon
MKTT	Muller-Kauffmann tetracionat- novobiocin bujon
OD	eng. optical density
ONPG	Orto-nitrofenil - β -D-galaktopiranozid
PDAR	eng. „pink dry and rough“
Pef	plazmidski kodirane fimbrije
PFGE	eng. pulsed-field gel electrophoresis
PPV	puferovana peptonska voda
QS	eng. „quorum sensing“
RDAR	eng. „red, dry and rough“
rpoS	stress response regulator, RNA <i>polymerase</i> , <i>sigma S</i>
RVS	Rappaport-Vassiliadis bujon sa sojom
SAW	eng. „smooth and white“
SBAM	eng. „smooth brown and mucoid“
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija
SPI	eng. „Salmonella pathogenicity islands“

T3SS	eng. „the type III secretion system“ (sekretorni sistem tipa III)
TSA	Trypton soja agar
TSB	Trypton soja bujon
TSI	Trostruki kliglerov šećer
U	Urea agar
V.P	Voges-Proskauer
VBNC	eng. „viable but nonculturable state“
WHO	eng. World Health Organization
XLD	Ksilozna lizin dezoksiholatni agar

1. UVOD

U prirodi mikroorganizmi žive kao planktonske, slobodno suspendovane ćelije ili u obliku višćelijskih zajednica - biofilma. Biofilm, je višćelijski obrazac organizacije života kod bakterija i predstavlja relativno novootkriveni fenomen u mikrobiologiji. Biofilm je postao veliki izazov moderne nauke i medicine jer onemogućava efikasnost procesa dezinfekcije površina i predmeta, kao i uspeh u lečenju infekcija ljudi i životinja primenom antibiotika. Biofilm se razmatra višim evolutivnim stupnjem organizacije života kod nesporogenih bakterija jer im omogućava uspešno preživljavanje u spoljašnjoj sredini i u nepovoljnim uslovima. Dokazano je da je biofilm dominantan način života bakterija u svim ekološkim sistemima i da predstavlja integralnu karakteristiku svih prokariotskih organizama. U dosadašnjim ispitivanjima, biofilmovi su u 100% slučajeva nađeni ne samo u kanalizacionim cevima već i u sistemima cevi za dovod čiste (pijaće) vode, kateterima koji se koriste u humanoj i veterinarskoj medicini, na zubima ljudi i životinja, na korenovima raznih vrsta biljaka i u tkivu pluća ljudi koji boluju od cistične firboze (Costerton i saradnici, 1978; Costerton i saradnici, 1999). Biofilmovi su nađeni i na drugim biotičkim i abiotičkim površinama, pri čemu je njihovo formiranje pod uticajem većeg broja varijabilnih faktora životnog okruženja. Ustanovljeno je da su biofilmovi formirani u inficiranim tkivima (na sluznicama) razlog nastanka teško izlečivih, hroničnih infekcija kao što su hronično zapaljenje bešike izazvano uropatogenim sojevima *E.coli*, hronično zapaljenje srednjeg uha i sinusa izazvano vrstama *Streptococcus penumoniae*, *Haemophilus influenzae*, gnojnih infekcija kože (rane, dekubitusi) izazvanih vrstom *Staphylococcus aureus* (Dunne, 2002; Donlan i Costerton, 2002; Pace i saradnici, 2006). Karakteristika ovih infekcija je da traju mesecima, pa i godinama, uprkos primeni antibiotika na koje su uzročnici provereno osetljivi. Dokazano je da pokretne i nepokretne vrste bakterija koriste različite mehanizme za formiranje biofilma, a najbolje je proučen model biofilma koga stvara vrsta *Pseudomonas aeruginosa* (Tolker-Nielsen i saradnici, 2000; Sauer i saradnici, 2002; Golovlev, 2002; Drenkard, 2003). Pored toga, veoma dobro su proučeni modeli biofilmova koje stvaraju vrste *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*. Međutim, u naučnoj literaturi se sve češće navode dokazi da upravo biofilmovi omogućuju uspešno perzistiranje i

razmnožavanje salmonela u svim ekološkim sredinama što je i razlog konstantno aktuelnog problema salmoneloze u svim državama, na svim kontinentima, kod ljudi i svih vrsta životinja (Lapidot i saradnici, 2006; Vestby i saradnici, 2009a; Steenackers i saradnici, 2012; Prunić i saradnici, 2016).

Hrana za životinje se smatra prvom karikom u lancu „od njive do trpeze“. Pretpostavka je da zahvaljujući sposobnosti da formiraju biofilmove na inertnim površinama sa kojima hrana dolazi u kontakt, određeni serovarijeteti *Salmonella* vrsta dospevaju u finalne proizvode tj. namirnice ne samo preko kontaminiranih sirovina, već i tokom procesa proizvodnje i postprocesno. Bakterije iz roda *Salmonella* spadaju u najučestalije uzročnike alimentarnih infekcija, i uprkos kontinuiranom monitoringu mikrobiološke bezbednosti namirnica, svake godine milioni ljudi u razvijenim zemljama obole od salmoneloze. Za razliku od nekih infektivnih bolesti koje su iskorenjene ili su suzbijene u značajnoj meri, salmoneloza je neprekidno prisutna u svim državama sveta, bez obzira na geografske, kulturološke i druge karakteristike podneblja. Veza između *Salmonella* u hrani za životinje i pojave salmoneloze kod ljudi, jasno je dokazana (Crump i saradnici, 2002; Jones, 2011). Prisustvo *Salmonella* u hrani za životinje predstavlja rizik za kolonizaciju ili infekciju životinja, a posledično i infekciju ljudi koji konzumiraju proizvode životinjskog porekla. Pored hrane animalnog porekla, koja se tradicionalno smatra glavnim izvorom *Salmonella* za ljude, novija epidemiološka istraživanja sve češće identifikuju hranu biljnog porekla kao izvor salmonela (Lapidot i saradnici, 2006; Steenackers i saradnici, 2012; Cevallos-Cevallos i saradnici, 2012). Skoro je potvrđeno da različite podvrste i serovarijeteti u okviru vrste *Salmonella enterica* koloniziraju biljke (seme, izdanke, lišće, koren), a da serovarijetet *S. Typhimurium* čak aktivno invadira biljna tkiva izazivajući simptome bolesti. U hranu za životinje, kao i u namirnice, salmonele mogu dospeti kontaminiranim sirovinama animalnog i biljnog porekla, međutim, kontaminacija hrane je moguća i tokom njene prerade ili postprocesno. Poslednjih decenija sve je više dokaza da određeni serovarijeteti *Salmonella* mogu perzistirati mesecima, pa čak i godinama na mestima proizvodnje hrane (Kumar i Anand, 1998; Trachoo, 2003; Møretro i saradnici, 2009; Habimana i saradnici 2010; Giaouris i saradnici, 2012; Srey i saradnici, 2013; Habimana i saradnici 2014). Oprema i sve površine u pogonima za proizvodnju hrane, plastika, nerđajući čelik, drvo, staklo, mogu biti supstrat za razvoj biofilmova koji postaju izvor

ponavljanih kontaminacija finalnih proizvoda (Nesse i saradnici, 2003; Vestby i saradnici, 2009b). Prisustvo salmonela je ustanovljeno u mlinovima za seckanje i mešanje hrane, na pokretnim trakama, konvejskim kaiševima, mašinama za pakovanje, mestima za skladištenje i ostalim površinama sa kojima hrana dolazi u kontakt. Određeni serovarijeteti salmonela su češće prisutni u fabrikama stočne hrane, i to su: *S. Agona*, *S. Montevideo* i *S. Senftenberg* (Vestby i saradnici, 2009a). Češći nalaz određenih serovarijeteta, između ostalog, se objašnjava njihovom većom sposobnošću da perzistiraju u formi biofilma na abiotskim površinama (Aviles i saradnici, 2013; Castelijm i saradnici, 2013).

Opstanak *Salmonella* na abiotskim površinama jedan je deo životnog ciklusa ove vrste bakterija i vezan je za višecelijske obrasce ponašanja. Mehanizmi koje salmonele aktiviraju za preživljavanje u životnom okruženju, drugačiji su od faktora odgovornih za patogenezu bolesti i uslovljeni su ekspresijom specifičnih gena i sintezom produkata koje ovi geni kodiraju. Produkcija celuloze i tankih agregativnih (*curli*) fimbrija, smatra se ključnom u preživljavanju salmonela u životnom okruženju, uključujući i površine na mestima proizvodnje hrane (Solomon i saradnici, 2005; Jonas i saradnici, 2006).

Višecelijski obrasci ponašanja kod *Salmonella* postaju sve atraktivniji predmet naučnih istraživanja (Stepanović i saradnici, 2003). Cilj im je rasvetljavanje genetskih mehanizama regulacije formiranja biofilma, faktora koji doprinose nastanku i opstanku biofilmova, njihovoj ulozi u proizvodnji bezbedne hrane, kao i iznalaženje efikasnih strategija za njihovu eradikaciju. Biofilmovi su veoma teški za preveniranje i eradikaciju, a savremene strategije borbe protiv patogenih bakterija nisu efikasne za kontrolu patogena organizovanih u biofilm (Maciorowski i saradnici, 2006; Burmolle i saradnici, 2010).

U Republici Srbiji ne postoji zakonska obaveza serološke identifikacije *Salmonella* izolovanih iz uzoraka hrane za životinje. Zbog toga, hrana za životinje predstavlja nedovoljno poznat izvor serovarijeteta od posebnog značaja u epidemiologiji.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Istorijat, klasifikacija i taksonomija *Salmonella*

Prvi predstavnik roda *Salmonella* izolovan je iz slezine i mezenterijalnih limfnih žlezda bolesnika koji je umro od crevnog tifusa, od strane Eberth 1880. godine i nazvan je Ebertov bacil. Gaffky je 1884. izolat uspeo da kultiviše i detaljnije ispita, pri čemu mu je dao naziv Eberth-Gaffkyev bacil (Adams i Moss, 2008). Drugu bakteriju koja je po mnogim osobinama ličila na uzročnika crevnog tifusa, izolovali su Salmon i Smith iz svinja koje su bolovale od svinjske kolere. Naziv *Salmonella* nije korišćen do 1900. godine, kada je Joseph Leon Lignieres predložio da se otkrivena vrsta nazove *Salmonella* u čast Daniela Salmona (Hartman, 1997; Su i Chiu, 2007; Evangelopoulou i saradnici, 2010).

Osnova za klasifikaciju i identifikaciju *Salmonella* je serološka tipizacija koju je napravio White, a usavršili Kauffmann i drugi autori. Serološka tipizacija se bazira na identifikaciji antigena u sastavu lipopolisaharidnog sloja ćelijskog zida (O ili somatski antigen) i antigena prisutnih na površini bakterija (H ili flagelarnih antigena) (Heyndrickx i saradnici, 2005). Salmonele imaju tri glavne grupe antigena: somatski (O - antigen), flagelarni (H - antigen) i ovojni (Vi - antigen) koji je prisutan kod malog broja serovarijeteta. Antigensku specifičnost somatskom O – antigenu daje polisaharidna komponenta. Somatski (O) antigen je termostabilan i grupno specifičan. Na osnovu ovog antigena sve salmonele su razvstane u grupe označene arapskim bojovima od 1 do 67 i velikim latiničnim slovima od A do Z. Flagelarni (H) antigen je tipski antigen, koji je po hemijskom sastavu protein i zato je termolabilan. Sastoji se od dve grupe antigena:

- a) specifični antigen ili H antigen faze 1 (obeležava se malim slovima abecede);
- b) nespecifični H antigen ili antigen faze 2 (obeležava se malim brojevima 1,2,3...).

I jedna i druga grupa flagelarnih antigena sastoji se od velikog broja serološki različitih antigena. Bifazne salmonele imaju antigene faze 1 i 2, a monofazne salmonele imaju antigene faze 1. Sve salmonele imaju bar jedan ili više serološki različitih H antigena faze 1, i mnoge salmonele imaju po 1 ili više zajedničkih H antigena faze 1 i 2. Vi-antigen je ovojni antigen koji se nalazi na površini bakterijske ćelije. On obavlja O antigen i potpuno ometa aglutinaciju u homolognom O– serumu. Nalazi se samo kod *S.*

Typhi, *S. Paratyphi C* i *S. Dublin*. Vi-antigen *S. Typhi* je N-acetil-galaktouronska kiselina i razlikuje se od Vi antigena drugih *Salmonella*. Vi antigen se može ukloniti subkultiviranjem soja ili zagrevanjem suspenzije kulture na 100°C.

Salmonele ne proizvode egzotoksine, a lipopolisaharid (LPS) ćelijskog zida (O antigen) deluje kao endotoksini.

Na osnovu 67 somatskih (O) antigena i brojnih flagelarnih (H) antigena, do danas je otkriveno preko 2500 serotipova *Salmonella*. Prema aktuelnoj taksonomiji rod *Salmonella* obuhvata dve vrste: *Salmonella enterica* (2557 serotipova) i *Salmonella bongori* (22 serotipa). Vrsta *Salmonella enterica* obuhvata šest podvrsta: *enterica* (podvrsta I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) i *indica* (VI) (Grimont i Weill, 2007). Vrsti *Salmonella enterica* pripadaju svi najvažniji serovarijeteti koji su patogeni za ljude. Imena serovarijeteta se uobičajeno daju prema sindromu koji izazivaju (*S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* i *C*), prema specifičnim domaćinima, (*S. Gallinarum*, *S. Choleraesuis*, *S. Abortusovis*) ili prema imenu gradova ili država u kojima su otkriveni (*S. Wien*, *S. Kentucky*, *S. London*, *S. Panama*). U okviru podvrste *S. enterica* subsp. *enterica*, serovarijeteti iz grupa A, B, C1, C2, D i E izazivaju oko 99% infekcija ljudi i životinja (Brenner i saradnici, 2000). Serotipizacija *Salmonella* je omogućila prvobitnu podelu na vrste po principu: „jedan serovarijetet– jedna vrsta“, a serovarijetetima su davani nazivi prema Lineovoj binominalnoj nomenklaturi (na primer *Salmonella enteritidis*). Ta prvobitno postavljena nomenklatura biva poljuljana početkom sedamdesetih godina kad su Crosa i saradnici (1973) pomoću DNK-DNK hibridizacije dokazali da su svi serovarijeteti *Salmonella* vrlo srodni i da sličnost u DNK sekvenci između različitih serovarijeteta iznosi 95-99%, sa izuzetkom vrste *Salmonella bongori*. Nakon objavljivanja rezultata molekularnih ispitivanja, sve salmonele izuzev *S. bongori*, su objedinjene u jednu vrstu koja se naziva *Salmonella enterica* (Brenner i saradnici, 2000).

Tabela 2.1. Vrste i podvrste salmonela (Grimont i Weill, 2007)

Vrsta i podvrsta	Broj serovarijeteta u okviru vrste i podvrste
<i>Salmonella enterica</i>	2557
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1 531
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>S. bongori</i> (V)	22
Ukupno (rod <i>Salmonella</i>)	2 579

Sa promenama u taksonomiji, ime serovarijeteta ostaje glavna taksonomska definicija izolata salmonela. U praksi se koristi pretežno stara klasifikacija na osnovu antigenskih karakteristika, na primer, *Salmonella* Typhimurium umesto navođenja vrste, podvrste i serovarijeteta: *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip Typhimurium, ili *Salmonella enterica* serotip Typhimurium, ili *Salmonella* ser. Typhimurium (gde je Typhimurium oznaka serovarijeteta, a ne vrste) (Grimont i Weill, 2007; Gunell, 2010).

2.1.1. Osnovne karakteristike bakterija iz roda *Salmonella*

Rod *Salmonella* pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Salmonele su Gram-negativni, fakultativno anaerobni izduženi, pravi štapići, dužine 2 - 3 µm i širine 0.4 - 0.6 µm. Salmonele ne formiraju kapsule i ne stvaraju spore. Svi predstavnici ovog roda, sa izuzetkom *S. Gallinarum* i *S. Pullorum* su pokretni, zahvaljujući peritrihno raspoređenim flagelama (Adams i Moss, 2008; Hald, 2013). Salmonele uobičajeno proizvode fimbrije ili pile.

Rast salmonela moguć je u širokom rasponu temperature od 5°C do 47°C i pH vrednosti od 3,6 - 9,5 (Marriott i Gravani, 2006). Vrednosti temperature od 37°C i pH u intervalu 6,5 – 7,5 predstavljaju optimalne uslove za rast i razmnožavanje salmonela.

Za izolaciju salmonela iz kliničkih uzoraka, namirnica i hrane za životinje, koriste se brojne selektivne i diferencijalne podloge, kojima se postiže inhibicija rasta neciljnih vrsta mikroorganizama, uobičajeno prisutnih u uzorcima. Protokoli za izolaciju podrazumevaju prethodno neselektivno obogaćenje uzorka (puferovana peptonska voda); selektivno obogaćenje (Rappaport-Vassiliadis bujon i Muller-Kauffmann tetrationsat bujon sa novobiocinom) i izolaciju na selektivnim podlogama (ksilozna lizin dezoksiholatni agar, *Salmonella-Shigella* agar, bizmut-sulfitni agar; *Salmonella* diferencijalni agar, Harlequin *Salmonella* agar i dr.). Salmonele uobičajeno na podlogama za kultivaciju formiraju kolonije S-forme, okrugle, glatke, sjajne i blago ispupčene. Pored tipičnih S kolonija, salmonele mogu formirati i kolonije nepravilnih ivica i hrapave površine (R forma). Varijacije u izgledu kolonija glatke-grube (smooth-rough) forme, se povezuju sa gubitkom O antigena i virulencije. Salmonele sa defektom u biosintezi O polisaharida imaju R formu kolonija. R mutanti su izgubili moć aglutinacije u antiserumu za somatske antigene, a suspendovani u fiziološkom rastvoru pokazuju svojstvo autoaglutinabilnosti (Kumar i Anand, 1998).

Kao i ostali članovi familije *Enterobacteriaceae*, salmonele su oksidaza negativne i katalaza pozitivne bakterije. Glukozu razlažu do kiseline i gasa (vrste *S. Typhi* i *S. Gallinarum* razlažu glukozu bez pojave gasa). Od drugih ugljenih hidrata uobičajeno razlažu arabinozu, maltozu, manitol, manozu, ramnozu, trehalozu, ksilozu i dulcitol. Laktoza su negativne, ne produkuju ureazu, indol i Voges-Proskauer (VP) su negativne, a koriste citrate kao izvor ugljenika. Biohemijske karakteristike zajedničke većini salmonela, prikazane su u Tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Osnovne biohemijske karakteristike *Salmonella*

Vrsta <i>Salmonella</i>	Trostruki šećer			Hidroliza urea	Dekarboksilacija lizina	ONPG β -galaktozidaza	Voges-Proskauer	Indol
	Fermentacija glukoze	Fermentacija laktoze	Produkcija gasa H ₂ S					
<i>S. Typhi</i>	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. Paratyphi</i>	+	-	+	-	-/+	-	-	-
Ostale salmonele	+	-	+	-	+	-	-	-

(SRPS EN ISO 6579:2008)

2.1.2. Mehanizmi patogenosti

Patogeni potencijal salmonela bazira se na sposobnosti kolonizacije i aktivne invazije epitelnih ćelija creva. U organizam ljudi i životinja salmonele uobičajeno dospevaju alimentarnim putem, odnosno ingestijom kontaminirane hrane ili vode. Zahvaljujući različitim mehanizmima adaptacije na nepovoljne uslove okruženja, uključujući i toleranciju na kiseline („*acid tolerance response*“ – ATR), salmonele preživljavaju efekat želudačne kiseline, niske pH vrednosti i delovanje žučnih kiselina u proksimalnom delu digestivnog trakta. Adheziju za receptore na epitelnim ćelijama creva omogućava više vrsta fimbrija ili pila: fimbrije tipa 1 (*Fim*), duge polarne fimbrije (*Lpf- Long polar fimbriae*), tanke agregativne ili kovrdžave fimbrije (*Tafi- Thin aggregative fimbriae*) i plazmidski kodirane fimbrije (*Pef- Plasmid encoded fimbriae*) (Ledeboer i saradnici, 2006). Nakon vezivanja za epitelne ćelije, kod bakterija se eksprimira sekretorni sistem tipa III (T3SS) koji pospešuje ulaz bakterija u ćelije (Kimbrough i Miller, 2000). Struktura T3SS predstavljena je u vidu šuplje igle koja spaja bakterijsku citoplazmu i ćelijsku membranu napadnute ćelije (Waterman i Holden, 2003; Coburn i saradnici, 2007; Schraidt i saradnici, 2010). Sekretorni sistem T3SS predstavlja kompleks nekoliko podjedinica koje se sastoje od 20 stukturnih i regulatornih proteina (Coburn i saradnici, 2007), što ga čini jednim od najsloženijih sekretornih sistema. Geni invazivnosti su locirani u ostrvu patogenosti („*Salmonella pathogenicity islands*“ - SPI) koji kodira faktore virulencije: adhezine, invazine i toksine. *Salmonella enterica* koristi dva funkcionalno različita T3SS kodirana na ostrvu patogenosti SPI-1 i SPI-2. SPI-1 geni kodiraju faktore uključene u invaziju salmonela u epitelne ćelije creva; SPI-2 geni omogućavaju preživljavanje samonela u makrofagima (Waterman i Holden, 2003; Schmidt i Hensel, 2004).

2.1.3. Salmoneloze

Salmoneloze se ubrajaju u važne i najučestalije zoonoze i predstavlja jednu od vodećih hranom prenosivih infekcija ljudi. Na osnovu adaptiranosti na vrstu domaćina salmonele se mogu podeliti u tri grupe. U prvu grupu spadaju ubikvitarni serovarijeteti sa visokim stepenom adaptacije na različite vrste domaćina („*generalist*“ – *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Hadar*). Ovi serovarijeteti često asimptomatski koloniziraju digestivni trakt domaćih životinja i kontinuirano se izlučuju fecesom, što doprinosi njihovom daljem širenju i kontaminaciji životnog okruženja. Preko proizvoda namenjenih ishrani ljudi, ubikvitarni serovarijeteti ulaze u lanac hrane i najčešći su uzročnici salmoneloza ljudi. U drugu grupu spadaju serovarijeteti koji su primarno adaptirani na jednu vrstu domaćina, ali mogu izazvati bolest i kod drugih vrsta („*host adapted*“). Na primer, *S. Dublin* je primarno adaptirana na goveda kod kojih izaziva ozbiljne infekcije, ali može biti uzročnik infekcija i kod ljudi. U trećoj grupi nalaze se serovarijeteti koji su isključivo adaptirani na jednu vrstu domaćina. Serovarijeteti ove grupe su sposobni da izazovu ozbiljne sistemske infekcije samo kod ograničenog broja srodnih vrsta („*host specific*“ – *S. Gallinarum* kod živine, *S. Typhi* kod čoveka ili *S. Abortusovis* kod ovaca) (Xu, 2007).

Serovarijeteti *S. Typhi* i *S. Paratyphi A, B i C* su primarno patogeni za čoveka i izazivači su tifusnih infekcija. Jedini rezervoari za ove serovarijetete su ljudi, a bolest se prenosi sa čoveka na čoveka direktnim ili indirektnim kontaktom. Širenje infekcije moguće je i preko fecesa hronično inficiranih osoba (kliconoše) i fekalnom kontaminacijom vode i hrane. U humanoj populaciji ovi serovarijeteti se smatraju izazivačima nezoonotske septikemično-tifoidne forme oboljenja (crevna groznica). Simptomi tifusa (uzročnik *S. Typhi*) su: visoka temperatura, znojenje, glavobolja, nesanica, bol u stomaku i dijareja ili konstipacija, dok su simptomi paratifusnih infekcija (uzročnici *S. Paratyphi A, B i C*) uobičajeno blaži.

Ostale netifusne salmonele su visoko adaptirane na životinje, ali često izazivaju i bolesti kod ljudi. Najčešće se ljudi inficiraju netifoidnim salmonelama alimentarnim putem, preko kontaminiranih proizvoda animalnog porekla (jaja, meso, mleko). Uobičajeni simptomi infekcije su dijareja, povraćanje, groznica i stomachni grčevi koji počinju najčešće 12 do 72 sata nakon infekcije i traju tri do sedam dana. Infekcije izazvane salmonelama najčešće su blaža ili umereno teška oboljenja. Komplikacije su

moгуće i odnose se na pojave septikemije, osteomijelitisa, pneumonije, meningitisa, a kod imunokompromitovanih pacijenata moguć je i smrtni ishod (u oko 2% slučajeva), posebno kada je uzorčnik rezistentan na antibiotike (Foley i saradnici, 2006; Dhanoa i Fatt, 2009). Serovarijeteti *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* imaju najveći značaj u epidemiologiji salmoneloza.

Infektivna doza zavisi od virulencije uzročnika (serovarijeteta) i imunskog statusa organizma. Prema rezultatima epidemioloških studija, infektivna doza može biti manja od 10 CFU/g („*colony forming unit*“ – broj bakterija koje formiraju kolonije), dok je u nekim slučajevima ona značajno viša (10^9 CFU/g). Infektivna doza je niža ukoliko se salmonele nalaze u namirnicama sa visokim sadržajem masti i proteina, jer oni štite ćelije bakterija od niske pH vrednosti želudačnog soka.

S. Enteritidis je najčešće utvrđen serovarijetet kod živine, pa su infekcije ljudi ovim serovarijetetom u najvećem broju slučajeva povezane sa konzumacijom živinskog mesa i jaja. *S. Kentucky* je široko rasprostranjena kod živine u SAD, ali retko izaziva infekcije kod ljudi. *S. Typhimurium* se može naći osim kod živine i kod goveda, svinja i ovaca. *S. Dublin* je specifično adaptirana na goveda. Kod odraslih jedinki infekcija često prolazi asimptomatski, pa sojevi ovog serovarijeteta mogu perzistirati na farmama mesecima i godinama. Kod mlađih kategorija životinja (telad i junad), infekcija ovom salmonelom može biti akutna i završiti letalnim ishodom. Jedinke koje prebole infekciju postaju kliconoše. Kod goveda se ustanovljavaju i serovarijeteti *S. Newport*, *S. Anatum*, *S. Montevideo*, *S. Braenderup* (Hoelzer i saradnici, 2011).

Serovarijeteti *S. Abortusovis*, *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Anatum*, *S. Arizonae* su najčešće ustanovljavani kod malih preživara. Pobačaje uglavnom izaziva *S. Abortusovis*, dok infekcije izazvane serovarijetetima *S. Typhimurium* i *S. Dublin* rezultiraju enteritisom ili septikemijom (Hoelzer i saradnici, 2011).

Salmoneloze kod svinja mogu biti asimptomatske infekcije, ili teške infekcije perakutnog toka. Infekcije izazvane sa *S. Choleraesuis* (uzročnik paratifusa svinja) rezultiraju razvojem teškog enterokolitisa i septikemije. Na bolest su prijemčive sve starosne kategorije, ali najčešće obole prasad u uzrastu od 8 nedelja (Hoelzer i saradnici, 2011). Ljudi se mogu inficirati konzumiranjem nedovoljno termički obrađenog mesa svinja.

Živina je prirodni domaćin za *S. Galinarum* (uzročnik kokošijeg tifusa) i *S. Pullorum* (uzročnik belog proliva pilića). Infekcije se ređe javljaju i kod ćuraka, morki, prepelica i fazana. Smrtnost može biti viša od 50%. Latentno inficirana živina uzročnika prenosi vertikalno (transovarijalno) i horizontalno (fecesom). Sa aspekta zaštite zdravlja ljudi, prisustvo serovarijeteta Enteritidis i Typhimurium kod živine ima mnogo veći značaj, jer ove infekcije kod njih protiču asimptomatski.

2.1.4. Rasprostranjenost *Salmonella*

Salmonele su ubikvitarno rasprostranjeni mikroorganizmi. Životni ciklus salmonela odigrava se jednim delom u višim organizmima, a drugi deo životnog ciklusa odnosi se na njihov opstanak u životnom okruženju do pojave novih infekcija i/ili kolonizacija. U spoljašnjoj sredini, salmonelama je na raspolaganju manja količina hranljivih materija, a izložene su visokim varijacijama vlažnosti, osmotskog pritiska, temperature, pH vrednosti (Rosenberg i saradnici, 2008; Parys i saradnici, 2010). Smatra se da opstanku salmonela u okruženju doprinosi prelazak u vijabilno, ali nekultivabilno stanje („*viable but nonculturable state*“ – VBNC), pri čemu su bakterije metabolički aktivne, ali slabije rastu i ne mogu se kultivisati u laboratorijskim uslovima. Nakon dospevanja u povoljnije uslove, dolazi do njihovog rasta i razmnožavanja (Gupte i saradnici, 2003).

Iako se biljne vrste tradicionalno ne smatraju domaćinima za *Enterobacteriaceae*, novija epidemiološka istraživanja sve češće identifikuju hranu biljnog porekla kao izvor salmonela za ljude (Lapidot i saradnici, 2006; Teplitski i saradnici, 2012; Steenackers i saradnici, 2012; Cevallos-Cevallos i saradnici, 2012). Salmonele imaju sposobnost da koloniziraju biljke (seme, koren, izdanci, lišće). Na biljke uobičajeno dospevaju preko zemljišta kontaminiranog otpadnim (kanalizacionim) vodama ili upotrebom svežeg stajnjaka. Salmonele imaju sposobnost i aktivne invazije biljaka i intracelularnog razmnožavanja, pri čemu izazivaju i patogene efekte u svim stadijumima rasta biljaka. Dokazano je da kontaminacija zemljišta preko voda za navodnjavanje ili svežeg stajnjaka može uzrokovati kontaminaciju velikog broja poljoprivrednih kultura kao što su paradajz, zelena salata, peršun, rotkvica, šargarepa i do šest meseci nakon kontaminacije zemljišta (Schikora i saradnici, 2008; Teplitski i saradnici, 2009; Steenackers i saradnici, 2012). Opstanak i upornost salmonela i drugih enteropatogena kao epifita („*epiphyte*“) na površini biljaka u velikoj meri je posledica

njihove široke adaptivne sposobnosti (Beuchat, 2002; Steenackers i saradnici, 2012). Kod *S. Typhimurium* je identifikovan poseban set gena koji diferencijalno reguliše tok kolonizacije unutrašnjih tkiva paradajza, a koji su izgleda različiti od gena uključenih u infekciju i kolonizaciju životinjskih tkiva, kao i od gena za kolonizaciju biljnih tkiva nađenih kod fitopatogenih bakterija (Noel i saradnici, 2010).

2.1.5. Epidemiološki podaci

Hrana za životinje je prva karika u lancu ishrane i jedan od mogućih izvora *Salmonella* za životinje, a posredno i ljude koji konzumiraju proizvode životinjskog porekla. Procena značaja i uloge hrane za životinje u pojavi epidemija izazvanih salmonelama je veoma složeno, zbog činjenice da nedostaju podaci o serotipovima *Salmonella* u hrani za životinje i namirnicama životinjskog porekla.

Širom sveta od salmoneloze godišnje oboli oko 93,8 miliona ljudi, a 155000 infekcija završi smrtnim ishodom (Sheffield i Crippen, 2012). U SAD *Salmonella* spp. su vodeći uzročnici bakterijskih infekcija koje se prenose hranom, a u Evropi su po učestalosti na drugom mestu, iza *Campylobacter* spp. (Hoelzer i saradnici, 2011).

Prema podacima Evropske Agencije za bezbednost hrane (*European Food Safety Authority* - EFSA) u periodu od 2007. do 2011. godine, na području zemalja Evrope koje su članice EFSA evidentirano je 95548 epidemija salmoneloze (EFSA, 2013b). Namirnice animalnog porekla bile su izvor infekcije kod 1271 epidemije (sa 17001 obolelih, 3208 hospitalizacija i 24 smrtna ishoda) (EFSA, 2013b). Na osnovu podataka Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO), samo u SAD-u, oko 76 miliona ljudi svake godine oboli od neke alimentarne infekcije. Od ovog broja, 325000 slučajeva zahteva bolničko zbrinjavanje, a 5000 se završi letalnim ishodom (WHO, 2007). Tokom 2013. godine, u Sjedinjenim Američkim Državama prijavljeno je 818 hranom prenosivih bolesti, sa 13360 obolelih, 1062 hospitalizacije i 16 smrtnih slučajeva (CDC, 2013).

Zabrinjavajuć je podatak da pored hrane animalnog porekla, koja se tradicionalno smatra glavnim izvorom *Salmonella* za ljude, novija epidemiološka istraživanja sve češće identifikuju hranu biljnog porekla kao izvor salmoneloze. U periodu od 2007. do 2011. godine u 37 epidemija salmoneloze, kao izvor infekcije

identifikovani su sveža salata, paradajz, naklijala semena, voćni sokovi, dinje i orasi (EFSA, 2013b).

Prema podacima Evropskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (European Centre for Disease Prevention and Control) na području EU tokom poslednjih par godina salmoneloze su kod ljudi posle kampilokabterioze najučestalije alimentarne infekcije. *Salmonella enterica* serotip Enteritidis je jedan od najučestalijih uzročnika salmoneloze u humanoj populaciji, s obzirom da je 41,3% infekcija salmonelom izazvano ovim serotipom. Od ostalih serotipova zastupljeni su *S. Typhimurium* (22,1%), *S. Typhimurium* monofazni (1,4,[5],12:i:-) (7,2%) i *S. Infantis* (2,2%) (EFSA i ECDC, 2014). Posle kampilobakterioze, salmonele su najčešći uzročnici epidemija (22,5% od ukupnog broja prijavljenih epidemija). Od 2008. do 2013. godine ukupan broj epidemija (1888) izazvanih salmonelama u zemljama Evrope koje su članice EFSA, značajno je smanjen za 38,1% (EFSA i ECDC, 2015).

Salmonela je najčešći uzročnik alimentarnih epidemija u zemljama EU/EEA u 2013 godini. Godine 2013. najčešće ustanovljeni serovarijeteti su *S. Enteritidis* (39,5%) i *S. Typhimurium* (20,2%). Broj inficiranih ljudi *S. Enteritidis* u 2013. godine je samnjen za 14,1% u odnosu na broj ustanovljenih infekcija ovim serovarijetetom u 2012. godini. U periodu od dve godine od 2011. do 2013. godine, broj inficiranih ljudi sa *S. Typhimurium*, uključujući i *S. Typhimurium* monofazni (1,4,[5],12:i:-), smanjen je za 11,1%. Dok broj prijavljenih infekcija izazvanih serovarijetetom *S. Infantis* porastao za 26,5% (EFSA i ECDC, 2015). Pretpostavlja se da je trend pada stopa salmoneloze rezultat implementacije programa za kontrolu salmonele na farmama, proizvodnje i prometa mesa i primeni higijensko-sanitarnih mera u ovim procesima, i sve zastupljenijoj primeni HACCP sistema (Hazard Analysis Critical Control Point) u procesima proizvodnje (EFSA, 2013a), ali i povećane informisanosti konzumenata.

U zemljama EU/EEA salmonele su drugi najčešće registrovani uzročnici gastrointestinalnih infekcija i epidemija koje se prenose kontaminiranom hranom. Registrovana stopa incidencije u 2013. godini iznosila je 20,4 na 100.000 populacije, što predstavlja smanjenje od 7,9% u poređenju sa 2012. godinom. Time se potvrđuje nastavak trenda opadanja učestalosti obolevanja u zemljama EU/EEA i potvrđuje se uspešna implementacija programa kontrole infekcije kod životinja, posebno živine. Najviša notifikaciona stopa je registrovana u Češkoj Republici (93,1/100.000), zatim u

Slovačkoj (70,3/100.000), a najniže su bile u Portugalu i Grčkoj (ispod 4/100.000) (EFSA i ECDC, 2015).

Zbog razlika koje postoje u sistemu nadzora i klasifikaciji zaraznih bolesti u Republici Srbiji u odnosu na zemlje EU/EEA uporedivost podataka nije uvek moguća.

Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti Instituta za javno zdravlje Republike Srbije, već godinama alimentarne infekcije izazvane salmonelom zauzimaju drugo mesto po učestalosti pojavljivanja (IZJZS, 2014; IZJZS, 2015). Godine 2013. na teritoriji Republike Srbije zabeležen je 1571 slučaj salmoneloze, sa incidencijom 21,82/100.000 populacije. Prijavljeno je 46 epidemija salmoneloza u kojima je put prenosa bila hrana, sa ukupno 409 obolelih osoba, od kojih je 88 osoba hospitalizovano; četiri epidemije sa neutvrđenim putem prenosa, 13 obolelih i 9 hospitalizovanih osoba; i dve epidemije sa kontaktnim putem prenosa, 7 obolelih i 4 hospitalizovane osobe (IZJZS, 2014).

Prema podacima iz 2014. godine u Republici Srbiji prijavljeno je 15.735 lica obolelih od crevnih zaraznih bolesti (incidencija 219,6/100.000) i 70 umrlih osoba (mortalitet 1/100.000). U 2014. godini na teritoriji Republike Srbije zabeleženo je 1512 slučajeva obolevanja od animalnih salmoneloza, sa incidencijom 21,1/100.000 (IZJZS, 2015).

Na teritoriji južnobačkog okruga u periodu 2005-2010. godine među salmonelama identifikovanim do niova serotipa, najfrekventnije je ustanovljavan serotip Enteritidis kao uzročnik salmoneloze u preko 80% slučajeva svake godine. Godine 2006. na drugom mestu je bila *S. Agona* (3.2%), a 2008. *S. Senftenberg* (1.9%), verovatno kao posledice klonalnog širenja odnosno epidemije, što je potvrđeno u slučaju *S. Senftenberg* (IZJZV, 2008; IZJZV, 2009; IZJZV, 2010; IZJZV, 2011).

2.2. Biofilm

2.2.1. Istorijat

Zajednice mikroorganizama koje se formiraju na površinama zapažene su mnogo pre nego što su ljudi imali na raspolaganju sredstva za njihovo detaljnije istraživanje. Antonie van Leeuwenhoek je 1684. godine zapazio mikroorganizme na površini zubne gleđi („*animaculi in scurf on teeth*“), što bi se moglo smatrati prvim otkrićem mikrobnog biofilma (Costerton i saradnici, 1978).

Tek početkom dvadesetog veka akumulacije bakterija na površinama počinju da zaokupljaju pažnju istraživača. Heukelekian i Heller su 1940. godine ustanovili efekat flaše ("*bottle effect*") kod mikroorganizama u moru, koja podrazumeva njihovu sklonost da se vezuju za površine uronjene u vodu. Claude Zobell je 1943. godine objasnio ovaj fenomen time da se na površini stakla talože hranljive materije iz morske vode, čime one u većoj koncentraciji postaju dostupne, pa se mikroorganizmi koncentrišu na površinu stakla birajući na taj način optimalnije uslove za život.

Zobell i Allen (1935) su prvi konstruisali aparat specijalno dizajniran za ispitivanje vezivanja mikroorganizama za površine. Aparat je predstavljao nosač za 16 staklenih slajdova i bio je dizajniran za spuštanje u more. Primenom ove aparature Zobell i Allen su ustanovili mnogo veću raznovrsnost mikroorganizama u njihovim zajednicama formiranim na staklenim slajdovima, u odnosu na vrste ustanovljene u morskoj vodi.

Obimnija istraživanja zajednica mikroorganizama započeta su krajem 60-tih, i početkom 70-tih godina 20-og veka i uglavnom su se bazirala na prirodne vodene ekosisteme, sisteme distribucije vode, tretmane otpadnih voda i zubnu gleđ. Jones i saradnici (1969) su prvi upotrebili transmisioni elektronski mikroskop za proučavanje zajednica mikroorganizama stvorenih na filterima za prečišćavanje otpadnih voda. Primenom mikroskopije visoke rezolucije, na osnovu razlika u ćelijskoj morfologiji ustanovljena je velika raznovrsnost mikroorganizama, a bojenje rutenijum crvenim je dokazalo da su mikroorganizmi okruženi vanćelijskom supstancom koja je pretežno sačinjena od polisaharida.

Termin „biofilm“ za ove zajednice mikroorganizama vezane za neku površinu, prvi put je upotrebljen u naučnoj literaturi 1975. godine u časopisu *Microbial Ecology*

(Mack i saradnici, 1975). Do tog vremena termin se upotrebljavao nezvanično u stručnim krugovima, nekoliko godina pre nego što je postao prihvatljiv za publikovanje.

Karunakaran (2011) je procenjujući značaj istraživanja biofilma izneo mišljenje da ova istraživanja treba da budu posebna naučna disciplina sa nazivom “biofilmologija” (*engl “biofilmology”*).

2.2.2. Definicija biofilma

Prekretnicu u proučavanju biofilma predstavlja 1978. godina, kada su Costerton i saradnici prvi put definisali biofilm i postavili teoriju o mehanizmima uključenim u njegovo formiranje. Biofilm su definisali kao strukturnu zajednicu ćelija mikroorganizama koji su vezani za inertne, žive površine ili međufazu i uklopljeni u polimerni matriks (ekstracelularnu supstancu) koji same proizvode (Costerton i saradnici, 1978). Isti autori su dopunili definiciju 2002. godine činjenicom da mikroorganizmi koji rastu u biofilmu pokazuju izmenjeni fenotip sa aspekta brzine rasta i transkripcije gena, u odnosu na dvojnike koji rastu u suspenziji (Donlan i Costerton, 2002).

Mikroorganizmi pokazuju dva „životna stila“. Mogu funkcionisati kao samostalni, jednoćelijski organizmi, što je svojstveno takozvanoj planktonskoj („plivajućoj“ ili slobodno suspendovanoj) populaciji. Na taj način ih je mikrobiologija izučavala decenijama. Danas se zna da mikroorganizmi u svim ekosistemima pretežno žive u višćelijskim, nepokretnim (sesilnim) zajednicama (O’Toole i saradnici, 2000; Caldwell i saradnici, 2002). Smatra se da je ovakav način života bakterija star koliko i same bakterije. Zbog usporenog rasta bakterija u biofilmu, on se razmatra i kao "prirodno stacionarna faza bakterijskog rasta "(López i saradnici, 2010; Lianou i Koutsoumanis, 2012).

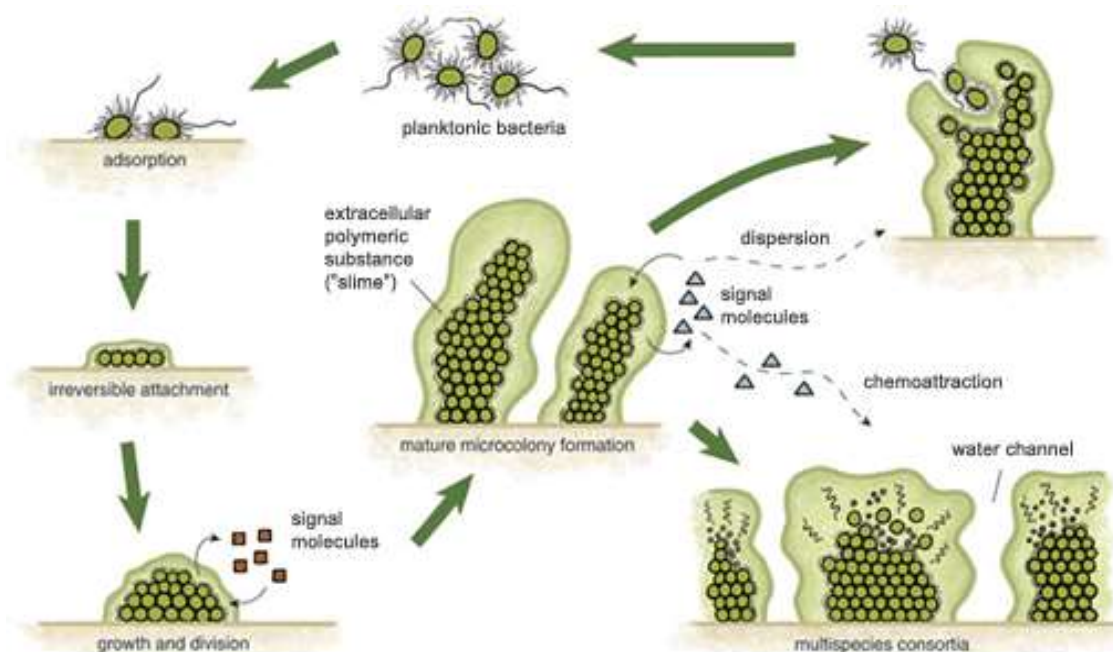
Biofilm ne treba shvatiti kao nepokretnu nakupinu ćelija mikroorganizama, već kao funkcionalnu zajednicu koja jednom kada se formira, demonstrira visoku vrednost životnih aktivnosti (Watnick i Kolter, 2000; Deibel i saradnici, 2003).

2.2.3. Faze formiranja biofilma

Formiranje biofilma rezultat je interakcije ćelija bakterija, površine i raspoloživih hranljivih materija u okruženju (Giaouris i saradnici, 2012).

Formiranje biofilma je složen proces koji se odigrava u nekoliko faza:

1. vezivanje bakterija na površinu (stadijum reverzibilnog i ireverzibilnog vezivanja);
2. formiranje mikrokolonija;
3. sazrevanje (maturacija) biofilma;
4. disperzija ili osipanje zrelog biofilma.



Slika 2.2. Faze formiranja biofilma i disperzija zrelog biofilma (<http://www.becscreen.com/about/about-biofilms>)

2.2.3.1. Vezivanje bakterija za površinu

Prvi korak u formiranju biofilma je susret planktonskog mikroorganizma i površine, što omogućava primarnu adheziju (Golovlev, 2002). Svaka površina za koju se vezuju mikroorganizmi prekrivena je u manjoj ili većoj meri organskim i neorganskim materijama iz okruženja. Ove materije čine takozvani »kondicioni sloj« koji menja izvorne fizičko-hemijske osobine površine i olakšava vezivanje mikroorganizama (Donlan i Costerton, 2002; Milanov i saradnici, 2008; Percival i saradnici, 2011). Kondicioni sloj je za mikroorganizme izvor hranjivih materija i esencijalnih mikroelemenata.

Vezivanje bakterija za površine odigrava se prema dvostepenom modelu koji obuhvata fazu reverzibilnog (adhezija) i ireverzibilnog vezivanja. Adhezija ili prijanjanje je inicijalna, slaba interakcija između planktonskih mikroorganizama i suspodne površine, koja se odigrava unutar 5 do 30 sekundi. Posredovana je *van der Waals-ovim* i elektrostatičkim silama, kao i hidrofobnim interakcijama. U ovoj fazi bakterije pokazuju Braunovo kretanje i lako se uklanjaju sa površine umerenom silom (ispiranjem) (Kumar i Anand, 1998). Ovu primarnu adheziju Dunne (2002) naziva fazom spajanja (*docking stage*). Primarna adhezija bakterija na nežive površine uglavnom je posredovana nespecifičnim interakcijama (hidrofobnost), dok adhezija na živo ili devitalizovano tkivo uključuje specifične molekularne mehanizme vezivanja (lektin, adhezini, ligandi). Elektrostatičke interakcije favorizuju repulziju, zato što većina bakterija i inertnih površina ima negativno površinsko naelektrisanje. Hidrofobne interakcije između površine ćelija i supstrata omogućavaju ćeliji da prevaziđe odbojne sile i ireverzibilno se veže za podlogu (Donlan, 2002; Giaouris i saradnici, 2012).

Faktori koji utiču na prijanjanje i posledično vezivanje bakterija za površinu mogu biti aktivni ili pasivni, zavisno od ćelijske pokretljivosti. Pasivno vezivanje je uslovljeno gravitacionom silom, difuzijom i hidrodinamičkim osobinama vodene sredine, dok na aktivno vezivanje utiču strukture na površini ćelija bakterija, kao što su flagele, pili, adhezini, proteini, lipopolisaharidi i kapsule (Kumar i Anand, 1998; Ukuku i Fett, 2006). Fimbrije imaju važnu ulogu u povećanju hidrofobnosti površine ćelije i olakšavaju vezivanje prevazilaženjem sila elektrostatičkog odbijanja (Rasmussen i saradnici, 2000).

Značaj flagela, fimbrija i pokretljivosti u inicijalnoj fazi formiranja biofilma, dokazana je u genetičkim studijama kod više vrsta bakterija. Genetičku osnovu inicijalne faze formiranja biofilma izučavana je na modelu: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, i *Vibrio cholerae* (Pratt i Kolter, 1998; O'Toole i Kolter, 1998; Watnick i Kolter, 1999). Transpozon mutanti koji nisu bili u stanju da formiraju biofilm, pokazali su u odnosu na divlje tipove da je inicijalna interakcija sa površinom posredovana organelama što su tip IV pila i flagele (Pratt i Kolter, 1998; O'Toole i Kolter, 1998).

Vremenom veza između bakterija i supstrata jača, čineći vezivanje ireverzibilnim procesom. Ta druga faza koju Dunne (2002) naziva i „fazom zaključavanja“ (*locking phase*), a rezultat je produkcije ekstracelularne polimerne supstancije (EPS), glikokaliksa ili matriksa biofilma. Preko EPS-a bakterijsko vezivanje za supstrat uključuje sile kratkog dometa kao što su dipol-dipol interakcije, hidrogenske veze, jonsko i kovalentno vezivanje. Ekstracelularna supstanca je produkt bakterija koji je visoko hidriran. Sadrži 85-95% vode, polisaharide, proteine, fosfolipide, teihoičnu i nuklenske kiseline i druge polimere (Flemming i Wingender, 2010). Većinom je sastavljen od šećera kao što su glukoza, galaktoza, manoza, fruktoza, ramnoza, N-acetilglukozamin i drugi (Poulsen, 1999).

2.2.3.2. Formiranje mikrokolonija

Nakon ireverzibilnog vezivanja bakterijske ćelije dalje rastu i dele se formirajući mikrokolonije, koje se smatraju osnovnim organizacionim jedinicama biofilmova. Mikrokolonije se sastoje od populacija jedne ili više vrsta bakterija u zavisnosti od parametara sredine u kojoj se biofilm formira. U mikrokolonijama, bakterije su međusobno povezane intercelularnim vezama, okružene EPS koja ih povezuje i jača njihovu vezanost za površinu. Budući da je površina mikrookoline izmenjena, „primarni kolonizator“ luči supstance koje privlače druge planktonske bakterije iz okoline (Lappin-Scott i Costerton, 1989; Kumar i Anand, 1998). Neke vrste bakterija nisu sposobne da se vežu za površinu samostalno pa koriste matriks ili površinu drugih bakterija. Za vreme faze formiranja mikrokolonija, povećava se gustina populacije bakterija i otpočinje međusobna komunikacija posredstvom signalnih molekula, koji

omogućavaju sazrevanje biofilma. Mikrokolonije najčešće imaju pečurkast izgled, a svoju maksimalnu veličinu dostižu u fazi maturacije.

2.2.3.3. Sazrevanje (maturacija) biofilma

Kombinacijom rasta bakterija u mikrokolonijama, vezivanjem novih planktonskih ćelija i produkcijom EPS-a, ostvaruje se maturacija ili sazrevanje biofilma. Ako su okolnosti povoljne za rast i aglomeraciju, biofilm se razvija u organizovanu strukturu i smatra zrelim već za 24h.

Rast bakterijskog biofilma limitiran je raspoloživošću hranljivih materija u neposrednoj okolini, perfuzijom ovih sastojaka do ćelija bakterija i uklanjanjem metaboličkih produkata. Drugi faktori koji kontrolišu sazrevanje biofilma uključuju pH, perfuziju kiseonika, izvore ugljenika, hidrodinamiku, osmolaritet, prisustvo specifičnih jona i hranljive materije iz životne sredine i faktore iz biotičke sredine (Milanov i saradnici, 2008).

Kako se rast nastavlja, novostvorene količine ekstracelularnih polisaharida stvaraju barijeru oko ćelija pružajući zaštitu od različitih uticaja iz životne sredine, uključujući UV zračenje, promene pH vrednosti i osmolarnosti, dehidraciju, efektore imunskog sistema, dejstvo antimikrobnih supstanci, uključujući i antibiotike i dezinficijense (Hall-Stoodley i saradnici, 2004; Smirnova i saradnici, 2010; Van Houdt i Michiels, 2010; Nilsson i saradnici, 2011).

Unutrašnjost biofilma je ispresecana vodenim kanalima, raspoređenim ispod i između mikrokolonija. Vodeni kanali se otvaraju na površini i omogućavaju difuziju hranljivih materija i kiseonika, kao i eliminaciju otpadnih produkata (Costerton i saradnici, 1995). U početnoj fazi formiranja biofilma dostupnost kiseonika ne predstavlja ograničavajući faktor, ali u višeslojnom biofilmu pozicija individualnih ćelija određuje njen fiziološki status. Ćelije u gornjim delovima lakše dobijaju hranljive materije i kiseonik i lako se oslobađaju otpadnih produkata metabolizma (Davey i O'Toole, 2000). Fiziološki status ovih ćelija je sličan onom kod planktonskih. Ograničena difuzija hranljivih materija i smanjeni dotok kiseonika u dubljim delovima biofilma, stvaraju zonu anaerobnih uslova (Poulsen, 1999). Raspoloživost kiseonika i hranljivih materija utiče na prostorni raspored i uslove života zajednice aerobnih i anaerobnih bakterija u jednom biofilmu.

Biofilmovi sastavljeni od zajednica više bakterijskih vrsta, često su deblji i stabilniji od biofilma jedne bakterijske vrste. Upravo, biofilm sastavljen od jedne vrste bakterija, praktično je nemoguć u prirodnom okruženju. U zavisnosti od vrste bakterija, fizičko-hemijskih faktora i raspoloživosti hranljivih materija, definisana su tri različita strukturna modela biofilma (Costerton i saradnici, 1995). Najjednostavniji biofilmovi nastaju na zubnim površinama (dentalni plak) u uslovima visoke koncentracije hraniva, međusobne kooperacije različitih vrsta bakterija, u vidu jednolične prevlake vanćelijskog polimera u kome su bakterije različito raspoređene. Biofilmovi nastali na zidovima vodovodnih cevi u uslovima niske koncentracije hranljivih sastojaka, predstavljaju drugi razvojni model. Ovi biofilmovi se sastoje od mestimično razvijenih agregata EPS sa bakterijama koje se izdižu iz ravni tanke, jednolične prevlake. Treći model, oblika pečurke razvija se u uslovima stalne visoke koncentracije hranljivih sastojaka i smatra se najčešćim tipom biofilma. Ovaj model nastaje rastom mikrokolonija koje formiraju pečurkaste strukture, a unutrašnjost je ispresecana vodenim kanalima koji dopremaju organske i neorganske materije iz okoline i odnose metaboličke produkte. Ovaj tip se najčešće javlja u prirodi, i pored više vrsta bakterija, uobičajeno sadrži i protozoe, alge i druge vrste mikroorganizama.

Formiranje biofilma je prilično spor proces u prirodnim uslovima. Procenjuje se kao zreo uobičajeno nakon nekoliko dana, kada dostiže debljinu od nekoliko milimetara (Stoodley i saradnici, 2002; Melo i saradnici, 1992).

2.2.4. Disperzija ili osipanje zrelog biofilma

Nakon procesa maturacije, biofilm podleže disperziji ili osipanju. Sazrevanje i disperzija biofilma su međusobno zavisni procesi i stopa disperzije se povećava sa rastom biofilma. Disperzija nastaje kao odgovor na izmenjene uslove životne sredine, izazvane nedostatkom hranljivih materija i kiseonika, promenama pH vrednosti i temperature, akumulacijom otpadnih produkata metabolizma ili drugim nepovoljnim uticajima (Solano i saradnici, 2014; Kaplan, 2010). Mehanizam disperzije može biti aktivan (iniciran od samih bakterijskih ćelija) ili pasivan (posredovan silama trenja, abrazijom, ljudskim faktorima) (Weeb, 2008; Kaplan, 2010).

Disperzija biofilma može se odvijati putem erozije, odlublivanja, rasejavanja i abrazije (Stoodley i saradnici, 2001a; Kaplan, 2010; Sheffield i Crippen, 2012). Erozijska

predstavlja kontinuirano odvajanje pojedinačnih ćelija ili manjih agregata biofilma (Kaplan, 2010). Stopa erozije biofilma raste sa povećanjem debljine biofilma i pri povećanom dejstvu sila trenja. Odlubljivanje podrazumeva otkidanje većih delova biofilma. Smatra se da najčešće nastaje kao posledica nedostatka hranljivih materija i kiseonika (Stoodley i saradnici, 2001b; Kaplan, 2010). Istraživanja koja su izvedena na modelu bakterije *Serratia marcescens*, dokazala su ulogu međućelijskih signalnih molekula u procesu odlubljivanja. (Rice i saradnici, 2005). Proces rasejavanja karakteriše brzo odvajanje velikog broja pojedinačnih ćelija ili manjih agregata iz unutrašnjosti biofilma (Kaplan, 2010). Do erozije i odlubljivanja najčešće dolazi kada lokalne sile trenja nadvladaju kohezione sile koje učvršćuju biofilm. Erozijski i odlubljivački procesi mogu biti aktivni i pasivni procesi, dok je rasejavanje uvek aktivan proces (Kaplan, 2010). Pod abrazijom se podrazumeva gubitak biofilma pokrenut sudarima čestica iz okolne tečnosti koja okružuje biofilm (Sheffield i Crippen, 2012).

U fazi disperzije dolazi do otkidanja i odvajanja pojedinih delova mikrokolonija i kolonizacije novih, udaljenih površina. Odvajanje delova biofilma nastaje zbog aktivne promene strukture biofilma tokom vremena, te bakterije mogu opet postati pokretne i preći iz jedne mikrokolonije na drugu, zbog čega dolazi do slabljenja veza između mikrokolonija i do disperzije biofilma (Tolker-Nielsen i saradnici, 2000).

Procesi uključeni u formiranje biofilma i njegovu disperziju su veoma složeni i dinamični, obuhvataju širok spektar biohemijskih, ekoloških i fizičkih mehanizama kao i aktivaciju signalnih transdukcionih puteva (Kaplan, 2010). Produkcija ekstracelularnih enzima koji razgrađuju adhezivne komponente biofilm matriksa, litička aktivacija bakteriofaga, ekspresija fosfodiesteraza i “quorum sensing” signali spadaju u biohemijske faktore koji su uključeni u disperziju biofilma. Ekološki faktori koji su uključeni u procese disperzije podrazumevaju ograničenje hranljivih materija, akumulaciju metabolita, promenu osmolarnosti i visoku stopu rasta, dok sile trenja nastale kontinuiranim protokom tečnosti, predstavljaju najčešći faktor fizičke prirode (Weeb, 2008; Kaplan, 2010).

Uloga enzima u procesu disperzije biofilmova dobro je proučena kod vrste *Pseudomonas* (Sauer i saradnici, 2002). Kao odgovor na gladovanje, ćelije *Pseudomonas fluorescens* proizvode enzim, egzopolisaharid liazu, koja omogućava disperziju (Allison i saradnici, 1998), dok *Pseudomonas aeruginosa* proizvode enzim

alginate liazu koji razgrađuje polisaharid biofilma alginat (polimer manuronske i glukuronske kiseline) (Ott i saradnici, 2001; Kaplan, 2010). Takođe, jedan od dobro proučenih matiks razgrađujućih enzima je disperzin B koji je ustanovljen kod vrste *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kaplan i saradnici, 2003). Disperzin B razgrađuje poli-N-acetilglukozamin, polisaharid matriksa biofilma. Na taj način omogućeno je bakterijama da koriste matriks kao izvor hranljivih materija, kao i oslobađanje bakterija iz biofilma i njihovu „potragu“ za nišama sa boljim uslovima za život, što je od ključnog značaja za dugotrajan opstanak (Kaplan, 2010).

2.2.5. Quorum sensing

Međucelijska signalizacija (“Quorum sensing”- QS) opisuje mehanizam intercelularne komunikacije kojom bakterije mogu da izmene ponašanje grupe u skladu sa gustinom naseljenosti (Parsek i Greenberg, 2005; Paul, 2007; Giaouris i saradnici, 2012; Solano i saradnici, 2014). Ovaj proces zavisi od sinteze i difuzije signalnih molekula, tzv. “autoinducera” (AI). Pri niskoj gustini ćelija signalni molekuli nalaze na bazalnom nivou, dok se koncentracija signalnih molekula povećava sa povećanjem gustine populacije ćelija (Kjelleberg i Molin, 2002; Kaplan, 2010). Signalni molekuli ili autoinduceri (AI) slobodno difunduju kroz ćelijsku membranu i između ćelija, pri čemu je njihova koncentracija u ekstracelularnoj sredini dovoljna za pokretanje odgovora na visoku gustinu populacije tj. „*quorum sensing*“ (Paul, 2007; Solano i saradnici, 2014). Nakon postizanja koncentracionog praga, autoinduceri se vraćaju nazad u ćeliju difuzijom ili vezivanjem za specifične receptore što dovodi do pokretanja niza kaskadnih reakcija koje omogućavaju koordinisanu ekspresiju ili represiju odgovarajućih setova gena cele populacije (Kjelleberg i Molin, 2002; Paul, 2007). Pojava intercelularne komunikacije (QS) prvi put je otkrivena početkom sedamdesetih godina prošlog veka kod Gram-negativne morske svetleće bakterije *Vibrio fischeri* kao mehanizam koji pokreće bioluminiscenciju (Kjelleberg i Molin, 2002; Waters i Bassler, 2005; Paul, 2007). Istraživanja u oblasti intercelularne komunikacije otkrila su postojanje velikog broja signalnih molekula.

“*Quorum sensing*” (QS) se smatra ključnim procesom u regulaciji ekspresije gena odgovornih za različite fiziološke aktivnosti poput kretanja, sporulacije, bioluminiscencije, produkcije antimikrobnih peptida, ekspresije faktora virulencije, rasta i sazrevanja biofilma (Miller i Bassler, 2001; Waters i Bassler, 2005; Ng i Bassler, 2009;

Giaouris i saradnici, 2012; Monnet i Gardan, 2015). Kako “*quorum sensing*” zavisi od gustine populacije, on se ne javlja u fazi inicijalne adhezije već u fazi formiranja mikrokolonija u kojoj dolazi do deobe bakterija i povećanja gustine populacije, dostižući dovoljan nivo za aktiviranje faze sazrevanja i osipanja biofilma na koordinisan način (Hall-Stoodley i saradnici, 2004; Solano i saradnici, 2014). QS i autoinduceri (AI) su ključni u fiziologiji biofilma (Kjelleberg i Molin, 2002; Parsek i Greenberg, 2005).

Signalni molekuli (AI) su po hemijskoj strukturi raznovrsni. Većina QS signala su organski molekuli male molekulske težine ili peptidi sastavljeni od 5-20 aminokiselina (Paul, 2007; Solano i saradnici, 2014). Do sada su detaljno opisane četiri vrste signalnih molekula: N - acil-homoserin lakton (AHL) ili autoinducer-1 (AI-1) kod Gram-negativnih bakterija, autoinducerski polipeptidi (AI-P) kod Gram-pozitivnih bakterija, furanozil bor diestar ili autoinducer-2 (AI-2) kod Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija i autoinducer-3/epinefrin/norepinefrin (AI-3/epi/norepi) kod nekih vrsta enterobakterija (Schauder i saradnici, 2001; Parsek i Fuqua, 2004; Waters i Bassler, 2005; Giaouris i saradnici, 2012).

a) međucelijska signalizacija kod Gram-negativnih bakterija

Gram-negativne bakterije sintetišu i luče molekule iz porodice neesencijalnih aminokiselina N-acil-homoserin lakton (AHL) ili autoinducer-1(AI-1). Sistem koji je predložen kod *V. fischeri* sastoji se od regulatornog i strukturnog operona (luxR i luxICDABEG). Transkripcijom luxI gena nastaje autoinducer sintaza (luxI ili I-protein) ili enzim koji sintetise N-acil-homoserin laktone, dok transkripcijom regulatornog operona luxR nastaje receptorski protein luxR ili R-protein. Vezivanjem R-proteina sa autoinducerom nastaje aktivan kompleks koji se vezuje za DNA regiju blisku početnom mestu transkripcije strukturnog operona, i povećava afinitet RNA-polimeraze prema njegovom promotoru (Miller i Bassle, 2001, Boyen i saradnici, 2009). Do danas su opisana tri QS sistema identifikovana kod *S. enterica* koji su uključeni u regulaciju virulencije (SdiA, luxS/AI-2 i AI-3/ epinefrin/norepinefrin signalni sistem) (Boyen i saradnici, 2009; Walters i Sperandio, 2006). *Salmonelle* ne poseduju luxI gen i ne sintetišu AHL, međutim pomoću SdiA otkrivaju produkciju AHL kod različitih vrsta bakterija, što ukazuje da SdiA može da se koristi u komunikaciji između različitih vrsta bakterija unutar biofilma (Smith i Ahmer, 2003; Giaouris i saradnici, 2012).

b) međućelijska signalizacija kod Gram-pozitivnih bakterija

Gram-pozitivne bakterije kao signalne molekule koriste oligopeptide, koji nastaju direktnom transkripcijom ili posttranskripcijskom obradom većih polipeptida posle čega se izlučuju iz ćelije. Delovanje oligopeptidnih molekula je uglavnom ekstracelularno, mada neke regulacije ekspresije gena sprovode intracelularno, odolevajući razgradnji od strane ćelijskih peptidaza. Ekstracelularno delovanje oligopeptida na ekspresiju gena odvija se putem dvokomponentnog sistema sastavljenog od histidinske kinaze (membranska komponenta) i regulatornog proteina (citoplazmatska komponenta) (Waters i Bassler, 2005).

Pojedine Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije proizvode molekul (S)-4,5-dihidroksi-2,3-pentandion, koji se smatra zajedničkim autoinducerskim molekulom (AI-2), pomoću kojeg komuniciraju sa drugim vrstama bakterija. AI-2 omogućava komunikaciju između različitih vrsta bakterija (interspecijes komunikacija), reguliše sintezu faktora virulencije i proces formiranja biofilma. Prvi put je otkriven i opisan kod morske bakterije *Vibrio harveyi* (Miller i Bassler, 2001; Waters i Bassler, 2005; Boyen i saradnici, 2009). Gen *luxS* *Vibrio harveyi* kodira enzim sintazu koji proizvodi autoinduktor-2. Geni sličnih sekvenci su identifikovani i kod drugih Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija (DeKeersmaecker i Vanderleyden, 2003).

2.2.6. Ekstracelularna polimerna supstanca (EPS) ili matriks biofilma

Sinteza ekstracelularnog matriksa je indukovana nakon vezivanja bakterija za površinu (Danese i saradnici, 2000), predstavljajući osnovni preduslov za formiranje biofilma. Ekstracelularni matriks doprinosi jačanju vezanosti bakterija za površinu, i formiranju trodimenzionalne strukture biofilmova Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Danese i saradnici, 2000; Flemming i Wingender, 2010).

Ekstracelularni matriks je kompleksna i ključna komponenta biofilmova koja obezbeđuje stabilnost i strukturu biofilma. U većini biofilmova, matriks je glavna komponenta koja čini 90% mase biofilma, a mikroorganizmi predstavljaju manje od 10%. EPS je vanćelijski materijal, proizveden od mikroorganizama. Sastoji se od različitih vrsta polimera. EPS je prvobitno označen kao „ekstracelularni polisaharid” ali je ime promenjeno, kada je postalo jasno da matriks sadrži i proteine, nukleinske kiseline, lipide i ostale biopolimere. Matriks biofilma je visoko hidrirana supstanca.

Sastav EPS zavisi od vrste mikroorganizama, temperature i dostupnosti hranjivih materija (Flemming i Wingender, 2002).

Kako se biofilmovi nalaze u gotovo svakom okruženju, prirodnom i veštačkom, teško je generalizovati njihovu strukturu i fiziološke aktivnosti. Struktura matiksa biofilma je rezultat kombinacije unutrašnjih faktora kao što je genotip ćelija mikroorganizama i spoljašnjih faktora koji uključuju fizičko-hemijske faktore okruženja (Sutherland, 2001). Zato se matriks biofilma koji je proizvod identičnih mikroorganizama, u velikoj meri razlikuje po sastavu i fizičkim osobinama. Na sastav matriksa utiču različiti procesi, kao što su: aktivacija sekrecije biopolimera i enzima, lipopolisaharidi, liza ćelija i adsorpcija makromolekula iz okruženja. EPS-takođe može poslužiti kao izvor hranjivih sastojaka za mikroorganizme u biofilmu. Pojedine komponente EPS su biorazgradive, a potpuna degradacija svih komponenti zahteva širok spektar enzima (Flemming i Wingender, 2010). Različiti enzimi su uključeni u razgradnju EPS: hidrolaze, liaze, glikozidaze, esteraze i drugi enzimi koji se u izobilju nalaze u biofilmu kao ekstracelularni proteini. Većina ovih enzima je integralni deo matriksa biofilma čija je uloga, između ostalog i da oslobode ćelije iz biofilm zajednice (Allison, 2003).

Veliki broj egzopolimera i njihovih funkcija koji su sastavni deo EPS-a, još uvek nije ispitana u potpunosti. Neke od utvrđenih funkcija EPS-a prikazane su u Tabeli 2.3.

Tabela 2.3. Funkcije ekstracelularnog matriksa u bakterijskom biofilmu (Flemming i Wingender, 2010).

Funkcija	Značaj za biofilm	Komponenta EPS
Adhezija	Omogućava inicijalnu adheziju planktonskih ćelija na abiotičke i biotičke površine i dugotrajnu adheziju biofilma za površinu	Polisaharidi, proteini, DNA
Agregacija bakterijskih ćelija	Omogućava vezivanje između ćelija, privremenu imobilizaciju bakterijske populacije, povećanje gustine ćelija, ćelija-ćelija prepoznavanje	Polisaharidi, proteini, DNA
Kohezija biofilma	Formira i hidrira matriks biofilma, uslovljava mehaničku stabilnost biofilma (često sa multivalentnim katjonima) i posredstvom strukture EPS određuje arhitekturu biofilma	Neutralni i naelektrisani polisaharidi, proteini (kao što su amiloidi i lektin) i DNA
Retencija vode	Održava hidriranost mikrookoline, što omogućava toleranciju biofilma na isušivanje	Hidrofilni polisaharidi, moguće i proteini
Zaštitna barijera	Obezbeđuje rezistenciju na ćelije imunog odgovora i različite antimikrobne agense	Polisaharidi i proteini
Apsorpcija organskih molekula	Omogućava akumulaciju hranljivih materija iz spoljašnje sredine i apsorpciju ksenobiotika (čime doprinosi detoksikaciji sredine)	Hidrofobni polisaharidi i proteini
Apsorpcija neorganskih jona	Obezbeđuje formiranje polisaharidnog gela, izmenu jona, formiranje minerala i akumulaciju jona teških metala (čime doprinosi detoksikaciji sredine)	Polisaharidi, proteini uključujući neorganske supstituente kao što su sulfat i fosfat
Enzimaska aktivnost	Obezbeđuje razgradnju egzogenih makromolekula radi stvaranja hranljivih materija, degradaciju strukturnih komponenti EPS-a u cilju oslobađanja ćelija iz biofilma	Proteini
Izvor hranljivih materija	Obezbeđuje izvor C, N i P	Potencijalno sve komponente EPS-a
Razmena genetskog materijala	Olakšava horizontalni transfer gena između ćelija u biofilmu	DNA
Donor/acceptor elektrona	Omogućava redoks aktivnost u matriksu biofilma	Proteini (koji formiraju pile)
Eksport ćelijskih komponenti	Otpuštanje ćelijskih komponenti kao rezultat metaboličkog obrta	Membranske vezikule sa nukleinskim kiselinama, enzimi, lipopolisaharidi i fosfolipidi
Depo viška energija	Skladišti višak ugljenika pri neuravnoteženom odnosu C/N	Polisaharidi
Vezivanje enzima	Akumulacija, zadržavanje i stabilizacija enzima kroz njihovu interakciju sa polisaharidima	Polisaharidi i enzimi

Ekstracelularna polimerna supstanca ili matriks biofilma imobilizira bakterijske ćelije držeći ih u neposrednoj blizini omogućavajući na taj način brojne interakcije između ćelija uključujući intercelularnu komunikaciju i formiranje ćelijskih agregata (mikrokolonija). Formiranje i održavanje multićelijskih zajednica, odnosno strukture biofilma zavisi od produkcije, količine i sastava EPS. Morfologija biofilma može biti hrapava, glatka, vazdušasta i filamentozna sa različitim stepenima poroznosti. Biofilmovi, takođe mogu imati izgled pečurkastih struktura sa brojnim porama i ispresecanim intersticijalnim vodenim kanalima. Na strukturu biofilma, osim sastava matriksa, utiču hidrodinamički uslovi sredine, koncentracija hranljivih materija, pokretljivost bakterija i intercelularna komunikacija (Flemming i Wingender, 2010).

Egzopolisaharidi su neophodni za formiranje biofilma. Istraživanja su pokazala da sojevi bakterija koji su putem mutacija izgubili sposobnost sinteze egzopolisaharida mogu adherirati za površine i formirati agregate (mikrokolonije), ali ne dostižu stadijum zrelog biofilma.

Donlan (2002) je ustanovio da EPS može da varira u hemijskim i fizičkim svojstvima, iako je prvenstveno sastavljen od polisaharida. Neki od ovih polisaharida su neutralni ili polianjoni, kao što je slučaj sa EPS-om Gram-negativnih bakterija. Prisustvo uronske kiseline (kao što je D-glukuronska, D-galakturonska, i manuronska kiselina) ili ketal-vezanih piruvata, predstavlja anjonsko svojstvo (Sutherland, 2001; Donlan, 2002). Ovo svojstvo je važno jer omogućava udruženje dvovalentnih katjona kao što su kalcijum i magnezijum, koji su pokazali unakrsnu vezu sa polimernim lancima i pružaju veću snagu vezivanja u razvijenom sloju (Flemming i saradnici, 2000; Donlan, 2002). EPS takođe se može povezati sa jonima metala, dvovalentnim katjonima, drugim makromolekulima kao što su proteini, DNK, lipidi (Flemming i saradnici, 2000).

Matriks biofilma ima i protektivnu ulogu i štiti bakterije od isušivanja, dejstva biocida, antibiotika, teških metala, UV zračenja, i efektora imunskog sistema (Flemming i Wingender, 2010).

2.2.7. Ključne komponente matriksa biofilma *Salmonella* spp. i njihova genetska regulacija

Sinteza ekstracelularne supstance ili matriksa biofilma je osnovni preduslov za formiranje i održavanje višćelijskih zajednica (Zogaj i saradnici, 2001; Solano i saradnici, 2002; Donlan, 2002; Flemming i Wingender, 2010; Steenackers i saradnici, 2012).

Ekstracelularni matriks biofilma *Salmonella* sastoji se od proteinske (fimbrije i BapA protein) frakcije i egzopolisaharidne (celuloza, O-kapsularni antigen, kolanska kiselina i drugih polisaharida (lipopolisaharid, kapsularni polisaharidi) frakcije. Sinteza strukturnih komponenti ekstracelularnog matriksa nalazi se pod kontrolom složenih molekularnih mehanizama (Steenackers i saradnici, 2012).

Proteinska frakcija matriksa biofilma *Salmonella*

Proteinska frakcija matriksa biofilma *Salmonella* je sačinjena od fimbrija (ranije nazvane tanke agregativne fimbrije-*tafi*, ili noviji naziv eng. *curli*) i BapA protein (*biofilm-associated protein*) (Steenackers i saradnici, 2012; Giaouris i saradnici, 2012).

Curli-fimbrije su amiloidni površinski proteini ćelije koji su uključeni u adheziju za biotske i abiotske površine, ranu međućelijsku agregaciju, perzistenciju u spoljašnjoj sredini i formiranje biofilma (Austin i saradnici, 1998; White i saradnici, 2006; Giaouris i saradnici, 2012). Tanke agregativne fimbrije se nalaze preko cele površine ćelije bakterija, kao fine dlačice dimenzija od 2 do 7 nm (Collinson i saradnici, 1991). Naziv fimbrija potiče od specifičnog proteina *curlina* od kojeg su građene. Sinteza tankih agregativnih fimbrija je pod kontrolom kompleksnog regulatornog sistema. LuxR regulator CsgD proteina stimuliše produkciju fimbrija putem transkripcione aktivacije *csg* (*curli subunit genes*) gena (prethodno nazvan *agf* gen) uključenih u biosintezu fimbrija i organizovanih u dva divergentna operona *csgBAC* i *csgAFG* (Römling i saradnici, 1998a; Römling i saradnici, 1998b; Römling i saradnici, 2000; Gerstel i Römling, 2003; Zogaj i saradnici, 2003; Giaouris i saradnici, 2012). Interakcija različitih uticaja biotičkog okruženja, kao što su vrednost temperature, pH, koncentracija kiseonika, osmolarnost, raspoloživost hranljivih materija utiču na ekspresiju transkripcionog regulatora CsgD koji reguliše produkciju fimbrija i celuloze, preko transkripcione aktivacije odgovornih gena (Gerstel i Römling, 2003). White i saradnici (2003) i Gibson i saradnici (2006) su istakli da u prirodnom stanju, fimbrije

postoje kao kompleks sa celulozom i O-kapsularnim antigenom, i fizički povezuje ćelije u zajednicu.

Pored fimbija, važnu proteinsku komponentu ekstracelularnog matriksa čini veliki površinski protein ćelije BapA (*biofilm-associated protein*) za koji je pokazano da ima važnu ulogu u formiranju biofilma *S. Enteritidis* (Latasa i saradnici, 2005; Giaouris i saradnici, 2012). Ovaj protein je slabo povezan sa ćelijskom površinom, luči se kroz sekretorni sistem BapBCD *type I* protein, koji je kodiran *bapABCD* operonom. Ekspresija BapA je usklađena sa kordinisanom ekspresijom fimbrija (curli) i celuloze kroz aktivaciju *csgD* (Latasa i saradnici, 2005; Giaouris i saradnici, 2012). Jonas i saradnici (2007) su pokazali, primenom atomske mikroskopije sila (*atomic force microscopy* - AFM), da ovaj protein ima uticaj na morfologiju biofilma, ali ne veći u poređenju sa celulozom i fimbrijama.

Egzopolisaharidna frakcija matriksa biofilma *Salmonella* spp.

Egzopolisaharidnu frakciju matriksa biofilma čine celuloza, O-kapsularni antigen, kolanska kiselina i ostali polisaharidi (kapsularni polisaharidi, lipopolisaharidi i drugi).

Celuloza (β -1 \rightarrow 4-D-glukozni polimer) se smatra najvažnijom polisaharidnom komponentom matriksa biofilma *Salmonella*. Tokom proteklih decenija sposobnost biosinteze celuloze dokazana je kod *Escherichia coli* (Serra i saradnici, 2013), *S. Typhimurium* (Anriany i saradnici, 2006), *S. Enteritidis* (Solano i saradnici, 2002) i dr., i uglavnom je udružena sa sposobnošću mikroorganizama da formiraju biofilm.

Celuloza je sastavni deo ćelijskog zida biljaka a kod bakterija predstavlja ekstracelularni produkt koji štiti bakteriju od različitih hemijskih i mehaničkih uticaja (Vestby i saradnici, 2009b). Nedostatak celuloze ne utiče na virulenciju *S. Enteritidis*, ali povećava osetljivost na tretmane hlorom, što ukazuje da je formiranje biofilma, važan faktor za opstanku *Salmonella* spp. na različitim površinama (Solano i saradnici, 2002).

Sinteza celuloze koja je sastavni deo EPS *Salmonella* spp., odvija se pod kontrolom dva genetska operona *bcs* (*bacterial cellulose synthesis*), označenih sa *bcsABZC* i *bcsEFG* (Solano i saradnici, 2002). Produkcija celuloze je indirektno regulisana preko ekspresije AdrA proteina koji je član GGDEF familije proteina koja je

takođe regulisana preko CsgD proteina (Römling i saradnici, 2000; Solano i saradnici, 2002). AdrA kodira gen za diguanilat ciklazu koja je uključena u sintezu c-di-GMP, koji je efektorni molekul za aktivaciju sinteze celuloze vezivanjem za *bcsB* (Römling, 2005; Jonas i saradnici, 2007). Za sintezu celuloze u biofilmu *S. Typhimurium* od ključnog značaja je operon *bcsABZC* (Zogaj i saradnici, 2001). I operon *bcsEFG* je takođe odgovoran za biosintezu celuloze kod *Salmonella* serovarijeteta *Enteritidis* i *Typhimurium* (Solano i saradnici, 2002).

Uloga celuloze u formiranju biofilma na kulturi HEP-2 ćelija i pilećem crevnom epitelu dokazana je na modelu mutanog soja *S. Typhimurium* bez *bcsB* (Ledeboer i Jones, 2005; Ledeboer i saradnici, 2006). Celuloza je važna za vezivanje *S. Enteritidis* i *S. Newport* za izdanake lucerke (Barak i saradnici, 2007) i jestive delove lista peršuna (Lapidot i Yaron, 2009).

Među izolatima *S. Agona* i *S. Typhimurium*, je primećeno da i najmanje količine celuloze doprinose organizaciji strukture matriksa (Vestby i saradnici, 2009a). Celuloza nije od presudnog značaja u formiranju biofilma *S. Enteritidis* na polistirenu (što je dokazano u oglecima sa *bcsA* mutantnim sojem), jer su i druge polisaharidne komponente (kapsularni polisaharidi i lipopolisaharidi) uključene u formiranje biofilma (Malcova i saradnici, 2009).

Kolanska kiselina, kapsularni ekstracelularni polisaharid se proizvodi u kontinuitetu u malim količinama, a produkcija veće količine ovog egzopolisaharida doprinosi preživljavanju u nepovoljnim fizičko-hemijskim uslovima sredine. Strukturu ovog polisaharida čine ponavljajuće subjedinice D-glukoze, D-fruktoze, D-galaktoze i D-glukuronske kiselina sa bočnim lancima piruvata i O-acetila (Ledeboer i Jones, 2005; Wang i saradnici, 2013a). Do sinteze kolanske kiseline ne dolazi na temperaturama iznad 30°C u standardnim laboratorijskim podlogama (Wang i saradnici, 2013a). Proizvodnja kolanske kiseline nije neophodna za početno vezivanje bakterija, već je potrebna za razvoj višćelijske zajednice na abiotskim površinama (Danese i saradnici, 2000). Solano i saradnici, (2002) su svojim istraživanjima potvrdili značaj kolanske kiseline u formiranju pelikule.

Celuloza, fimbrije i O-kapsularni antigen, doprinose kolonizaciji biljaka i opstanku *Salmonella* spp. izvan organizma domaćina (Barak i saradnici, 2007; Gibson i

saradnici, 2006). O-kapsularni antigen omogućava dugotrajno preživljavanje u uslovima isušivanja (Gibson i saradnici, 2006; Steenackers i saradnici, 2012).

Kapsularni polisaharidi sačinjeni su od ponavljajućeg niza jedinica glukoze, manoze i u manjoj meri galaktoze. Ustanovljeni su u matriksu multiplorezistentnog soja *S. Typhimurium* DT104 (de Rezende i saradnici, 2005; Giaouris i saradnici, 2012). Međutim, drugi kapsulirani polisaharidi mogu biti prisutni u ekstracelularnom matriksu *Salmonella* sojeva (de Rezende i saradnici, 2005; Gibson i saradnici, 2006; White i saradnici, 2003), a tačan sastav zavisi od uslova okruženja u kojima se formira biofilm (Prouty i Gunn, 2003).

Malcova i saradnici (2008) su potvrdili značaj kapsularnih polisaharida u formiranju biofilma kod sojeva koji ne produkuju *curli* ili celulozu, a koje karakteriše formiranje glatkih, braon i mukoidnih kolonija (SBAM morfotip) na Congo red agaru.

2.2.8. Fenotip *Salmonella* spp. u višećelijskim zajednicama

Mehanizmi koje *Salmonella* spp. aktiviraju za preživljavanje izvan organizama domaćina uslovljeni su višećelijskim obrascima ponašanja koji nastaju kao rezultat ekspresije specifičnih gena i sinteze produkata koje ovi geni kodiraju. Produkcija *curli* fimbrija i celuloze smatra se ključnom za preživljavanje *Salmonella* u okruženju, (Solomon i saradnici, 2005; Jonas i saradnici, 2006), a u *in vitro* uslovima uobičajeno se ustanovljava kultivacijom izolata na agaru uz dodatak diazo boje kongo crveno (Congo Red) i brilijnt plavo (Comassie brilliant blue) i identifikacijom specifičnih morfotipova kolonija.

Kongo crveno je nespecifična diazo boja sa karakterističnim spektrofotometrijskim osobinama. Spektar apsorbaneci ove boje se razlikuje u zavisnosti da li je boja vezana za tanke agregativne fimbrije ili celulozu, omogućavajući detekciju obe komponente kada su prisutne pojedinačno ili u kombinaciji, dok je brilijant plava ograničena na apsorpciju samo od strane proteinskih komponenti matriksa biofilma (tanke agregativne fimbrije).

Sojevi *Salmonella* koji imaju sposobnost produkcije tankih agregativnih fimbrija i celuloze, formiraju na agaru uz dodatak boje Congo red i Brilliant blue karakteristične crvene, suve i naborane kolonije R-forme (*red, dry and rough* - RDAR) (Slika 2.4.). RDAR morfotip se koristi kao sinonim za zajednice bakterija koje odlikuje sposobnost

produkcije biofilma na abiotskim površinama (Römling, 2005). Produkcija curli fimbrija i biosinteza celuloze su uvek u korelaciji sa RDAR morfotipom i veliki broj istraživanja svedoči o kompleksnoj regulatornoj mreži formiranja RDAR morfotipa (Römling i saradnici, 1998a, Römling i saradnici, 2000; Römling i saradnici, 2003; Zogaj i saradnici, 2003; Davidson i saradnici, 2008; Giaouris i saradnici, 2012).

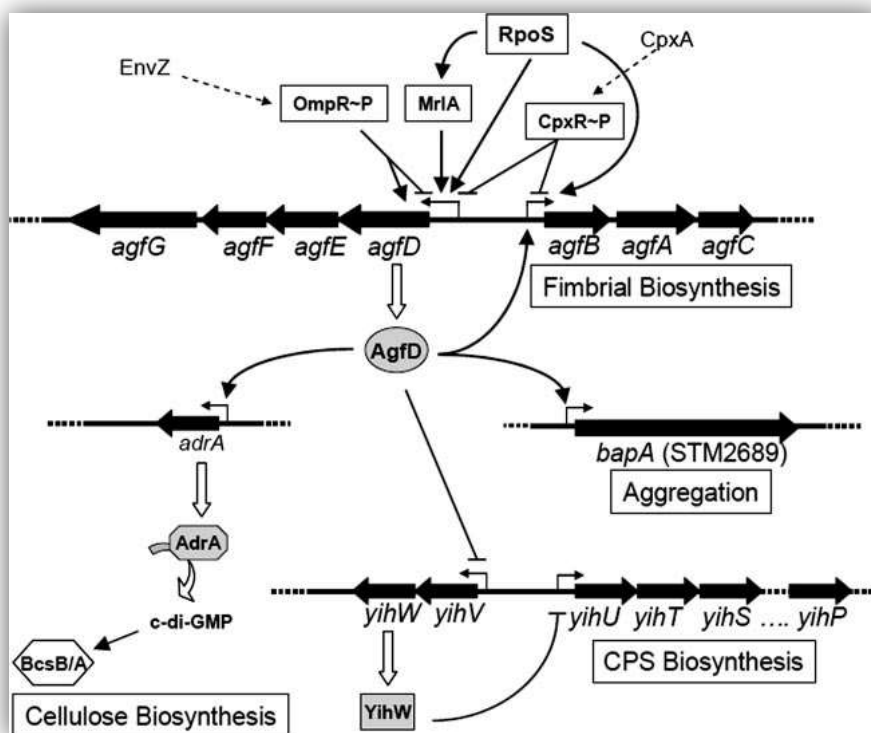
Regulacija formiranja RDAR morfotipa počinje transkripcijom dvokomponentnog regulatornog sistema EnvZ- ompR, koji aktivira ekspresiju *csg* gena (*curli subunit genes*) koji su uključeni u biosintezu curli fimbrija i organizovani u dva divergentna operona *csgBAC* i *csgAFG* (Slika 2.3.) (Zogaj i saradnici, 2003; White i Surette, 2006; Giaouris i saradnici, 2012). U uslovima niske osmolarnosti, javlja se smanjen nivo aktivnog regulatora fosforilisanog ompR, zbog smanjene kinaze/fosfataze odnosno EnvZ (Prigent-Combaret i saradnici, 2001), što ukazuje da sa porastom osmolarnosti dolazi do povećanja *csgD* transkripcije i curli sinteze. U formiranje tankih agregativnih fimbrija uključena je kompleksna regulatorna mreža u kojoj LuxR regulator CsgD proteina aktivira sintezu produkcije fimbrija putem transkripcione aktivacije operona *csgBAC* koji kodira strukturne gene neophodne za formiranje tankih agregativnih fimbrija (Römling i saradnici, 2000; Gerstel i Römling, 2003). Ekspresija *csgD* je inicirana krajem eksponencijalne faze i na početku stacionarne faze rasta, što rezultira inicijalnom transkripcijom ostalih gena odgovornih za biosintezu fimbrija i drugih regulatornih gena, uključujući ekspresiju *AdrA* (*agfD-dependent regulator-csgD*) proteina koji je uključen u regulisanje biosinteze celuloze (Römling i saradnici, 2000; Römling, 2005; Simm i saradnici, 2007; Davidson i saradnici, 2008). Gen *csgD* indirektnim delovanjem utiče na proizvodnju celuloze aktiviranjem transkripcionog proteina *AdrA* čija je ekspresija neophodna za sintezu celuloze, mada se sinteza celuloze odvija pod kontrolom dva genetska operona *bcs* (*bacterial cellulose synthase*), označena kao *bcsABZC* i *bcsEFG*, čija je sinteza takođe regulisana preko *csgD* (Römling i saradnici, 2000; Zogaj i saradnici, 2001; Solano i saradnici, 2002). Aktivacija gena *csgD* kontroliše kompleksnu regulatornu kaskadu koja dovodi do povećanja intracelularnog nivoa (3'-5') cikličnog di-guanilat monofosfat (c-di-GMP), sekundarnog signalnog molekula kod *S. Typhimurium* kao aktivatora sinteze celuloze (Kader i saradnici, 2006; White i saradnici, 2010). Gen *csgD* direktno kontroliše ekspresiju transkripcionog regulatora *csgBAC* koji kodira *curli* strukturne proteine, a indirektno

aktivira proizvodnju c-di-GMP i AdrA koji aktiviraju proizvodnju celuloze (Gerstel i Römling, 2003; White i saradnici, 2010; Grantcharova i saradnici, 2010).

AdrA protein je član GGDEF familije proteina i kodira gene za di-guanilat ciklazu koja je uključena u sintezu c-di-GMP (Römling, 2005; Simm i saradnici, 2007; Davidson i saradnici, 2008, Jonas i saradnici, 2008; Jonas i saradnici, 2010). Sinteza celuloze delimično je regulisana intracelularnom koncentracijom efektornog molekula c-di-GMP koji aktivira sintezu celuloze vezivanjem za bcsB (Zogaj i saradnici, 2001; Römling, 2005). Nizak nivo c-di-GMP je povezan sa osobinama vezanim za pokretljivost kao što su plivanje i rojenje, dok su visoki nivoi c-di-GMP povezani sa sesilnom adaptacijom uključujući sintezu ekstracelularnih komponenti (Römling, 2005; Jonas i saradnici, 2010).

Promene različitih spoljašnjih uticaja kao što su vrednosti temperature, pH, koncentracija kiseonika, hidrodinamika, osmolarnost, raspoloživost hranljivih materija, prisustvo specifičnih jona, UV zračenje, tretmani etanolom, fosforom, kao i visoke gustine ćelija utiču na ekspresiju *csgD* transkripcionog regulatora (Liu i saradnici, 2000; Hengge-Aronis, 2002). Kontrola ekspresije gena *csgD* odgovornog za produkciju obe komponente matriksa, fimbrija i celuloze posredovana je sigma faktorom *rpoS* (σ_{38}) (stress response regulator, *RNA polymerase, sigma S*), koji se aktivira kao odgovor na stresne uslove životne sredine (Gerstel i Römling, 2003).

Mnogi autori smatraju da se ekspresija RDAR morfotipa javlja zbog karakterističnih uslova za rast poput: temperature ispod 30°C, deficit soli, niska osmolarnost i kao posledica gladovanja u podlogama sa niskom koncentracijom hranljivih materija (Steenackers i saradnici, 2012), kao i usled povećane otpornosti na sušenje, dezinfekciona sredstva i antimikrobne agense (White i saradnici, 2006; White i Surette, 2006; Scher i saradnici, 2005; Solano i saradnici, 2002).



Slika 2.3. Model regulatorne mreže koja kontroliše ekspresiju komponenti ekstracelularnog matriksa neophodnih za formiranje biofilma *Salmonella* spp. (White i Surette, 2006).

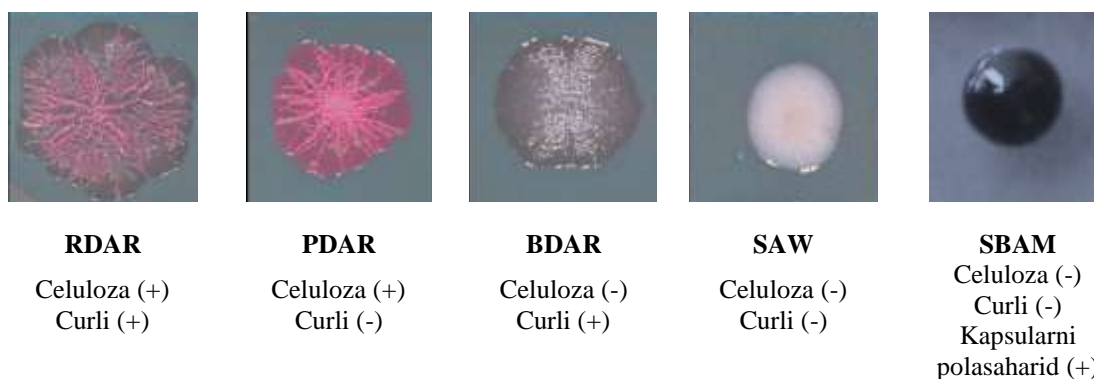
Pored curli fimbrija, druga komponenta ekstracelularnog matriksa biofilma *Salmonella* biofilma je celuloza (β -1 \rightarrow 4-D – glukozni polimer), čija sinteza je regulisana genima *bcsABZC* i *bcsEFG* (Zogaj i saradnici, 2001) kod *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* (Jain i Chen, 2007; Solano i saradnici, 2002). Nefunkcionalnost *adrA* (*agfD*-*dependent regulator-csgD*) i/ili *bsc* (*bacterial cellulose synthase*) gena koji su uključeni u biosintezu celuloze, uzrokuju izmenu na nivou morfotipa kolonije. Na Kongo crvenom agaru izolati salmonela koji nemaju sposobnost sinteze celuloze, formiraju kolonije suve i naborane površine, braon boje, neravnih ivica (Slika 2.4.). U literaturi se ove kolonije opisuju kao *brown, dry and rough* - BDAR morfotip (Römling i saradnici, 2000; Römling, 2005).

Nefunkcionalnost gena (*csgA* i *csgB*) odgovornih za sintezu tankih agregativnih fimbrija (*curli*) rezultira pojavom rozih, naboranih i suvih kolonija, iregularnih ivica, R-forme na Kongo crvenom agaru, (*pink, dry and rough*) - PDAR morfotip (Slika 2.4.). PDAR morfotip karakteriše produkcija celuloze, dok je biosinteza fimbrija inhibirana

(Römling i saradnici, 1998b; Römling i saradnici, 2000; Jain i Chen, 2007; Steenackers i saradnici, 2012).

Kolonije SAW morfotipa (*smooth and white*) karakteristične su za sojeve koji ne proizvode ni jednu od dve ključne komponente ekstracelularnog matriksa. (Römling i saradnici, 1998b; Gerstel i Römling, 2003; Giaouris i saradnici, 2012) (Slika 2.4.).

Pored već opisane četiri morfotipa (RDAR, PDAR, BDAR i SAW) skoro je opisan i *smooth brown and mucoid* - SBAM morfotip (Slika 2.4.). Sojeve *Salmonella* koji formiraju SBAM morfotip kolonija odlikuje prekomerna produkcija kapsularnog polisaharida, dok je ekspresija celuloze i tankih agregativnih fimbrija inhibirana (Malcova i saradnici, 2008). Produkcija kapsule nije važna za multicelularnu agregaciju, ali za opstanak u životnoj sredini jeste (Gibson i saradnici, 2006).



Slika 2.4. Ekspresija glavnih komponenti matriksa biofilma kod različitih *Salmonella enterica* serotipova (Römling i saradnici, 2000; Malcova i saradnici, 2008).

Formiranje pelikule ili biofilma na granici dva agregatna stanja (tečnost/vazduh) je osobina karakteristična za *Salmonella* spp. Pod dejstvom gravitacione sile, mikroorganizmi pokazuju tendenciju da tonu na dno ili da prijanjaju na zidove, a *Salmonella* spp. karakteriše osobina kolonizacije tečnost-vazduh međufaze (Armitano i saradnici, 2014). Formiranje pelikule je posledica agregacije ćelija u vidu prstena na granici dva agregatna stanja (tečnost-vazduh) (Scher i saradnici, 2005; Latasa i saradnici, 2005; Jonas i saradnici, 2007). Time su bakterijama dostupni i kiseonik (vazduh) i hranljive materije i voda (tečnost). Formiranje pelikule, je povezano sa produkcijom ekstracelularne supstance i pokretljivošću mikroorganizama (Armitano i saradnici, 2014).

CsgD transkripcijski regulator koji reguliše produkciju obe fimbrije i celuloze, utiče i na ekspresiju BapA (*biofilm associated protein A*) proteina, koji ima važnu ulogu u agregaciji ćelija i formiranju pelikule (Latasa i saradnici, 2005; Jonas i saradnici, 2007). Dokazano je da je BapA slabo povezan sa površinom ćelija i da je sekretovan preko BapBCD tipa II proteinskog sekretornog sistema, koji je kodiran preko *bapABCD* operona. Sekretacija je pokazana kao neophodna da bi se formirao biofilm. Prekomerena produkcija BapA proteina dovodi do jačanja pelikule. Nedostatak BapA može se nadomestiti hiperprodukcijom *curli* fimbrije, ali ne i celuloze, što rezultira formiranjem čvrste pelikule u uslovima niske koncentracije hraniva (Latasa i saradnici, 2005).

2.2.9. Otpornost bakterija u biofilmu na antimikrobne agense (antibiotike i dezinficijense)

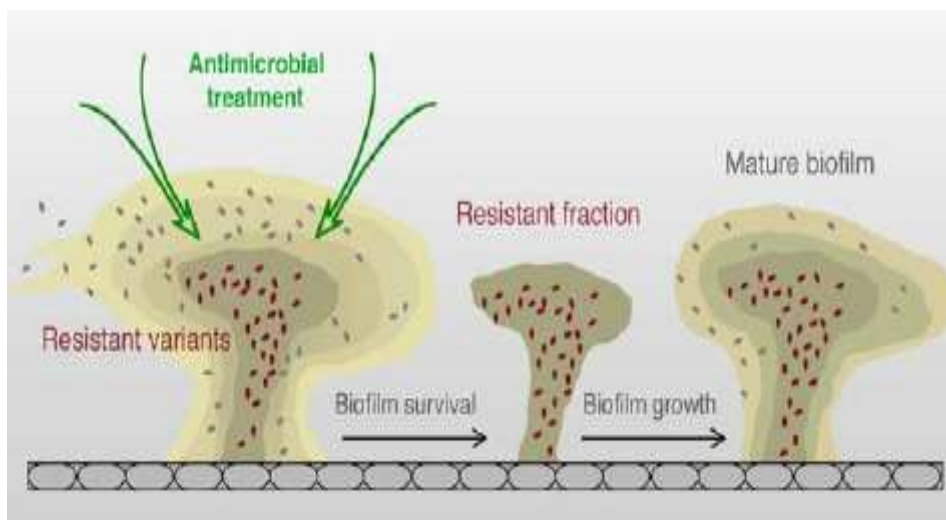
Jedan od najvažnijih aspekata života bakterija u biofilmu, odnosi se na njihovu povećanu otpornost na efekat antimikrobnih agenasa. U odnosu na populaciju dvojnika koja raste u suspenziji, bakterije koje rastu u biofilmu pokazuju za 10 do 1000 puta veću otpornost na efekat antibiotika i dezinficijenasa (Mah i O'Toole, 2001; Stewart i Costerton, 2001; Lewis, 2001; Lewis, 2005). Ovaj fenomen je od ključnog značaja za hronični tok i neuspeh terapije biofilmom izazvanih infekcija (Costerton i saradnici, 1999).

Više mehanizama se razmatra odgovornim za ovaj fenomen:

1. Zaštitna uloga matriksa;
2. Smanjene vrednosti rasta bakterija u biofilmu;
3. Ekspresija gena specifičnih za biofilm;
4. Uslovi u dubini biofilma (koncentracija kiseonika, pH vrednost i drugi fizičko-hemijski faktori koji deluju na antibiotike);
5. Perzisteri.

Zaštitna uloga matriksa: Matriks vezuje za površinu bakterije čineći trodimenzionalno polje koje okružuje bakterijske ćelije, sprečava isušivanje i omogućava zaštitu stanovnika biofilma od pretnji kao što su biocidi, antibiotici, antitela, dezinfekciona sredstva i deterdženti, bakteriofagi i bela krvna zrnca (Fleming i Wingender, 2010). Ekstracelularni polimerni matriks deluje kao difuziona barijera (Donlan i Costerton, 2002; Branda i saradnici, 2005; Giaouris i saradnici, 2012). Difuzija antimikrobnih lekova kroz matriks objašnjava se dvojako s jedne strane, interakcijom molekula s egzopolisaharidnim matriksom biofilma, koji deluje poput "molekularnog sita" na velike molekule ili kao jonski izmjenjivač na hidrofilne, pozitivno naelektrisane molekule antimikrobnih lekova (Davey i O'Toole, 2000; Stewart i Costerton, 2001; Lewis, 2001). S druge strane, enzimskom razgradnjom biofilm se štiti od molekula kao što su vodonik peroksid ili β -laktamski antibiotici (Mah i O'Toole, 2001; Lewis, 2001). Dunne (2002) navodi da za male molekule antimikrobnih sredstava, barijera biofilm matriksa može pre da odloži bakterijsku smrt, nego efikasno da je prevenira. Usporena difuzija je u sprezi sa drugim mehanizmima destrukcije antibiotika koji smanjuju njihovu koncentraciju u dubljim slojevima biofilma (Milanov i saradnici, 2010). U velikom broju istraživanja je dokazana efikasna zaštitna uloga negativno naelektrisanog matriksa od prodora pozitivno naelektrisanih aminoglikozidnih antibiotika, a koja nastaje kao rezultat zasićenja mesta vezivanja pozitivno punjenih antibiotika za negativno naelektisan matriks (Gordon i saradnici, 1988; Nichols i saradnici, 1988; Anwar i saradnici, 1992; Kumon i saradnici, 1994; Stewart i Costerton, 2001; Stewart, 2002; Høiby i saradnici, 2010). Uloga polisaharida matriksa biofilma u usporenom prodoru antibiotika je najintezivnije proučavana na modelu *Pseudomonas aeruginosa* (Lewis, 2001; Van Acker i saradnici, 2014). U ovim biofilmovima, prodor aminoglikozidnih antibiotika poput gentamicina i tobramicina je znato sporiji u odnosu na β -laktamske antibiotike, što se može objasniti vezivanjem aminoglikozida za polisaharid matriksa - alginat (Gordon i saradnici, 1988; Gordon i saradnici, 1991; Van Acker i saradnici, 2014). Usporena difuzija aminoglikozida i β -laktama u kombinaciji sa degradacijom putem enzima, kao što su β -laktamaze, katalaze, modifikovani aminoglikozidni enzimi ili hloramfenikol acetiltransferaze, pruža efikasnu zaštitu biofilmu *P. aeruginosa* (Lewis, 2001; Stewart, 2002). U biofilmu bakterije jedne vrste štite osetljive bakterija druge vrste produkcijom enzima koji inaktiviraju

antibiotike. Konfokalnom skenirajućom laser mikroskopijom je dokazano da antibiotici mogu prodreti kroz matriks biofilma, ali teško dosežu do bakterija koje su zbijene u grupe ili mikrokolonije (Trachoo, 2003). Ekstracelularni polimeri matriksa svojim hidrofobnim krajevima vezuju antibiotike i ometaju njihov prodor u svim delovima biofilma. Letalnim koncentracijama antibiotika praktično su izložene samo bakterije u površinskim slojevima biofilma (Slika 2.5.).



Slika 2.5. Mehanizam otpornosti bakterija u biofilmu (Drenkard, 2003).

Subinhibitorne koncentracije antibiotika u pojedinim slučajevima doprinose formiranju biofilma. Ograničena difuzija antibiotika kroz matriks, u sprezi sa smanjenjem koncentracije antibiotika, stimuliše formiranje biofilma mehanizmom pozitivne povratne sprege. (Sailer i saradnici, 2003; Bagge i saradnici, 2004). Na primer, subinhibitorne koncentracije tetraciklina i eritromicina aktiviraju ekspresiju gena koji kodiraju polisaharid adhezin u biofilmu *Staphylococcus epidermidis* (Rachid i saradnici, 2000). Hoffman i saradnici (2005) su takođe otkrili da subinhibitorna koncentracija aminoglikozida stimuliše formiranje biofilma *P. aeruginosa* i *E. coli* povećanjem biomase bakterija, umesto stimulacije formiranja matriksa. U većini ovih slučajeva, prisustvo antibiotika dovodi do smanjenja broja bakterija samo u površinskom sloju biofilma.

Smanjene vrednosti rasta bakterija u biofilmu: Bakterije u biofilmu sporo rastu, slično bakterijama u stacionarnoj fazi rasta u suspenziji (Anderl i saradnici, 2003). Bakterije koje pokazuju usporen metabolizam, rast i razmnožavanje u biofilmu, otpornije su na dejstvo antimikrobnih agenasa, slično planktonskim ćelijama u stacionarnoj fazi rasta (Costerton i saradnici, 1999). Pored usporenog rasta i usporenog metabolizma, rezistenciji bakterija u biofilmu doprinose i aktivnost efluks pumpe i ekspresija regulatora kao odgovor na stres. Visoka koncentracija ćelija u biofilmu indukuje proizvodnju rpoS proteina koji kodira produkciju sigma faktora (σ^{38}), a koji se uobičajeno javljaju u stacionarnoj fazi rasta ćelija i koji kodira rpoS gen (Trachoo, 2003). To znači da smanjena vrednost rasta bakterija u biofilmu nije posledica oskudice u hranljivim materijama, već je to genetski regulisan proces i mehanizam adaptacije na život u biofilmu. Spor rast redukuje metaboličku aktivnost a time i osetljivost na antibiotike. U suštini, mnoga antimikrobna sredstva su efektivnija u ubijanju brzorastućih bakterija, a neki antibiotici (penicilin i ampicilin) koji inhibiraju sintezu ćelijskog zida, imaju apsolutni zahtev da bakterija raste da bi mogli da je ubiju (Stewart i Costerton, 2001; Stewart, 2002). Neki od naprednijih β -laktama, cefalosporina, aminoglikozida i fluorokvinolona mogu ubiti i bakterije u biofilmu, ali su i oni efektivniji u ubijanju bakterija koje se brzo dele (Velhner i saradnici, 2014).

Ekspresija gena specifičnih za biofilm: Geni rezistencije na antimikrobna sredstva se osim vertikalnim prenošenjem sa ćelije na ćeliju prilikom deobe, prenose i horizontalnim putem preko mobilnih genetičkih elemenata plazmida, integra i transpozona (Mišić, 2013). Biofilm predstavlja milje za horizontalni transfer genetičkog materijala i nastank patogena sa novim faktorima virulencije, rezistencijom i povećanom sposobnošću preživljavanja u spoljašnjoj sredini. Horizontalni transfer ekstrahromozomskih gena nastaje putem transformacije, trasdukcije ili konjugacije (Obst i saradnici, 2006; Milanov i saradnici, 2010; Roberts i Mullany, 2010). Putem horizontalnog genetskog transfera dolazi do prenošenja gena rezistencije na druge mikroorganizme koji su osetljivi na antimikrobne supstance. Tačkastim mutacijama gena mikroorganizmi razvijaju rezistenciju i brzo se adaptiraju na novi ekosistem (Buffet-Bataillon i saradnici, 2012). To je izrazito brz proces koji za posledicu ima pojavu rezistencije na antibiotike kod bakterija koje ranije nisu bile u kontaktu sa antibiotikom (Mišić, 2013). Ćelije bakterija u biofilmu nisu otpornije na inhibiciju rasta

dejstvom antibiotika, tako da ne postoji realna potreba za dokazivanjem nekog specijalnog mehanizma rezistencije na lekove koji deluje samo u biofilmu (Lewis, 2001). *Multidrug resistance pumps* (MDR) imaju ulogu u rezistenciji biofilma kod niskih koncentracija antibiotika i postoji razlog da se veruje da nepoznate MDR pumpe mogu da budu ispoljene u biofilmovima *P. aeruginosa* (Brooun i saradnici, 2000). Genetska ispitivanja ukazuju da je više gena ekspresionirano u biofilmu u odnosu na planktonsku populaciju i da ti *up*-regulisani geni uključuju *open reading frames* nepoznate funkcije (Pace i saradnici, 2006).

Uslovi u dubini biofilma: Kao moguće objašnjenje za povećanu otpornost bakterija u biofilma navodi se varijabilnost fizičkih i hemijskih uslova u biofilmu (Lewis, 2001; Stewart i Costerton, 2001; Stewart, 2002). S uvećanjem mase biofilma, menjaju se uslovi mikrookoline, opada gradijent koncentracije kiseonika i hranljivih materija od površine prema dubini biofilma, menja se pH i povećava koncentracija metaboličkih produkata (Mah i O'Toole, 2001; Stewart i Costerton, 2001). U uslovima smanjene koncentracije kiseonika i hranljivih materija, bakterije prelaze u stacionarnu fazu u kojoj su manje osetljive na baktericidno delovanje antimikrobnih lekova, posebno onih čije je ciljno mesto delovanja sinteza makromolekula (Roberts i Stewart, 2005). Aminoglikozidni antibiotici su manje efikasni prema mikroorganizmima koji se nalaze u dubljim slojevima biofilma gde vladaju anaerobni uslovi, nego prema bakterijama u aerobnim uslovima (Tack i Sabath, 1985; Stewart i Costerton, 2001; Stewart, 2002). Tretiranjem biofilma antibioticima koji deluju na nivou razmnožavanja bakterija, ubijaju se sojevi na površini biofilma, dok sojevi u dubini preživljavaju i postaju novi izvor infekcije. Akumulacija produkata metabolizma dovodi do pH promena većih od 1 između tečnosti i unutrašnjosti biofilma (Zhang i Bishop, 1996), što može dovesti do direktnog antagonističkog delovanja antibiotika (Stewart i Costerton, 2001). U zavisnosti od prostorne raspoređenosti, bakterije u biofilmu mogu biti izložene različitim koncentracijama antibiotika.

Perzisteri: Perzisteri su otkiveni sredinom 20. veka, ali se o njihovoj prirodi još uvek malo zna (Lewis, 2005). Poznata je činjenica da perzisteri nisu mutanti i da ne predstavljaju poseban stadijum ciklusa života bakterija, već deo populacije bakterija koja je prirodno otporna na antibiotike (Lewis, 2001; Lewis, 2005). Planktonska populacija bakterija u ranoj fazi rasta ne sadrži perzistere, a njihov broj se povećava

ulaskom u stacionarnu fazu rasta. Formiranje perzistera dakle zavisi od faze rasta, a jedan formiran, zreo biofilm, je gusto naseljena zona u kojoj je teško zamisliti bakterijsku deobu. U takvim uslovima prostorne prinude, nulta populacija rasta razmatra se kao norma (Watnik i Kolter 2000). Perzisteri koji čine mali deo populacije biofilma se smatraju odgovornim za toleranciju bakterija u biofilmu na širok spektar antimikrobnih jedinjenja (Stewart, 2002; Roberts i Stewart, 2005). Utvrđeno je da perzister ćelije ne nastaju kao odgovor na antimikrobnu terapiju i da bakterijski signalni molekuli nemaju nikakav uticaj na stvaranje perzistera (Lewis, 2005; Lewis, 2007). Kada se oslobode iz biofilma, ove bakterijske ćelije deobom opet produkuju populaciju bakterija osetljivu na antibiotike, iz čega je jasno da perzisteri nisu ćelije sa mutacijom gena. Kada se prekine terapija, perzisteri će ponovo formirati biofilm koji će proizvoditi nove planktonske ćelije, a one vratiti simptome bolesti (Lewis, 2001; Lewis, 2005; Lewis, 2007).

2.2.10. Opstanak *Salmonella* spp. u fabrikama za proizvodnju hrane za životinje

Poslednjih godina raste zainteresovanost za bezbednost hrane za životinje koja je važan preduslov ne samo za zdravlje i produktivnost životinja, već posredno i za zdravlje ljudi.

Hrana predstavlja kapiju za ulaz mikroba u lanac hrane (Alvarez i saradnici, 2003) i učestalo je kontaminirana alimentarnim patogenima (Crump i saradnici, 2002). Poseban značaj odnosi se na bakterije iz roda *Salmonella*, jer njihovo prisustvo u hrani za životinje predstavlja rizik za kolonizaciju ili infekciju životinja, a posledično i infekciju ljudi koji konzumiraju proizvode životinjskog porekla (Crump i saradnici, 2002; Alvarez i saradnici, 2003). Veza između *Salmonella* koje se nalaze u hrani za životinje i pojave salmoneloza kod ljudi poznata je više godina (Crump i saradnici, 2002; Jones, 2011). Salmonele su priznate u svetu kao glavni zoonozni patogen ljudi i životinja. U EU, salmoneloza je druga najčešće ustanovljivana zoonotska infekcija u 2009. godini, sa 108.614 prijavljenih slučajeva od koji je 0,08% sa smrtnim ishodom (Giaouris i saradnici, 2012; EFSA, 2011).

Salmonele dospevaju u hranu za životinje na više načina i u svim fazama proizvodnje (Patel i Sharma, 2010; Cevallos-Cevallos i saradnici, 2012).

Kontaminiranim sirovinama animalnog i biljnog porekla, kao i tokom njene prerade ili postprocesno. Pored hrane animalnog porekla, koja se tradicionalno smatra glavnim izvorom *Salmonella* za ljude, novija epidemiološka istraživanja sve češće identifikuju kao izvor i hranu biljnog porekla (Lapidot i saradnici, 2006; Steenackers i saradnici, 2012; Cevallos-Cevallos i saradnici, 2012). *Salmonella* vrste zahvaljujući izrazito velikoj adaptivnoj sposobnosti na raznovrsne uslove okruženja i ubikvitarnoj rasprostranjenosti u životnom okruženju, uspešno opstaju na biljnoj materiji intenzivacijom u stome, pukotine i u zasečene površine, kao i u biofilmovima koje prirodno formiraju na površini biljaka (Srey i saradnici, 2013). Invadiranost biljne materije *Salmonella* spp. može nastati preko kontaminirane vode za navodnjavanje ili upotrebom sirovog đubriva (Barak i Liang, 2008; Steenackers i saradnici, 2012). *Salmonelle* se mogu izolovati iz poljoprivrednih kultura i zemljišta čak šest meseci i više nakon kontaminacije (Teplitzki i saradnici, 2009; Barak i saradnici, 2009). Opstanak i upornost *Salmonella* spp. kao epifita na biljnoj površini ukazuje na njen dugotrajan opstanak i izuzetnu sposobnost prilagođavanja novim ekološkim nišama. Epidemiološka istraživanja su potvrdila da su brojne epidemije salmoneloza ljudi povezane sa konzumacijom kontaminiranih delova biljaka (seme, izdanci, lišće, koren), čineći biljke važnim vektorom za penos *Salmonella* spp. (Heaton i Jones, 2008; Berger i saradnici, 2010; Steenackers i saradnici, 2012).

Značajna je činjenica da salmonele imaju sposobnost ne samo kontaminacije, već i kolonizacije i invazije biljaka, a dokaz tome je primena mikroskopskih tehnika za *in situ* vizualizaciju (Lapidot i Yaron, 2009; Barak i saradnici, 2009; Kroupitski i saradnici, 2009; Patel i Sharma, 2010). Barak i saradnici (2009) su na modelu lucerke proučavali opstanak i formiranje biofilm *S. Newport* i *S. Enteritidis*. Dok su Kroupitski i saradnici (2009), upotrebom konfokalne laser mikroskopije ustanovili površinu lista kao predilekciono mesto *Salmonella* predstavljajući važan put kontaminacije nakon žetve.

Preko kontaminiranih sirovina, salmonele se unose u objekte za proizvodnju hrane za životinje (Nesse i saradnici, 2003), koji su indetifikovani kao potencijalna mesta za razvoj biofilma. Salmonele koriste sličnu strategiju opstanka na mestima proizvodnje hrane za životinje kao i u prirodnom okruženju. Oprema i radne površine sa kojima sirovine dolaze u kontakt u pogonima za proizvodnju hrane mogu biti supstrat za razvoj biofilmova koji predstavljaju izvor ponavljanih kontaminacija finalnih proizvoda

(Nesse i saradnici, 2003; Vestby i saradnici, 2009a). Prisustvo salmonela je ustanovljeno u objektima za prijem sirovina, mlinovima za seckanje i mešanje, mašinama za pakovanje, pokretnim trakama, konvejskim kaiševima, podovima i odvodnim kanalima (unakrsna kontaminacija prašinom i aerosolom), kao i objekti za skladištenje gotovih proizvoda i transportnim vozilima, čineći dugotrajne izvore procesne i postprocesne kontaminacije (Nesse i saradnici, 2003; Solomon i saradnici, 2005; White i Surette, 2006; Vestby i saradnici, 2009a; Vestby i saradnici, 2009b; Habimana i saradnici, 2010; Steenackers i saradnici, 2012; Giaouris i saradnici, 2012; Wang i saradnici, 2013b).

Formiranje biofilma je strategija koju *Salmonella* spp. koristi i u perzistenciji na različitim abiotskim površinama (nerđajući čelik, plastika, guma, staklo, drvo, mermer i granit) koji se uobičajeno koriste u objektima za proizvodnju hrane za životinje (Stepanović i saradnici, 2004; Giaouris i saradnici, 2005; Møretro i saradnici, 2009; Rodrigues i saradnici, 2011; Carrasco i saradnici, 2012; Steenackers i saradnici, 2012; Giaouris i saradnici, 2012). Kontaminirana oprema i površine na mestima proizvodnje hrane za životinje, mogu mesecima pa čak i godinama biti izvor kontaminacije finalnih proizvoda, uprkos kontinuiranoj izloženosti stresogenim faktorima kao što su niska vlažnost, deficit hraniva, redovno sprovođenje mera čišćenja i dezinfekcije (Nesse i saradnici, 2003; Vestby i saradnici, 2009a; Møretro i saradnici, 2009)

Poznato je da pojedini sojevi *Salmonella* godinama perzistiraju na mestima proizvodnje hrane za životinje kao “*house strains*” (Nesse i saradnici, 2003; Vestby i saradnici, 2009b), a pretpostavka je da ovu perzistenciju značajno olakšava njihova sposobnost da na abiotskim površinama formiraju biofilm, sami ili u zajednici sa drugim uobičajeno prisutnim mikroorganizmima. Jednom formirani biofilmovi u industrijskim pogonima se teško uklanjaju i dovode do pojave perzister populacija (Vestby i saradnici, 2009a; Carrasco i saradnici, 2012).

U hranu za životinje, salmonele mogu dospeti kontaminiranim sirovinama animalnog i biljnog porekla, međutim, kontaminacija hrane je moguća i tokom njene prerade ili postprocesno. Češći nalaz određenih serotipova salmonela kao što su *S. Agona*, *S. Montevideo*, *S. Senftenberg*, *S. Mbandaka*, *S. Tennessee*, *S. Typhimurium*, *S. Livingstone* u fabrikama hrane za životinje se može objasniti njihovom sposobnošću da perzistiraju u formi biofilma na površinama od veštačkih materijala (Vestby i saradnici,

2009a; Habimana i saradnici, 2010). Razvoj molekularnih tehnika istraživanja (*pulsed-field gel electrophoresis* - (PFGE) i *plasmid profile typing*) pružio je dokaze da klonovi različitih serovarijeteta *Salmonella* (takozvani „house strain“) mogu perzistirati mesecima, pa čak i godinama u fabrikama za proizvodnju hrane (Nesse i saradnici, 2003; Vestby i saradnici, 2009a; Vestby i saradnici, 2009b; Møretro i saradnici, 2009; Habimana i saradnici, 2010; Prunić i saradnici, 2016). To ukazuje da ti sojevi ne kontaminiraju ponavljano površine preko sirovina koje ulaze u pogon za proizvodnju, već da postoje na opremi i površinama u fabrikama stočne hrane.

Potencijalni izvori naknadne kontaminacije hrane za životinje predstavljaju glodari, ptice i insekti koji mogu prenositi uzročnika alimentarnih infekcija putem svog fecesa, urina, perija. Takođe, čovek je indetifikovan kao moguć izvor kontaminacije gotovog proizvoda hrane za životinje, putem neadekvatne manipulacije hranom. Na određenim proizvodnim površinama kondenzacija izazvana temperaturnim varijacijama, može obezbediti dovoljnu vlažnost za rast i formiranje biofilmova *Salmonella* i drugih bakterija, koji predtavljaaju trajni izvor kontaminacije hrane (Bogvist i saradnici, 2003; Mynt i saradnici, 2007; Habimana i saradnici, 2010; Jones, 2011; Sokolović i Ruk, 2011). U poslednje vreme sve su češći literaturni navodi da je prašina značajan potencijalni izvor kontaminacije objekata za skladištenje sirovina, preko pužnih transportera (Jones, 2011). Takođe, prokišnjavanje, kondenzacija vlage, zaostajanje hraniva u pojedinim uređajima i transporterima, nedovoljno zagrevanje u termičkim procesima, stvaraju pogodne uslove za ponovni razvoj mikroorganizama (Habimana i saradnici, 2010; Jones, 2011).

U objektima za proizvodnju hrane za životinje vezanost bakterijskih ćelija za površine predstavlja trajni izvor i prvi korak procesne i postprocesne kontaminacije proizvoda (Carrasco i saradnici, 2012), što dovodi do ozbiljnih problema u higijenskom pogledu i velikih ekonomskih gubitaka. U industrijskim pogonima kao najčešći razlozi nastanka biofilma se navode nepravilno očišćena i sanitizirana oprema (O'Leary i saradnici, 2013; Srey i saradnici, 2013). Salmonelle organizovane u biofilm, pokazuju veću otpornost na različite stresogene faktore kojima su izložene u fabrikama za proizvodnju hrane, kao što su isušivanje i dezinfekcija (Møretro i saradnici, 2009; Aviles i saradnici, 2013). Generalno, efikasan program za čišćenje i dezinfekciju će sprečiti stvaranje novih biofilmova, međutim ne postoje efikasne strategije za

eradikaciju već formiranih biofilmova. Postoje mesta koja su uvek teško pristupačna za propisno čišćenje i dezinfekciju.

2.2.10.1. Principi kontrole *Salmonella* spp. u procesu proizvodnje hrane za životinje

Humphrey (2004) navodi: "S obzirom na sveprisutnost *Salmonella* vrsta, malo je verovatno da će *Salmonella* biti iskorenjena iz lanca ishrane." Iako iskorenjivanje možda nije moguće, kontrola je moguća i treba je sprovoditi u cilju smanjenja ili onemogućavanja kontaminacije.

Mere kontrole *Salmonella* spp. u procesu proizvodnje hrane za životinje mogu se podeliti na tri kategorije:

- a) sprečavanje ulaska mikroorganizama u proizvodni objekat,
- b) sprečavanje umnožavanja mikroorganizama unutar objekata za proizvodnju,
- c) postupke kojima se mogu uništiti mikroorganizmi.

Sprečavanje kontaminacije u proizvodnim objektima uključuje kontrolu prašine, kontrolu kretanja zaposlenog osoblja i upotrebe opreme, smanjenje najezde glodara, sprečavanje zagađenja preko divljih ptica i obezbeđenje dezinfekcije transportnih vozila. Smanjenje umnožavanja *Salmonella* spp. u objektima za proizvodnju hrane podrazumeva otkrivanje povoljnih niša za njihov rast i opstanak, kao i otklanjanje faktora koji povoljno utiču na njihov rast. Eliminacija *Salmonella* spp. podrazumeva termičku obradu (peletiranje, ekstrudiranje) ili hemijski tretman (Habimana i saradnici, 2010; Jones, 2011; Berge i saradnici, 2012).

Prisustvo prašine, visok udeo vlage ili aktivnost vode u hrani, relativna vlaga vazduha, niska pH vrednost, oksido-redukcioni potencijal, procent masnoće (biljne materije), prisustvo soli i ugljenih hidrata, količina hranjivih materija, kao jačina i vreme trajanja temperature (Bogvist i saradnici, 2003; Sokolović i Ruk, 2011), su parametri okruženja koji mogu uticati na umnožavanje mikroorganizama u hrani za životinje. U kontroli procesa proizvodnje akcenat je dat na kontrolu prašine koja je identifikovana kao ključna tačka kontaminacije i rekontaminacije i predstavlja neophodan zadatak kontrole proizvodnih objekata. Butcher i Miles (1995) su u svom radu zaključili da je prašina glavni izvor kontaminacije *Salmonella* vrstama u hrani za životinje. Prašina je najviše prisutna u sirovinama i objektima za prijem i skladištenje,

mada se ona javlja i kao produkt u mlinovima za seckanje i mešanje, valjkovima, pužnim transporterima, trakama za transport, predstavljajući težak i zahtevan zadatak kontrole *Salmonella* u svim proizvodnim objektima hrane za životinje (Jones, 2011). Dodavanjem organskih kiselina u hranu za životinje menja se pH vrednost (pH 4,5 i niža) hrane, što stvara nepovoljne uslove za rast i preživljavanje mikoorganizama. Hrana često sadrži određen procenat vlage koji se može povećati apsorpcijom vlage iz okoline usled dugotrajnog skladištenja, kondenzacijom ili apsorpcijom iz vlažnog vazduha. Takođe, povećan sadržaj vlage u hrani može biti posledica prokišnjavanja objekata. Efikasnu zaštitu od nepovoljnog uticaja životnog okruženja salmonelama pruža visok procenat biljne masti (npr. ulje soje). Morita i saradnici (2006) su ukazali da na delovima opreme ulje soje pruža efikasnu zaštitu salmonelama od nepovoljnih uticaja životnog okruženja u procesu proizvodnje hrane za životinje. Stoga je važno da se smanji akumulacija ulja ili masti u hrani za životinje i okruženju i da se na taj način smanji šanse za opstanak *Salmonella*. Veliki problem kontrole na mestima proizvodnje hrane predstavljaju glodari i divlje ptice. Meerburg i Kijlstra (2007) su izneli činjenicu da je čak 47% konataminacija hrane *Salmonella* vrstom poreklom od glodara. Takođe, Morita i saradnici (2006) ističu značaj glodara u kontaminaciji hrane. Kod nekih divljih ptica *Salmonella* može postati stalni stanovnik crevnog trakta, zbog čega je permanentno izlučuju u spoljašnu sredinu. Divlje ptice dolaze u kontakt sa salmonelama na deponijama ili preko kanalizacije, hraneći se zaraženim životinjskim izmetom, leševima ili hranom za životinje koja se nalazi u blizini objekta za proizvodnju hrane (Benskin i saradnici, 2009; Jones, 2011). Stoga, mere deratizacije i kontrola divljih ptica treba da budu uključene u program kontrole *Salmonella* u objektima za proizvodnju hrane za životinje. Transportna vozila su identifikovana kao potencijalni izvor kontaminacije sirove hrane i sastojaka hraniva, zbog nemogućnosti detaljnog čišćenja posle svake isporuke (Whyte i saradnici, 2003). Osoblje koje radi na mestima proizvodnje hrane za životinje se takođe smatra potencijalnim izvorom kontaminacije hrane. Nedovoljna obučanost osoblja za rukovanje opremom i neadekvatno sprovođenje higijenskih mera pri radu, može dovesti do stvaranja pogodnih uslova za razvoj mikoorganizama. Stoga je neophodno sprovoditi higijenske mere pri radu u pogonima za proizvodnju hrane za životinje i podučiti zaposleno osoblje o higijenskim merama u skladu sa pravilima dobre proizvođačke prakse.

Postupci kontrole procesa proizvodnje putem peletiranja i ekstrudiranja se smatraju uspešnim načinom za eliminisanje prisutnih mikroorganizama u hrani za životinje. Pomenuti postupci zahtevaju upotrebu visokih temperatura za postizanje pasterizacija tokom prerade. Proces peletiranja se sastoji od tri faze: mešanje pare sa hranom, dejstvo pritiska na hranu, formiranje peleta i uklanjanje toplote i vlage preko velike količine vazduha (hlađenje). Proces peletiranja smanjuje od 50% do 93% prisustva *Salmonella* spp. (Jones i saradnici, 1991; Veldman i saradnici, 1995; Jones, 2011). Postupak peletiranja uključuje veliku količinu pare za uništavanje mikroorganizama, što ima za posledicu povećanje vlažnosti peleta. Faze u procesu peletiranja deluju zajednički na konačni proizvod, ali njihova primena zavisi od velikog broja faktora (formulacije obroka, dizajna i održavanja opreme, uslova i vremena peletiranja itd.). Proces peletiranja se odvija na temperaturi od 115°C do 125°C i pod pritiskom od 84kg/cm, a može se upotpuniti i procesom ekstrudiranja koji se odvija na višim temperaturama, od 130°C do 140°C i pritiskom od 42kg/cm (Jones, 2011). Zbog svojih karakteristika (toplota tokom procesa peletiranja), ovaj postupak zaista smanjuje broj mikroorganizama, ali se broj bakterija često kasnije ponovno poveća. Uz to, nema dovoljno podataka koji u potpunosti potvrđuju uspešnost samog postupka u praksi. Razlog tome je potencijalna kontaminacija u fazi hlađenja peleta kada može doći do mešanja sa kontaminiranom prašinom i putem kondenzacije koja nastaje zbog varijacija u temperaturi do kojih neminovno dolazi tokom proizvodnog procesa, pri čemu se obezbeđuje vlažnost koja omogućava opstanak mikroorganizma (FAO, 2010; Sokolović i Ruk, 2011). Termička obrada hrane za životinje je pokazala nedovoljnu efikasnost u kontroli salmonela (Habimana i saradnici, 2010). Istraživanja su pokazala da mikroorganizmi, posebno *Salmonella* spp. prevazilaze stalne fluktuacije temperature i vlage u pogonima industrije hrane za životinje ulaskom u VBNC stadijum (Møretro i saradnici, 2009; Habimana i saradnici, 2010; Habimana i saradnici, 2014).

2.2.10.2. Primena mera za smanjenja i/ili eradikaciju *Salmonella* spp. u industriji proizvodnje hrane za životinje

Pored termičke obrade hrane za životinje, u cilju smanjenja ili eliminisanja *Salmonella* spp. iz sirovina i gotovih smeša za ishranu životinje u objektima za proizvodnju hrane primenjuju se mehaničke, fizičke i hemijske metode, različiti tretmani sanitacije i organske kiseline (Sauli i saradnici, 2005; Papadopoulou i saradnici, 2009; Berge i Wierup, 2012).

Iako je termička obrada generalno priznata kao najefikasniji metod za eliminaciju patogena, u nekim okolnostima nije dovoljna i tada su na raspolaganju druge opcije. U takvim slučajevima, primena hemijskih metoda može da ponudi alternativne načine zaštite. Tretmani sastojaka hrane i smeše hraniva organskim kiselinama ili formaldehidnim proizvodima u dozvoljenim koncentracijama, mogu biti efikasni u smanjenju broja *Salmonella* spp. i drugih mikoorganizama.

U cilju smanjenja broja ili eliminisanja *Salmonella* spp. u hrani za životinje najčešće se upotrebljavaju organske kiseline (mravlja, propionska, sirćetna i buterna) i formaldehid kao efikasan hemijski tretman (Berge i Wierup, 2012). Organske kiseline dodate u količini od 0,2 - 2% inhibiraju rast *Salmonella* (Vahl, 1995; Jones, 2011). Efikasnost kiselina je varijabilna i zavisi od niza faktora: vrste kiseline, hemijskog oblika kiseline (slobodna kiselina ili kiselina so), procenta vlage u hrani (EFSA, 2008; Jones, 2011). Dodavanjem organskih kiselina u hranu za životinje menja se pH vrednost (pH 4,5 i niža) hrane, čime se stvaraju nepovoljni uslovi za rast i preživljavanje *Salmonella* u istoj (Dahiya et al., 2006). Primena hemijskih tretmana u cilju smanjenja broja i eliminacije patogena ima svoje nedostatke: proces je skup, zahteva dug vremenski period (nekoliko dana), kiseline deluju korozivno na metalne površine opreme i imaju negativan efekat na organoleptička svojstva i hranljivu vrednost hrane (promena ukusa i smanjenje koncentracije vitamina) (EFSA, 2008; Jones, 2011). Primena formaldehida se izbegava zbog velike moći isparavanja i štetnog delovanja na zdravlje ljudi koji su izloženi njegovom delovanju. Pored organskih kiselina u upotrebi su i druga agresivna jedinjenja kao što su hlor, peroksidi i amonijumova jedinjenja koja takođe imaju štetan rezidualni efekat i promenjene senzorne osobine krajnjih proizvoda.

Fizički tretmani sanitacije pored mehaničkog čišćenja, uključuju primenu ultrazvuka, magnetna i električna polja i različite vrste zračenja. Upotreba ultraljubičaste svetlosti (UV) je dobar metod za dezinfekciju vazduha i površina, uključujući i materijal za pakovanje. Tretman sa UV zracima je jednostavan, efikasan i ekonomičan način preveniranja u odnosu na druge tehnologije. Takođe je hladan, suv proces koji ne stvara hemijske ostatke. Fizički tretmani, iako imaju dobre rezultate, često su neprimenjivi i neprihvatljivi iz ekonomskih razloga, jer iziskuju velike troškove i tehničku opremljenost.

Da bi se izbegla štetna delovanja hemijskih tretmana i skupi fizički procesi u današnje vreme sve više se radi na iznalaženju efikasnih bioloških rešenja za smanjenje ili eliminaciju *Salmonella* spp. i drugih patogenih mikroorganizama u hrani za životinje. Biološka rešenja uključuju antimikrobna jedinjenja biljnog porekla kao što su ekstrati, etarska ulja i različiti začini, antimikrobna jedinjenja proizvedena od strane mikroorganizama kao i enzime (Simões i saradnici, 2010).

2.2.10.3. Obezbeđenje kvaliteta hrane za životinje

Ranije se smatralo da je nutritivni kvalitet kod hrane za životinje najbitniji, ali poslednjih godina, bezbednost i ispravnost hrane za životinje dobija na značaju.

Po definiciji lanac hrane je niz faza i operacija uključenih u proizvodnju, preradu, distribuciju, skladištenje i rukovanje hranom i njenim sastojcima, od primarne proizvodnje do potrošača. Da bi se osigurala bezbednost hrane, neophodno je razmotriti sve aspekte lanca ishrane koji je nastavak primarne proizvodnje uključujući i proizvodnju hrane za životinje i prodaju, snabdevanje potrošača hranom, budući da svaki od ovih elemenata može uticati na bezbednost hrane.

U nastojanju da se postignu najviši standari u obezbeđenju kvaliteta hrane organizacija za poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) i Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) za izradu standarda, različitih vodiča i smernica za zajednički FAO/WHO program standarda hrane, su još 1962. godine osnovali Codex Alimentarius Comision (CAC), sa ciljem da pomogne međunarodnu trgovinu i u isto vreme obezbedi kvalitetnu i zdravu hranu za potrošače širom sveta.

Preporuka CAC-a za buduće aktivnosti u vezi propisa u proizvodnji i preradi hrane za životinje je da se u postojeće sisteme obezbeđenja kvaliteta uključe HACCP koncept koji je akronim pojma *Hazard Analysis and Critical Control Points*, i predstavlja sistemski preventivni pristup kojim se osigurava sigurnost hrane u cilju bolje zaštite kvaliteta hrane, veće bezbednosti i povećanja odgovornosti (Lević i Sredanović, 2009; Sokolović i Ruk, 2011). HACCP sistem obezbeđenja kvaliteta uključuje GHP i GMP programe Codex Alimentarius Commission (CAC).

HACCP sistem predstavlja preventivni sastav kontrole procesa koji identifikuje i definiše potencijalne opasnosti (biološke, hemijske i fizičke) koje se mogu pojaviti pri proizvodnji i rukovanju hranom, te naglašava i određuje preventivne radnje potrebne za osiguravanje kvaliteta i sigurnosti hrane. Osnova sastava HACCP su takozvani programi koji predstavljaju korake ili postupke koji kontrolišu uslove proizvodnje, kao i uslove okoline potrebne za proizvodnju sigurne i ispravne hrane.

Skandinavske zemlje (Danska, Norveška i Švedska) imaju razvijen integrisani sistem nadzora i kontrole *Salmonella* (HACCP) u svakom koraku lanca ishrane i kojim se osigurava sigurnost hrane u cilju bolje zaštite kvaliteta hrane, veće bezbednosti i povećanja odgovornosti (Lević i Sredanović, 2009; Sokolović i Ruk, 2011). Ovakav višestruki program nadzora i kontrole je pokazao veliku uspešnost u eliminaciji *Salmonelle* spp. sojeva iz proizvodnje hrane za životinje, proizvodima životinjskog porekla, što je povezano sa padom učestalosti pojave salmoneloze kod ljudi na godišnjem nivou (Crump i saradnici, 2002).

Naša zemlja nema dovoljno razvijen monitoring sistem nad objektima za proizvodnju hrane, bakterijskom kontaminacijom hrane za životinje sa nadzorom mikrobiološke kontaminacije proizvoda životinjskog porekla namenjenih ishrani ljudi, kao ni pojavama alimentarnih infekcija kod ljudi. U Srbiji se od 01. januara 2009. primenjuju odredbe člana 82. Zakona o veterinarstvu (Službeni glasnik Republike Srbije 91/05) koji se odnosi na primenu „Sistema za osiguranje bezbednosti proizvoda” („HACCP”) zasnovan na analizi opasnosti i kritičnih kontrolnih tačaka u proizvodnji.

Princip bezbednosti i kvaliteta hrane "od njive do trpeze" i obrnuto "od trpeze do njive" koji je danas opšte prihvaćen u razvijenim zemljama sveta obuhvata sve učesnike u lancu proizvodnje hrane, pa tako i proizvodnju hrane za životinje. Potrebno je mnogo

stručnog rada, zalaganja i promena da bi se uključili u evropske i svetske tokove trgovine.

3. CILJ I ZADACI STRAŽIVANJA

- Identifikacija serovarijeteta *Salmonella* koji se izoluju iz hrane za životinje na području južnobačkog i sremskog okruga u Vojvodini;
- procena uloge hrane za životinje kao izvora serovarijeteta *Salmonella* od posebnog značaja u epidemiologiji salmoneloza (*S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* i *S. Virchow*);
- ispitivanje sposobnosti izolata *Salmonella* spp. iz hrane za životinje da formiraju biofilm na površini plastike, nerđajućeg čelika i tečnost/vazduh međufazi;
- utvrđivanje potencijalne korelacije između sposobnosti formiranja biofilma i serovarijeteta *Salmonella*;
- ispitivanje uticaja faktora sredine (temperature inkubacije, raspoloživost hraniva, vrsta supstrata-površine) na sposobnost izolata *Salmonella* spp. da formiraju biofilm;
- procena značaja koji hrana za životinje ima kao rezervoar *Salmonella* sa rezistencijom ili multiplom rezistencijom na antibiotike.
- utvrđivanje genetičke srodnosti sojeva *Salmonella* istog serovarijeteta koji su tokom perioda ispitivanja (dve godine) ponavljano izolovani iz različitih uzoraka hrane za životinje proizvedenih u istom objektu (mešaoni stočne hrane);

Za ostvarivanje ovih ciljeva, postavljeni su sledeći zadaci:

- Prikupljati izolate *Salmonella* spp. tokom rutinskog rada u laboratoriji za mikrobiološko ispitivanje hrane za životinje u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“, primenom klasičnih bakterioloških metoda;
- Izvršiti identifikaciju izolata *Salmonella* spp. na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika;
- Izvršiti serološku identifikaciju izolata *Salmonella* spp. iz hrane za životinje, metodom klasične aglutinacije, upotrebom polivalentnih, grupno specifičnih seruma i seruma za flagelarne antigene faze 1 i 2 za serovarijetete: *Enteritidis*, *Infantis*, *Hadar*, *Virchow* i *Typhimurium*;

- Sve izolate *Salmonella* spp. dostaviti u Nacionalnu referentnu laboratoriju za *Salmonella*, *Shigella* i *Yersinia enterocolitica*, Institutu za javno zdravlje Srbije „dr Milan Jovanović Batut“, na potvrdu svih i serološku identifikaciju ostalih serovarijeteta;
- Ispitati sposobnost produkcije biofilma svih izolata *Salmonella* spp. na površini od plastike (polistirena), nerđajućeg čelika i tečnost/vazduh međufazi, primenom testa na mikrotitracionim pločama, skening elektronske mikroskopije i pelikula testa; na dve temperature inkubacije (20°C i 37°C) i u dve podloge za kultivaciju sa različitim sadržajem hranljivih materija (Trypton soja bujon i Luria-Bertani bujon);
- ispitati produkciju ključnih komponenti matriksa biofilma *Salmonella* spp. (*curli* fimbrija i celuloze) kultivacijom izolata *Salmonella* spp. na Congo red agaru;
- ispitati osetljivost izolata *Salmonella* spp. poreklom iz hrane za životinje na antibiotike primenom disk difuzione metode;
- genetičku srodnost izolata *Salmonella* spp. istog serovarijeteta koji su izolovani iz hrane za životinje poreklom iz istog proizvodnog objekta, ispitati na genetičku srodnost primenom *pulsed field* gel elektroforeze (PFGE).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorci hrane za životinje

U periodu od 2012. do 2014. godine u laboratoriji za mikrobiološko ispitivanje hrane za životinje Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad", ukupno je pregledano 2898 uzoraka hrane za životinje na prisustvo *Salmonella* spp, a iz 152 uzorka (5,25%) izolovane su *Salmonella* spp. Uzorci su poreklom iz 18 mešaona stočne hrane sa teritorije Autonomne pokrajine Vojvodine, koji u okviru redovnog monitoringa, na mesečnom nivou dostavljaju uzorke hrane na pregled. Pregledom su bile obuhvaćene sledeće vrste hrane, komponenti i dodataka hrani za životinje:

1. Zrnasta hraniva (kukuruz, pšenica, ječam, ovas, raž, soja u zrnu, suncokret u zrnu i dr).
2. Proizvodi industrija: mlinski proizvodi (stočno brašno, klice); proizvodi industrije alkohola i vrenja (stočni kvasac); proizvodi industrije šećera (melasa, rezanci šećerne repe).
3. Uljane sačme i pogače (suncokretova i sojina sačma) i sojin griz;
4. Kabasta hraniva (silaža, seno, zelena masa)
5. Ostali biljni proizvodi (brašno lucerke, brašno leguminoza (soja, grašak...), biljna mast i ulje;
6. Hraniva animalnog porekla (riblje ulje, riblje brašno, mesno brašno, mesno-koštano brašno, surutka u prahu);
7. Mineralna hraniva (kreda, so, fosfati)
8. Zamena mleka;
9. Predsmeše (vitaminske i mineralne kombinacije) i dodaci hrani za životinje (neproteinska azotna jedinjenja, aminokiseline, enzimi, konzervansi, arome, emulgatori);
10. Gotove smeše za ishranu: svinja, živine, goveda;
11. Hrana za kućne ljubimce.

4.2. Izolacija i identifikacija *Salmonella* spp. iz uzoraka hrane za životinje

Izolacija *Salmonella* spp. izvedena je prema proceduri opisanoj u standardu SRPS EN ISO 6579:2008.: Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp.

4.2.1. Prethodno obogaćenje u neselektivnoj tečnoj podlozi: Od uzorka hrane za životinje odmereno je 50g i razređeno puferizovanom peptonskom vodom (Buffered peptone water, CM1049, Oxoid, Basingstoke, United Kindom) u odnosu 1:10. Osnovno razređenje uzorka u peptonskoj vodi inkubirano je 18h ±2h na temperaturi od 37°C ± 1°C.

4.2.2 Obogaćenje u selektivnim tečnim podlogama: Kulture dobijene obogaćenjem u peptonskoj vodi su inokulisane u dve tečne podloge za selektivno obogaćenje:

- **Rappaport-Vassiliadis bujon sa sojom** (RVS, CM0866, Oxoid, Basingstoke, United Kindom). U 10 mL RVS je inokulisan 0,1 mL kulture dobijene predobogaćenjem. RVS je inkubiran na 41,5°C ± 1°C tokom 24h ± 3h.
- **Muller-Kauffmann tetracionat- novobiocin bujon** (MKTT bujon, BK208HA, Biokar Diagnostics, France). U 10 mL MKTT je inokulisan 1 mL kulture dobijene predobogaćenjem. MKTT je inkubiran na 37°C ± 1°C, 24h ± 3h

4.2.3. Izolacija *Salmonella* na selektivnim podlogama: Kulture dobijene selektivnim obogaćenjem u RVS bujonu i MKTT bujonu su nakon isteka perioda inkubacije zasejane ezom na površinu dve čvrste selektivne podloge za izolaciju *Salmonella*:

- **ksiloza lizin dezoksiholatni agar** (XLD, CM0469, Oxoid, Basingstoke, United Kindom) i
- **Salmonella Differential HiVeg. agar** (HiMedia, India)

Zasejavanje čvrstih podloga za izolaciju *Salmonella* spp. izvedeno je tehnikom retkog zasejavanja (u cilju dobijanja pojedinačnih kolonija) kultura dobijenih u RVS i MKTT bujonu. Inokulisane ploče su inkubirane 24h ±3h na temperaturi od 37°C, posle čega su pregledane na prisustvo tipičnih kolonija *Salmonella* i atipičnih kolonija koje mogu biti *Salmonella*.

Karakteristike rasta *Salmonella* spp. na selektivnim podlogama: Tipične kolonije *Salmonella* koje rastu na XLD agaru imaju crno središte (produkcija H₂S) i svetlu prozirnu zonu crvenkaste boje na periferiji (usled fermentacije lizina). Salmonele

koje su H₂S negativne, na XLD agaru formiraju ružičaste kolonije sa tamnije ružičastim središtem. Salmonele koje su laktoza pozitivne, na XLD agaru formiraju kolonije žute boje sa crnim centrom ili bez njega. Tipične kolonije *Salmonella* na Salmonella Differential HiVeg. agar su ružičasto-crvene boje sa svetlijom periferijom.

4.2.3.1. Biohemijsko potvrđivanje izolata *Salmonella* spp.

Biohemijsko potvrđivanje izolata *Salmonella* izvedeno je prema preporukama standarda SRPS EN ISO 6579:2008 (deo: biohemijsko potvrđivanje *Salmonella* spp., strana 17).

U cilju ispitivanja biohemijskih osobina, karakteristična kolonija *Salmonella* sp. sa XLD-agara je presejana na površinu hranljivog agara (CM0469, Oxoid, Basingstoke, United Kindom), a ploče inkubirane 24h ± 3h na temperaturi od 37°C. Kultura *Salmonella* koja je izrasla na hranljivom agaru je pomoću eze zasejana na sledeće podloge:

- **TSI agar po Kligleru**- kosa površina agara je zasejana brazdanjem i ubodom u dubinu agara. Kliglerov šećer je inkubiran na 37°C ±1°C tokom 24h ±3 h. Tipične kulture *Salmonella* pokazuju alkalnu (crvenu) kosu površinu (ne fermentuju laktozu) i kiselo (žuta boja) dno sa stvaranjem gasa (razlaganje glukoze) i u oko 90% slučajeva stvaranje vodonik-sulfida (crna boja agara).
- **Urea agar** – kosa površina urea agara je zasejana brazdanjem. Urea agar je inkubiran na 37°C ±1°C tokom 24h ±3 h. *Salmonella* vrste ne proizvode enzim ureazu, pa je za negativnu reakciju karakteristično da urea agar nakon inkubacije ne menja boju indikatora fenol crvenog u ružičasto crvenu, već ostaje žute boje.
- **tečna podloga za dekarboksilaciju L-lizina** je inokulisana neposredno ispod površine i inkubirana na 37°C ±1°C tokom 24h ±3 h. Pozitivna reakcija manifestuje se zamućenjem i ljubičastom bojom posle inkubacije (žuta boja je karakteristična za negativnu reakciju).
- **Produkcija β-galaktozidaze** U 0.25 mL slanog rastvora suspendovana je kolonija izolata *Salmonella* i ubačen dijagnostički disk (DD13 ONPG discs, Oxoid, Basingstoke, England). Epruveta je inkubirana na 37°C ±1°C tokom 24h ±3 h. *Salmonella* vrste ne proizvode β-galaktozidazu i podloga ostaje bezbojna. Pozitivna reakcija se manifestuje pojavom žute boje.
- **Voges-Proskauer (VP) reakcija.** Puna eza kolonije je suspendovana u sterilnu epruvetu sa 3mL VP podloge. Podloga je inkubirana na 37°C ±1°C tokom 24h

±3h. Posle inkubacije, u podlogu je dodato dve kapi rastvora kreatina, tri kapi etanolnog rastvora 1-naftola i zatim dve kapi rastvora kalijum hidroksida uz mućkanje posle dodavanja svakog reagensa. Pozitivna reakcija ogleđa se stvaranjem ružičasto crvene boje. *Salmonella* vrste daju negativnu VP reakciju.

- **produkcija indola.** Za ispitivanje produkcije indola, izolat je suspendovan u epruvetu koja sadrži 5 mL tripton/triptofan podloge. Epruvete su inkubirane 37°C ±1°C tokom 24h ±3 h. Posle inkubacije, u podlogu je dodat Kovač reagens (HiMedia, India). Formiranje prstena ružičaste crvene boje u roku od 15 minuta ukazuje na pozitivnu reakciju. *Salmonella* vrste daju negativnu reakciju, koja se manifestuje formiranjem prstena žute boje.

4.2.4. Serološka tipizacija *Salmonella* spp.

U laboratoriji Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu, serološki je određena samo pripadnost vrsti *Salmonella* (grupni polivalentni serum za *Salmonella*, (grupe.A,B,C,D,E) i pripadnost grupi, testom aglutinacije na mikroskopskoj pločici, upotrebom: grupnog polivalentnog seruma za *Salmonella* vrste (grupe.A,B,C,D,E) i grupno specifičnih seruma za grupe: O:4 (grupaB); O:7 (grupaC₁); O:8 (grupe C₂,C₃); O:9 (grupa D); O:3,10,15,19 (grupe E₁,E₄) proizvođača Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Beograd. Pre izvođenja testa aglutinacije, svi izolati su provereni na samoaglutinaciju na sledeći način:

- jedna kap slanog rastvora je postavljena na čistu predmetnu pločicu. U toj kapi je pomoću eze suspendovan deo kolonije koja je ispitivana. Pločica je polako pomerana tokom 30 do 60 sekundi i posmatrana u odnosu na tamnu pozadinu na pojavu sitnih aglutinata. Izolati koji su pokazali aglutinaciju u slanom rastvoru su isključeni iz daljih ispitivanja zbog nemogućnosti serološke tipizacije.

Izolati koji nisu bili samoaglutinirajući, ispitani su aglutinacijom sa polivalentnim serumom na antigene O grupe, a potom i na pojedinačne, grupno specifične aglutinirajuće serume, u cilju utvrđivanja grupne pripadnosti. Na predmetnu pločicu stavljena je kap polivalentnog seruma za somatske O antigene i u toj kapi je pomoću eze suspendovan deo kolonije. Pozitivna reakcija izražena je pojavom sitnog, uniformnog, pahuljičastog aglutinata nakon blagog pomeranja pločice i u roku od 15-60 sekundi. Kultura koja je dala pozitivnu aglutinaciju sa polivalentnim serumom za somatske antigene *Salmonella* vrsta, dalje je aglutinirana sa grupno specifičnim

serumima. Dalja serološka identifikacija nije rađena, jer laboratorija za ispitivanja hrane za životinje ne poseduje sve serume neophodne za identifikaciju brojnih antigena H (flagelarnih antigena faze I i II).

Nakon biohemijskog i serološkog potvrđivanja izolata *Salmonella* spp., svi izolati su dostavljeni Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigela*, *Vibrio Cholerae* i *Yersinia enterocolitica*, Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u Beogradu, na potvrdu i identifikaciju serovarijeteta.

4.3. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma

Za ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma, odabrano je 100 izolata. Kod odabira izolata za dalja ispitivanja uzeti su u obzir sledeći kriterijumi:

- ako je isti dan u laboratoriju dostavljeno više uzoraka hraniva iz istog objekta i izolovano dva ili više sojeva *Salmonella*, za dalja ispitivanja sačuvan je:
- jedan izolat (ukoliko su u testu aglutinacije pokazali pripadnost istoj serološkoj grupi *Salmonella* spp.)
- dva izolata (ukoliko su izolati u testu aglutinacije pokazali da pripadaju različitim serološkim grupama *Salmonella* spp.).

Na ovaj način smo želeli da izbegnemo mogućnost da se dalja ispitivanja izvode sa dva ili više izolata istog soja *Salmonella*.

Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma izvedeno primenom sledećih metoda ispitivanja:

- **Congo Red agar test;**
- **Pelikula test;**
- **Test na mikrotitracionim pločama upotrebom boje kristal-violet;**
- **Skening elektronska mikroskopija.**

4.3.1. Congo Red agar test – princip testa i način izvođenja

Congo Red agar test se koristi za identifikaciju glavnih strukturnih komponenti matriksa biofilma, curli fimbrija i celuloze. Congo Red agar test se izvodi na čvrstom medijumu (agaru) uz dodatak indikatorskih boja Congo Red i Comassie brilliant blue koje omogućavaju otkrivanje produkcije dve ključne komponente za formiranje biofilma salmonela. Congo Red boja se vezuje za obe komponente, celulozu i curli fimbrije, dok

je Comassie brilliant blue ograničena samo na apsorpciju od strane proteinskih komponenti matriksa biofilma (curli fimbrije). Na osnovu apsorpcije indikatorskih boja od strane strukturnih komponenti matriksa biofilma na Congo Red agaru se formiraju fenotipski različite kolonije. Congo Red agar test je izveden prema metodi koju je opisao Römling (2005).

Congo Red agar je pripremljen na sledeći način: U erlenmajer bocu je odmereno 10g/L Bacto Tryptone (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA), 5g/L Bacto Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) i 15g agara, i rastvoreno sa 800 mL destilovane vode. Pripremljena podloga je sterilisana autoklaviranjem na 121°C za 15 minuta. Rastvor indikatorskih boja je odvojeno pripremljen. U 100 mL destilovane vode rastvoreno 0,004g (40 mg/L) Congo Red boje (MP Biomedicals, LCC, France) i u drugih 100 mL destilovane vode rastvoreno je 0,002g (20 mg/L) Comassie brilliant blue G 250 (Sigma, Sigma-Aldrich, United Kingdom) rastvori boja su autoklavirani na 121°C za 15 minuta i ohlađeni na 55°C, zatim su dodati u osnovnu podlogu koja je prethodno ohlađena na 55°C. Pripremljen Congo Red agar je razliven u Petri šolju, debljine 5 mm, zatvoren zaštitnim poklopcem i ostavljen na sobnoj temperaturi da se potpuno ohladi. Na pripremljen Congo Red agar pomoću eze je tehnikom pikiranja inokulisan svaki *Salmonella* izolat u duplikatu. Ploče su postavljene u inkubator bez okretanja Petri šolje i inkubirane 5 dana na dve temperature 20°C i 37°C.

Interpretacija rezultata izvedena je na osnovu morfotipova kolonija ranije opisanih za *S. Typhimurium* (Römling, 2005; Malcova i saradnici, 2008):

- **RDAR** (*red, dry and rough*); kolonije crvene do ljubičaste boje, suve, naborane površine i neravnih ivica (R-forma), karakterističan za sojeve koji produkuju obe ključne komponente matriks biofilma: *curli* fimbrije i celulozu,
- **PDAR** (*pink, dry and rough*) kolonije roze boje, suve, naborane površine, neravnih ivica, R-forma, karakterističan za sojeve koji produkuju samo celulozu, ali ne i *curli* fibrije),
- **BDAR** (*braon, dry and rough*) kolonije braon boje, suve, naborane površine i neravnih ivica, karakterističan za sojeve koji produkuju *curli* fimbrije ali ne i celulozu),

- **SAW** (*smoth and white*) kolonije bele boje, glatke (S forme) karakteristične za sojeve koji ne produkuju ni curli fibrije ni celulozu) i
- **SBAM** (*smoth, brown and mucoid*) kolonije braon boje, glatke površine, mukoidne; karakterističan za sojeve koji ne produkuju ni fimbrije ni celulozu a sadrže kapsularne polisaharide)

U Congo Red agar test kao pozitivna kontrola korišćene su referentne kulture *S. Typhimurium* ATCC 14028 (RDAR morfotip) i *S. Enteritidis* ATCC 13076 (BDAR morfotip). Congo Red agar test je ponovljen tri puta za svaki izolat.

4.3.2. Pelikula test – princip testa i način izvođenja

Princip testa: Biofilm koji neke vrste bakterija formiraju na granici dva agregatna stanja (uobičajeno tečnost- vazduh) u literaturi je poznat pod nazivom "pelikula." Ispitivanje sposobnosti da prave pelikulu na granici dva agregatna stanja, jedan je od načina ispitivanja produkcije biofilma kod *Salmonella* vrsta. U ovom ispitivanju, pelikula test je izveden prema proceduri opisanoj od strane Vestby i sar. (2009a). Za izvođenje pelikula testa korišćene su dve tečne podloge (TSB i LB), a test je izveden za 6 dana na dve temperature inkubacije (20°C i 37°C).

Izvođenje pelikula testa: U plastične epruvete sa 3,9 ml TSB i LB bujona, inokulisano je 100 µl 18h inkubirane kulture svakog izolata *Salmonella* u TSB. Epruvete su inkubirane 6 dana na temperaturama od 20°C i 37°C. Posle inkubacije sadržaj epruveta je uklonjen pipetiranjem, i svaka epruveta isprana tri puta sa 5 mL sterilnog fiziološkog rastvora. Epruvete su nakon ispiranja osušene postavljanjem u invertnu poziciju tokom 3-5h na sobnoj temperature. Pelikula (biofilm) formirana na rubovima granice dva agregatna stanja (tečnost-vazduh) je fiksirana dodatkom 5 mL 96% etanola, tokom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Posle fiksiranja, alkohol je odstranjen odlivanjem, epruvete osušene u invertnoj poziciji na sobnoj temperaturi. Obojavanje pelikule (biofilma) izvedeno je sa 0,3% rastvorom boje Kristal-violet (Fluka, Sigma-Aldrich-Belgium, kat.br. 61135) za 10 min na sobnoj temepraturi. Ispiranje boje izvedeno je sterilnim fiziološkim rastvorom sve dok je bilo vidljivog otpuštanja boje. Epruvete su potom postavljene u invertnu poziciju da se osuše na sobnoj temperaturi.

U pelikula testu kao pozitivne kontrole korišćene su referentne kulture *S. Typhimurium* ATCC 14028 i *S. Enteritidis* ATCC 13076, dok su negativne kontrole bile epruvete sa korišćenim tečnim podlogama TSB i LB bujon. Pelikula test je ponovljen tri puta za svaki izolat.

Sposobnost stvaranja pelikule (produkcije biofilma na granici dva agregatna stanja tečnost/vazduh) procenjena je na osnovu sledećih kriterijuma:

- **Jaki biofilm produceri** – sojevi koji formiraju čvrstu, stabilnu pelikulu deblju od 1 mm (+++),
- **Umereni biofilm produceri** – sojevi koji formiraju stabilnu, pelikulu srednje debljine do 1mm (++) ,
- **Slabi biofilm produceri** – veoma tanka pelikula, (tanja od 1 mm) (+),
- **Sojevi koji ne produkuju biofilm** – sojevi koji ne produkuju vidljivu pelikulu.

4.3.3. Test na mikrotitracionim pločama upotrebom boje kristal-violet

Test na mikrotitar pločama je indirektna kvantitativna metoda za ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma kod različitih vrsta bakterija, u kojoj se o količini bakterija koje rastu na površini udubljena mikrotitracione ploče (formiraju biofilm vezivanjem za površinu plastike), posredno zaključuje na osnovu količine boje (kristal violet) koje bakterije vezuju za sebe. Test se očitava spektrofotometrijski merenjem optičke prozračnosti.

4.3.3.1. Priprema suspenzija izolata *Salmonella* spp. za izvođenje testa na mikrotitracionim pločama

Izolati *Salmonella* spp. su do početka ispitivanja čuvani umnoženi u tečnoj hranljivoj podlozi - tripton soja bujonu (TSB, CM0129, Oxoid, England) sa dodatkom 15% krioprotektora - glicerola na temperaturi od - 20°C. Pre izvođenja testa na mikrotitracionim pločama, svi izolovani sojevi su umnoženi na krvnom agaru, tehnikom retkog zasejavanja da bi se dobile pojedinačne kolonije. Ploče su inkubirane na temperaturi od 37°C tokom 24h ± 3h. Za umnožavanje izolata korišćen je krvni agar (kao neselektivna podloga) u cilju isključivanja potencijalne kontaminacije suspenzija *Salmonella*. Jedna karakteristična kolonija kulture *Salmonella* (do 1 mm u prečniku) koja je rasla na krvnom agaru, inokulisana je u 5 mL puferovane peptonske vode

(Buffered peptone water, CM1049, Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) i inkubirana 24h ± 3h na temperaturi od 37°C. Tako pripremljena suspenzija u puferovanoj peptonskoj vodi je homogenizovana na vorteksu i 100 µL suspenzije je inokulisano u 3,9 mL sveže pripremljene dve vrste podloga: tripton soja bujon (TSB, CM0129, Oxoid, England) i Luria Bertani bujon bez soli (LB, Becton, Dickinson and Company, France) pri čemu je dobijeno razređenje od 1:40. Gustina pripremljenih suspenzija određivana je standardnom tehnikom brojanja kolonija iz serije desetstrukih razređenja, inokulacijom XLD agara. Brojanjem izraslih kolonija na XLD agaru, utvrđeno je da su pripremljene suspenzije (koje su ujedno inokulum za izvođenje testa na mikrotitracionim pločama) gustine: $1-5 \times 10^8$ CFU/mL.

Luria Bertani bujon, bez dodatka soli ima sledeći sastav:

1. 10g/L Bacto Tryptone (Becton, Dickinson and Company)
2. 5g/L Bacto Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company)
3. 1000 mL destilovane vode

Pripremljena podloga je sterilisana autoklaviranjem na 121°C za 15 minuta.

4.3.3.2. Izvođenje testa na mikrotitracionim pločama sa kristal violet bojom

Test na mikrotitracionim pločama je izveden za svaki izolat *Salmonella* u dve podloge (Trypton soja bujon i Luria bertani bujon), na dve temperature inkubacije (od 20°C i 37°C).

Priprema šeme za izvođenje testa

U testu su korišćene polistirenske mikrotitracione ploče sa 96 udubljenja NUNC (Roskilde, Denmark, Cat.No. 167008), sa ravnim dnom za postavljanje kulture ćelija. Ploče su sterilne i imaju poklopac. Pre izvođenja testa prepremljena je šema kojom je precizirana pozicija svakog izolata na mikrotitar ploči, kao i pozicija negativne i pozitivne kontrole. Negativne kontrole su bile udubljenja mikrotitracione ploče u koja su inokulisane samo hranljive podloge (TSB i LB) korišćene za pripremu suspenzije izolata *Salmonella* i ispitivanje produkcije biofilma (negativne kontrole - NK). Pozitivne kontrole su udubljenja u koja su inokulisane suspenzije referentnih kultura: *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *S. Typhimurium* ATCC 14028 (PK), a koje su pripremljene na isti način kao i suspenzije izolata *Salmonella*. Na jednoj ploči je svaki izolat inokulisan u po 4 udubljenja (Tabela 4.2.), zbog izračunavanja standardne devijacije

izmerenih ekstinkcija. Tako je na jednoj ploči ukupno ispitano 22 izolata u jednoj vrsti podloge (TSB ili LB bujon).

Tabela 4.2. Primer šeme za izvođenje testa na mikrotitar pločama:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	PK
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	PK
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	PK
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	PK
E	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NK
F	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NK
G	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NK
H	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	NK

Inokulacija suspenzija *Salmonella* u mikrotitracione ploče

Prema pripremljenoj šemi za izvođenje testa na mikrotitracionim pločama, u svako udubljenje polistirenske mikrotitracione ploče je inokulisano po 200 μ L tečne podloge (TSB ili LB). Pripremljene suspenzije izolata *Salmonella* su prethodno homogenizovane na vorteksu i inokulisane u odgovarajuća udubljenja mikrotitar ploče, u količini od 20 μ L (prema šemi za izvođenje testa). Inokulacija mikrotitracionih ploča izvedena je u laminarnoj komori, da bi se sprečila mikrobiološka kontaminacija. Nakon inokulacije, ploče su zatvorene poklopcem i inkubirane tokom $48\text{h} \pm 3\text{h}$, bez pomeranja. Na kraju su na svakoj ploči inokulisana udubljenja koja su predstavljala: negativnu kontrolu (4 udubljenja koja su inokulisana sa po 200 μ L podloge (TSB ili LB) i pozitivnu kontrolu (suspenzije referentnih kultura: *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *S. Typhimurium* ATCC 14028).

Odstranjivanje sadržaja iz mikrotitracionih ploča posle isteka perioda inkubacije

Posle isteka perioda inkubiranja, sadržaj iz svakog udubljenja mikrotitracione ploče odstranjena je pipetiranjem, a ploče isprane tri puta sa po 250 μ L sterilnog fiziološkog rastvora u svako udubljenje.

Sušenje ploče

Nakon ispiranja ploče su postavljene u invertnu poziciju i istapkane na papirnu vatu da bi se odstranio ostatak tečnosti iz bazenčića. Zatim su ploče ostavljene u invertnoj poziciji radi sušenja, na sobnoj temperaturi.

Fiksiranje

Salmonella spp. koje su se ireverzibilno vezale u udubljenjima mikrotitracione ploče (biofilm) fiksirane su dodatkom 250 μ l 96% etanola u svako udubljenje mikrotitracione ploče, za 20 minuta na sobnoj temperaturi. Posle isteka tog vremena, sadržaj je ispražnjen pipetiranjem, a ploče ponovo osušene u invertnoj poziciji na sobnoj temperaturi.

Obojavanje kristal violet bojom

Posle sušenja, u svako udubljenje mikrotitracione ploče je inokulisano 250 μ L 0,3% rastvora kristal-violeta (Fluka, Sigma-Aldrich-Belgium, kat.br. 61135) u fiziološkom rastvoru uz dodatak 1% alkohola (radi lakšeg rastvranja boje). Bojenje je izvedeno tokom 20 minuta na sobnoj temperaturi.

Ispiranje boje kristal violet

Nakon 20 minuta, boja je odstranjena iz udubljenja mikrotitar ploče ispiranjem pod slabim mlazom tekuće vode, sve dok je bilo vidljivog otpuštanja boje. Mikrotitar ploče su opet osušene u invertnoj poziciji na sobnoj temperaturi.

Rastvaranje vezane boje i očitavanje rezultata

Kristal violet boja koja je ostala vezana za bakterije, rastvorena je dodavanjem 250 μ L 96% etanola u svako udubljenje mikrotitar ploče (Slika 4.1.). Ploče su ostavljene na sobnoj temperaturi 5 minuta. Intenzitet boje je izmeren merenjem optičke prozračnosti spektrofotometrijski na čitaču: Labsystems Multiscan® MCC/340 i upotrebom filtera talasne dužine od 595 nm.



Slika 4.1. Mikrotitracione ploče u fazi rastvaranja vezanog kristal violeta 96% etanolom (spremne za očitavanje na spektrofotometru)

Interpretacija rezultata dobijenih u testu na mikrotitracionim pločama

Za svaki ispitani izolat *Salmonella*, pozitivnu i negativnu kontrolu, izračunata je srednja vrednost izmerene optičke gustine (O.D.). Granična vrednost (*cut-off*) za O.D. (O.D._c) je definisana kao tri standardne devijacije iznad srednje vrednosti O.D. negativne kontrole.

Na osnovu dobijenih vrednosti optičke prozračnosti, izolati *Salmonella* su procenjeni kao:

Jaki biofilm produceri $OD > (4 \times OD_c)$

Umereni biofilm produceri $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$

Slabi biofilm produceri $OD_c \leq OD \leq (2 \times OD_c)$

Sojevi koji ne produkuju biofilm $OD \leq OD_c$

4.3.4. Skening elektronska mikroskopija

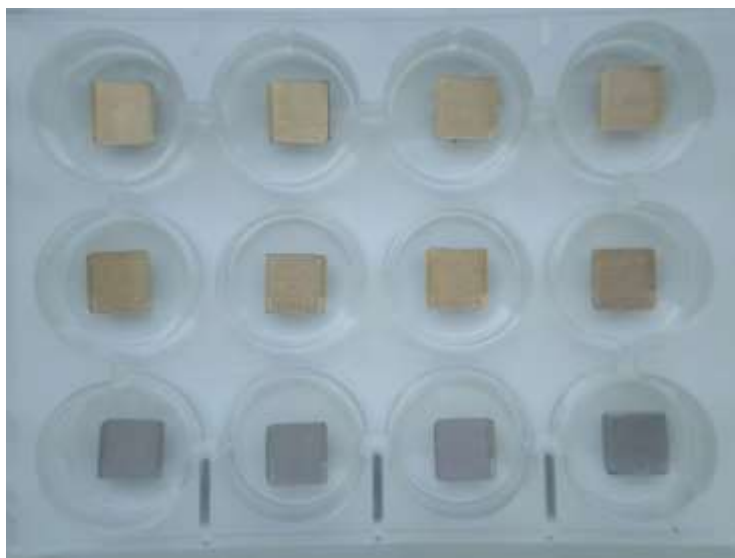
Elektronska mikroskopija je kvalitativna metoda koja je u širokoj upotrebi u ispitivanju bakterijskih biofilmova. Međutim, matriks zrelih biofilmova (ili ekstracelularna polimerična supstanca) je visoko hidrirana struktura koja sadrži i do 95% vode. Da bi se preparat pripremio za posmatranje skening elektronskim mikroskopom, on se mora osušiti, jer je voda inkompatibilna sa vakumom neophodnim za elektronski snop. Dehidratacija preparata oštećuje strukturu matriksa koji se ovom tehnikom značajno deformiše i zapaža kao tanka prevlaka preko ćelija bakterija. Uprkos

ovom nedostatku, zbog izvanrednih sposobnosti rezolucije, skening elektronska mikroskopija je i dalje jedna od najčešće korišćenih tehnika za kvalitativno istraživanje biofilmova koje formiraju bakterije.

Za pripremu biofilmova korišćeni su kuponi od nerđajućeg čelika, dimenzija 1 cm x 1 cm x 0,1 cm. Kuponi su pre upotrebe prokuvani u rastvoru deterdženta tokom 10 minuta i isprani pet puta destilovanom vodom. Do početka ispitivanja, kuponi su čuvani u 95% etanolu, a neposredno pre upotrebe sterilisani opaljivanjem na plamenu. Kuponi su zatim postavljeni odvojeno u udubljenja sterilne polistirenske ploče *Nunc* (*Roskilde, Denmark*) sa 12 udubljenja.

Za pripremu biofilmova odabrana su dva izolata: *S. Montevideo* i *S. Enteritidis* i referentna kultura *S. Typhimurium* ATCC 14028. Izolati su odabrani na osnovu rezultata dobijenih u testu na Congo Red agaru (formirali su kolonije RDAR morfotipa) i rezultata testa na mikrotitracionim pločama upotrebom boje kristal-violet (na osnovu izmerenih vrednosti optičke prozračnosti procenjeni su kao jaki biofilm produceri). Za pripremu biofilma na kuponima nerđajućeg čelika, od odabranih izolata, kao i referentne kulture *S. Typhimurium* ATCC 14028, pripremljene su suspenzije u dve podloge LB i TSB, na isti način kao za test na mikrotitracionim pločama sa kristal violet bojom, inkubacijom na temperaturama od 20°C i 37°C. Suspenzija svakog soja je inokulisana u količini od 100 µL na površinu kupona od nerđajućeg čelika. Adherencija bakterija na kupone omogućena je za 3h na temperaturama od 20°C i 37°C, posle čega je svaki kupon ispran sa 3 mL sterilnog fiziološkog rastvora, da se otklone nevezane ćelije bakterija. Kuponi su zatim prelivevi sa 2 ml sterilnog tripton soja bujona ili Luria Bertani bujona i inkubirani 48 h ± 3h na temperaturi od 20°C i 37°C. Nakon isteka perioda inkubacije, kuponi su izvađeni iz bazenčića i isprani sterilnim fiziološkim rastvorom da bi se uklonile nevezane ćelije bakterija i podloga. Kuponi su zatim fiksirani potapanjem u 4% rastvor formaldehida preko noći na temperaturi od 5°C. Posle fiksacije, kuponi su isprani dva puta sterilnom destilovanom vodom i dehidrirani potapanjem u vodene rastvore etanola rastućih koncentracija od 30%, 50%, 60%, 70% i 90%, po pet minuta u svakom. Na kraju su kuponi tri puta potopljeni po deset minuta u koncentrovani etanol (96%) i ostavljeni na vazduhu da se osuše. Osušeni preparati napareni su zlatom na uređaju Sputter Coater SCD 005, BALTEC SCAN (WD=50mm,

za 90s, struja 30mA) i posmatrani skening elektronskim mikroskopom JMS SEM 6460 LV, (napon ubrzanja 25 KV, na WD od 20 do 8 mm).



Slika 4.2. Kuponi nerđajućeg čelika pripremljeni za SEM (prvi i drugi red). Kuponi od nerđajućeg čelika pre naparavanja zlatom (treći red).

4.4. Ispitivanje izolata na genetički diverzitet primenom – *Pulsed - field gel electrophoresis (PFGE)*

U cilju ispitivanja mogućnosti klonalne perzistencije, izolati koji su ponavljano izolovani tokom dvogodišnjeg perioda, a koji su poreklom iz istih mešaona, ispitani su na genetički diverzitet primenom *pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)*.

Razvoj molekularnih tehnika istraživanja pružio je dokaze da pojedini serotipovi *Salmonella* mogu perzistirati mesecima, pa i godinama u industrijskim pogonima i biti odgovorni za ponavljaju kontaminaciju finalnih proizvoda. U ovom delu eksperimenta ispitani su izolati sledeća tri serovarijeteta *S. Tennessee* (n=7/18), *S. Montevideo* (n=8/15), *S. Infantis* (n=4/12) na genetički diverzitet.

Genotipizacija je izvedena PFGE na izolatima: *S. Tennessee* (n=7/18), *S. Montevideo* (n=8/15), *S. Infantis* (n=4/12). Kulture bakterija su umnožene do rane logaritamske faze u Luria-Bertani (LB) bujonu. Po jedan mililitar je odvojen i centrifugiran 1 minut na 13000 rpm. Čelije bakterija su oprane dva puta EET puferom (EET sadrži u 100 ml: 3,7 g EDTA, 0,38 g EGTA, 0,12 g Tris; pH se podešava sa NaOH na 7,8). Nakon centrifugiranja, ćelijski pelet je resuspendovan u 50 μ L EET pufera i pomešan sa 50 μ l rastopljene 1% agaroze. Smeša je stavljena u kalup i

ostavljena na +4°C da se agar stegne. Rastvor 0,5% SDS i 200 mg proteinaze K u EET puferu je inkubiran na 50°C tokom 30 min da bi se aktivirala proteinaza K. Pojedinačni blokčići su inkubirani sa po 500 µL ovog rastvora preko noći na 50°C. Pod dejstvom SDS (deterdžent) koji razlaže lipide ćelijske membrane i proteinaze K koja razlaže proteine, došlo je do lize bakterijskih ćelija *in situ* u agaroznom gelu i oslobođena DNK je ostala u blokčiću. Makrorestrikcija genomske DNK je vršena sa 20U *SpeI* ili *XbaI* restrikcioni enzima. Restrikcioni fragmenti DNK su razdvojeni elektroforezom u pulsnom polju pomoću 2015 Pulsator sistema (LKB Instruments, Broma, Sweden) opremljenim heksagonalnom elektrodom, tokom 18 h u TBE puferu na 9°C, u polju napona 300V. Gelovi su obojeni etidijum-bromidom i fotografisani pod UV osvetljenjem, a zatim analizirani vizuelnim poređenjem dobijenih profila. Statistička obrada podataka vršena je korišćenjem Wardove metode korelacije koeficijentata između različitih PFGE profila pomoću SPSS softvera verzija 21.0 (*Ward linkage of correlation coefficients between PFGE patterns of different genotypes by using SPSS cluster analysis software*) (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Kao molekularni marker korišćena je *Salmonella* Braenderup H9812.

4.5. Ispitivanje osetljivosti *Salmonella* spp. na antibiotike u uslovima *in vitro*

Osetljivost 100 izolata *Salmonella* na antibiotike ispitana je disk difuzionom metodom prema preporukama CLSI standarda za *Enterobacteriaceae* (*Clinical and Laboratory Standards Institute recommendation* (document M100-S22, CLSI, 2012). Inokulum je pripremljen po metodi direktnog resuspendovanja kolonija koje se ispituju. Soj bakterija koji se ispituje je sa ksiloza lizin dezoksiholatni agara XLD (CM0469, Oxoid, Basingstoke, united Kindom) podloge, pomoću eze i tehnikom retkog zasejavanja presejan na Hranljivi agar (Oxoid) i inkubiran 18h ± 3h na temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije, uzete su 3-4 kolonije približno iste veličine i resuspendovane u sterilnom 0,9% NaCl, dok se nije dobilo zamućenje inokuluma koje je odgovaralo optičkoj gustini 0.5 McFarlanda (DEN-1, Biosan, Latvia). Sterilni bris je natopljen ovom suspenzijom, oceden o zidove epruvete i gustim potezima u tri različita pravca zasejan po površini Mueller-Hinton agara (Oxoid) rotirajući Petri šolju sa agarom pod uglom od 60°. Nakon inokulacije bakterijske suspenzije Petri šolje su ostavljene da se

osuše 10-15 minuta na sobnoj temperaturi. Posle perioda sušenja, sterilnom pincetom postavljeni su diskovi antibiotika na podlogu. Petri šolje su prevrnutе (sa podlogom na gore) i inkubirane 18 h na 37°C. Ispitana je osetljivost na sledeće antibiotike: Amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10 µg), Ampicilin (AMP, 10 µg); Cefpodoxime (CPD, 10 µg); Ceftazidime (CAZ, 30 µg); Cefotaxime (CTX, 30 µg); Ciprofloxacin (CIP, 5 µg); Chloramphenicol (CHL, 30 µg); Gentamycin (GM, 10 µg); Nalidixic acid (NA, 30 µg); Streptomycin (S, 10 µg); Sulphonamide (SSS, 300 µg); Tetracycline (TET, 30 µg); Trimethoprim (TMP, 5 µg); Trimethoprim +Sulfamethoxazole (SXT, 1.25/23.75 µg) (Bio-Rad, France). Kontrola kvaliteta disk difuzione metode je izvedena primenom referentnih sojeva *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Nakon inkubacije (18h) merene su zone inhibicije rasta bakterija oko svakog diska i na osnovu kriterijuma CLSI standarda i proizvođača (Tabela 4.3.), izolati su prema zonama inhibicije svrstavani u tri kategorije: rezistentne (R), intermedijerne (I) i osetljive (S). Izbor antibiotika se bazirao na preporukama CLSI 2012. godine.

Tabela 4.3. Zone inhibicije rasta bakterija oko antimikrobnog diska prema kriterijuma CLSI standarda

Antimikrobni lek	Oznaka diska	Koncentracija leka u disku	Zona inhibicije (mm)		
			Rezistentan	Srednje osetljiv	Osetljiv
Amoxicillin + Clavulanic Acid	AMC	20/10 μ g	≤ 13	14-17	≥ 18
Ampicilin	AM	10 μ g	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefpodoxime	CPD	10 μ g	≤ 13	14-17	≥ 18
Ceftazidime	CAZ	30 μ g	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxime	CTX	30 μ g	≤ 14	15-22	≥ 23
Ciprofloxacin	CIP	5 μ g	≤ 15	16-20	≥ 21
Chloramphenicol	C	30 μ g	≤ 12	13-17	≥ 18
Gentamicin	GM	10 μ g	≤ 13	13-14	≥ 15
Nalidixic acid	NA	30 μ g	≤ 13	14-18	≥ 19
Streptomycin	S	10 μ g	≤ 11	12-14	≥ 15
Sulphonamides	SSS	300 μ g	≤ 12	13-16	≥ 17
Tetracycline	TE	30 μ g	≤ 11	12-14	≥ 15
Trimethoprim	TMP	5 μ g	≤ 10	11-15	≥ 16
Trimethoprim + Sulfamethoxazole	SXT	1.25/23.75 μ g	≤ 10	11-15	≥ 16

4.6. Statistička obrada podataka

Analiza prikupljenih podataka sprovedena je adekvatnim statističkim metodama. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički. Deskriptivna statistika rezultata predstavljena je procentima za kategorijalne varijable, dok su metričke varijable predstavljene srednjom vrednošću i standardnom devijacijom.

U zavisnosti od prirode podataka upotrebljene su parametarske i neparametarske metode. Od parametarskih tehnika sprovedena je Pirsonova korelacija, T test uparenih uzoraka, dok su od neparametarskih sprovedeni Sprirmanova korelacija, Chi square test i Chi square test nezavisnosti. Sva testiranja sprovedena su na nivou statističke značajnosti 0.05.

Veza između metričkih promenljivih izražena je pomoću Pirsonovog koeficijenta korelacije, dok je Spirmanov koeficijent korelacije upotrebljen za

ispitivanje veze između kategorijalnih promjenljivih. Oba koeficijenta primaju vrednosti od -1 do 1. Pozitivan predznak pokazuje da li je korelacija pozitivna ili negativna. Odnosno, da li obe promjenljive zajedno rastu/opadaju ili je rast obrnuto proporcionalan. Gruba klasifikacija jačine korelacije na osnovu apsolutne vrednosti koeficijenta korelacije je:

- od 0 do 0,1 ukazuje da ne postoji korelaciona veza,
- od 0,1 do 0,29 ukazuje na postojanje pozitivne korelacione veze male jačine,
- od 0,3 do 0,59 ukazuje na postojanje pozitivne korelacione veze srednje jačine,
- od 0,6 do 1 ukazuje na jaku pozitivnu vezu između dve slučajne varijable.

Pored jačine veze između dve slučajne varijable, neophodno je utvrditi i statističku značajnost te veze. Da bi veza između dve slučajne varijable bila statistički značajna ona mora biti na nivou značajnosti manjoj od 0.05.

T test uparenih uzoraka upotrebljen je za jednu grupu podataka koji su prikupljeni pod različitim uslovima. Rezultat testa govori da li postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima rezultata dobijenih pod različitim uslovima. Veličina uticaja u ovom testu izračunata je preko eta vrednosti. Ukoliko je eta vrednost veća od 0.1, jačina uticaja je velika.

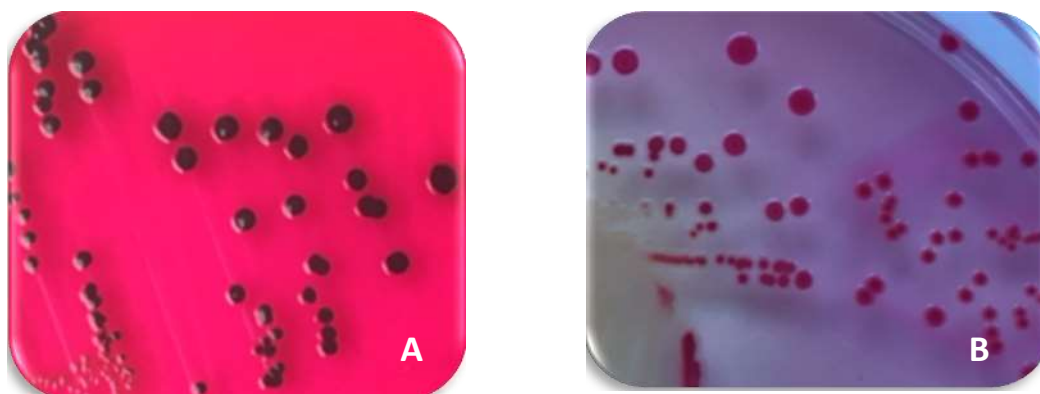
Chi square test upotrebljen je da se ispita da li postoji statistički značajna razlika u frekvenciji kategorija jedne promjenljive dok je Chi square testom nezavisnosti istražena veza između dve kategorijalne promjenljive.

Radi dobijanja relevantnih rezultata neparametarskim statističkim metodama odabrano je da minimalni obim uzorka serovarijeteta bude $n=7$.

5. REZULTATI

5.1. Izolacija i identifikacija izolata *Salmonella*

Svi izolati *Salmonella*, korišćeni u ovom ispitivanju, formirali su na selektivnim podlogama za izolaciju kolonije karakteristične za *Salmonella* spp. Na XLD agaru: okrugle kolonije ružičaste boje sa crnim centrom (Slika 5.1. A) i kolonije crveno-ružičaste boje sa svetlijom periferijom, na *Salmonella* diferencijalnom agaru (Slika 5.1. B).



Slika 5.1. Karakterističan izgled kolonija referentnog soja *S. Typhimurium* ATCC 14028 na XLD agaru (A) i *Salmonella* diferencijalnom agaru posle 24h inkubacije na 37°C (B).

Ispitivanjem biohemijskih osobina izolata, potvrđene su osobine specifične za rod *Salmonella*. Svi izolati su razložili saharozu i glukozu do kiseline, odnosno kiseline i gasa (glukoza), nisu fermentisali laktozu, produkovali su H₂S, nisu hidrolizovali ureu, ni produkovali indol, dali su negativne reakcije Voges Proskauer i β-galaktozidaze i bili su pozitivni u reakciji dekarboksilacije lizina. Očitavanje biohemijskih testova izvedeno je na osnovu preporuka standarda SRPS EN ISO 6579:2008.

Potvrda i serološka tipizacija izolata *Salmonella* je izvedena u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigela*, *Vibrio Cholerae* i *Yersinia enterocolitica*, Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u Beogradu. Rezultati serološke tipizacije izolata *Salmonella* koji su korišćeni u istraživanju, prikazani su u Tabeli 5.1.

Poreklo (vrsta hrane za životinje) serovarijeteta *Salmonella* korišćenih u ispitivanju prikazani su u Tabeli 5.2.

Tabela 5.1. Rezultati serološke tipizacije ispitivanih sojeva *Salmonella* izolovanih iz hrane za životinje

Red. br.	Serovarijetet <i>Salmonella</i>	Antigenška građa	Red. broj	Serovarijetet <i>Salmonella</i>	Antigenška građa
1.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)	27.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)
2.	<i>Salmonella</i> Senftenberg	(1,3,19 : g,s,t: -)	28.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)
3.	<i>Salmonella</i> Thompson	(6,7: k : 1,5)	29.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)
4.	<i>Salmonella</i> Agona	(4,12 : f,g,s: -)	30.	<i>Salmonella</i> Stanleyville	(4,5,12: z ₄ ,z ₂₃ : -)
5.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)	31.	<i>Salmonella</i> Agona	(4,12 : f,g,s: -)
6.	<i>Salmonella</i> Jerusalem	(6,7: z ₁₀ : l,w)	32.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)
7.	<i>Salmonella</i> Agona	(4,12 : f,g,s: -)	33.	<i>Salmonella enterica</i> sub. <i>enterica</i> *	(1,3,19 : i : -)
8.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)	34.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)
9.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)	35.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)
10.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)	36.	<i>Salmonella enterica</i> sub. <i>enterica</i> *	(1,3,19 : i : -)
11.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)	37.	<i>Salmonella</i> Mbandaka	(6,7 : z ₁₀ : e,n,z ₁₅)
12.	<i>Salmonella</i> Senftenberg	(1,3,19 : g,s,t: -)	38.	<i>Salmonella</i> Agona	(4,12 : f,g,s: -)
13.	<i>Salmonella</i> Senftenberg	(1,3,19 : g,s,t: -)	39.	<i>Salmonella enterica</i> sub. <i>enterica</i> *	(1,3,19 : i : -)
14.	<i>Salmonella</i> Mbandaka	(6,7 : z ₁₀ : e,n,z ₁₅)	40.	<i>Salmonella</i> Mbandaka	(6,7 : z ₁₀ : e,n,z ₁₅)
15.	<i>Salmonella</i> Senftenberg	(1,3,19 : g,s,t: -)	41.	<i>Salmonella</i> Stanleyville	(4,5,12: z ₄ ,z ₂₃ : -)
16.	<i>Salmonella</i> Agona	(4,12 : f,g,s: -)	42.	<i>Salmonella</i> Amsterdam	(3,15 : g,m,s : -)
17.	<i>Salmonella</i> Senftenberg	(1,3,19 : g,s,t: -)	43.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)
18.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)	44.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)
19.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)	45.	<i>Salmonella enterica</i> sub. <i>enterica</i> *	(1,3,19 : i : -)
20.	<i>Salmonella</i> Agona	(4,12 : f,g,s: -)	46.	<i>Salmonella</i> Agona	(4,12 : f,g,s: -)
21.	<i>Salmonella</i> Stanleyville	(4,5,12: z ₄ ,z ₂₃ : -)	47.	<i>Salmonella</i> Colindale	(6,7 : r : 1,7)
22.	<i>Salmonella</i> Stanleyville	(4,5,12: z ₄ ,z ₂₃ : -)	48.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)
23.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)	49.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)
24.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)	50.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)
25.	<i>Salmonella</i> Stanleyville	(4,5,12: z ₄ ,z ₂₃ : -)	51.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)
26.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)	52.	<i>Salmonella</i> Senftenberg	(1,3,19 : g,s,t: -)

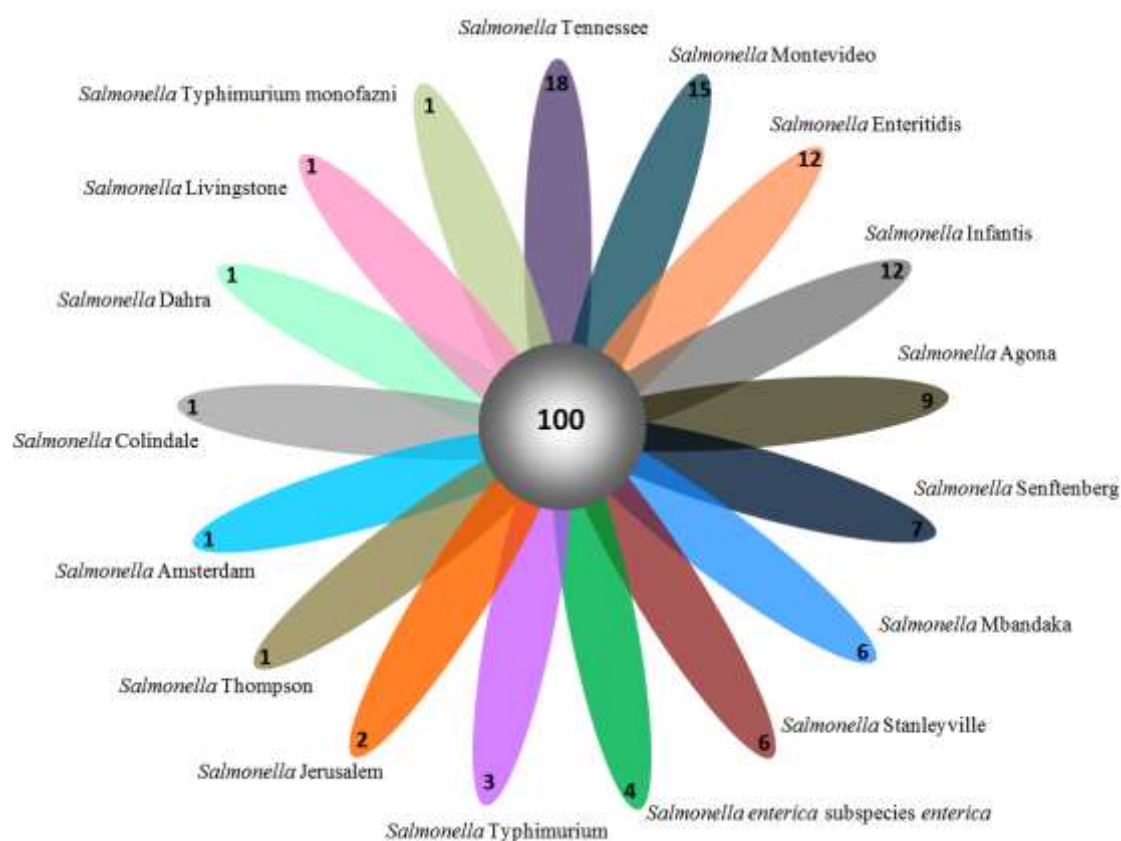
Red. broj	Serovarijetet <i>Salmonella</i>	Antigenska građa	Redni broj	Serovarijetet <i>Salmonella</i>	Antigenska građa
53.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)	77.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)
54.	<i>Salmonella</i> Agona	(4,12 : f,g,s: -)	78.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)
55.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)	79.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)
56.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)	80.	<i>Salmonella</i> Jerusalem	(6,7 : z ₁₀ : l,w)
57.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)	81.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)
58.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)	82.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)
59.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)	83.	<i>Salmonella</i> Agona	(4,12 : f,g,s: -)
60.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)	84.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	(4,5,12 : i :1,2)
61.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)	85.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)
62.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)	86.	<i>Salmonella</i> Senftenberg	(1,3,19 : g,s,t: -)
63.	<i>Salmonella</i> Mbandaka	(6,7 : z ₁₀ : e,n,z ₁₅)	87.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)
64.	<i>Salmonella</i> Mbandaka	(6,7 : z ₁₀ : e,n,z ₁₅)	88.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)
65.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)	89.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)
66.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)	90.	<i>Salmonella</i> Dahra	(17 : b : 1,5)
67.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)	91.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)
68.	<i>Salmonella</i> Stanleyville	(4,5,12: z ₄ ,z ₂₃ : -)	92.	<i>Salmonella</i> Infantis	(6,7 : r : 1,5)
69.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	(4,5,12 : i :1,2)	93.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)
70.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)	94.	<i>Salmonella</i> Mbandaka	(6,7 : z ₁₀ : e,n,z ₁₅)
71.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)	95.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)
72.	<i>Salmonella</i> Typhimurium monofazni	(4,5,12 : i : -)	96.	<i>Salmonella</i> Livingstone	(6,7 : d : l,w)
73.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)	97.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)
74.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	(4,5,12 : i :1,2)	98.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)
75.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)	99.	<i>Salmonella</i> Montevideo	(6,7 : g,m,s: -)
76.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	(9,12 : g,m : -)	100.	<i>Salmonella</i> Tennessee	(6,7: z ₂₉ : -)

* U Nacionalnoj referentnoj laboratoriji „Dr Milan Jovanović Batut“, četiri izolata nisu indetifikovana do serovarijeteta. Utvrđena je pripadnost grupi *Salmonella* i podgrupi *enterica*. Kod ovih izolata utvrđeni su somatski (O) antigeni: 1, 3 i 19 i flagelarni antigen (i) faze 1.

Tabeli 5.2. Poreklo serovarijeteta *Salmonella* korišćenih u ispitivanju

Vrsta hrane	Serovarijetet
Gotove smeše za živinu (n=53)	S. Tennessee (8) S. Agona (3) S. Montevideo (10) S. Enteritidis (11) S. Stanleyville (4) S. Infantis (3) S. Typhimurium (3) S. Mbandaka (4) S. Senftenberg (3) S. Amsterdam (1) S. Colindale (1) S. enterica subspecies enterica (2)
Gotove smeše za svinje (n=32)	S. Tennessee (5) S. Agona (3) S. Montevideo (4) S. Enteritidis (1) S. Infantis (7) S. Typhimurium (1) S. Mbandaka (3) S. Senftenberg (2) S. Jerusalem (2) S. Daha (1) S. Livingstone (1) S. enterica subspecies enterica (2)
Gotove smeše za goveda (n=8)	S. Tennessee (4) S. Agona (2) S. Montevideo (1) S. Senftenberg (1)
Sojina sačma (n=2)	S. Tennessee (1) S. Stanleyville (1)
Sojina pogača (n=2)	S. Infantis (2)
Kukuruz (n=1)	S. Stanleyville (1)
Kukuruzni gluten (n=1)	S. Senftenberg (1)
Pileće mesno koštano brašno (n=1)	S. Thompson (1)

Identifikovano je 16 različitih serovarijeteta *Salmonella*: *S. Tennessee* (n=18), *S. Montevideo* (n=15), *S. Enteritidis* (n=12), *S. Infantis* (n=12), *S. Agona* (n=9), *S. Senftenberg* (n=7), *S. Stanleyville* (n=6), *S. Mbandaka* (n=6), *S. Typhimurium* (n=3), *S. Jerusalem* (n=2), *S. Typhimurium monofazni* (n=1), *S. Thompson* (n=1), *S. Amsterdam* (n=1), *S. Colindale* (n=1), *S. Dahra* (n=1), *S. Livingstone* (n=1). Kod četiri izolata nije bilo moguće utvrditi serovarijetet. Kod njih su identifikovani somatski antigeni: 1, 3, 19 i flagelarni antigeni faze 1.



Grafikon 5.1. Rezultati serološke tipizacije sojeva *Salmonella* izolovanih iz hrane za životinje

Prema dobijenim rezultatima serološke tipizacije izolata, iz hrane za životinje na našem epizootiološkom području, tokom 2 godine ispitivanja (period 2012-2014. godina), najfrekventnije su ustanovljavani serovarijeteti: Tennessee (18%) i Montevideo (15%). Dva serovarijeteta od posebnog značaja za javno zdravlje: *S. Enteritidis* i *S. Infantis*, činili su po 12% izolovanih sojeva.

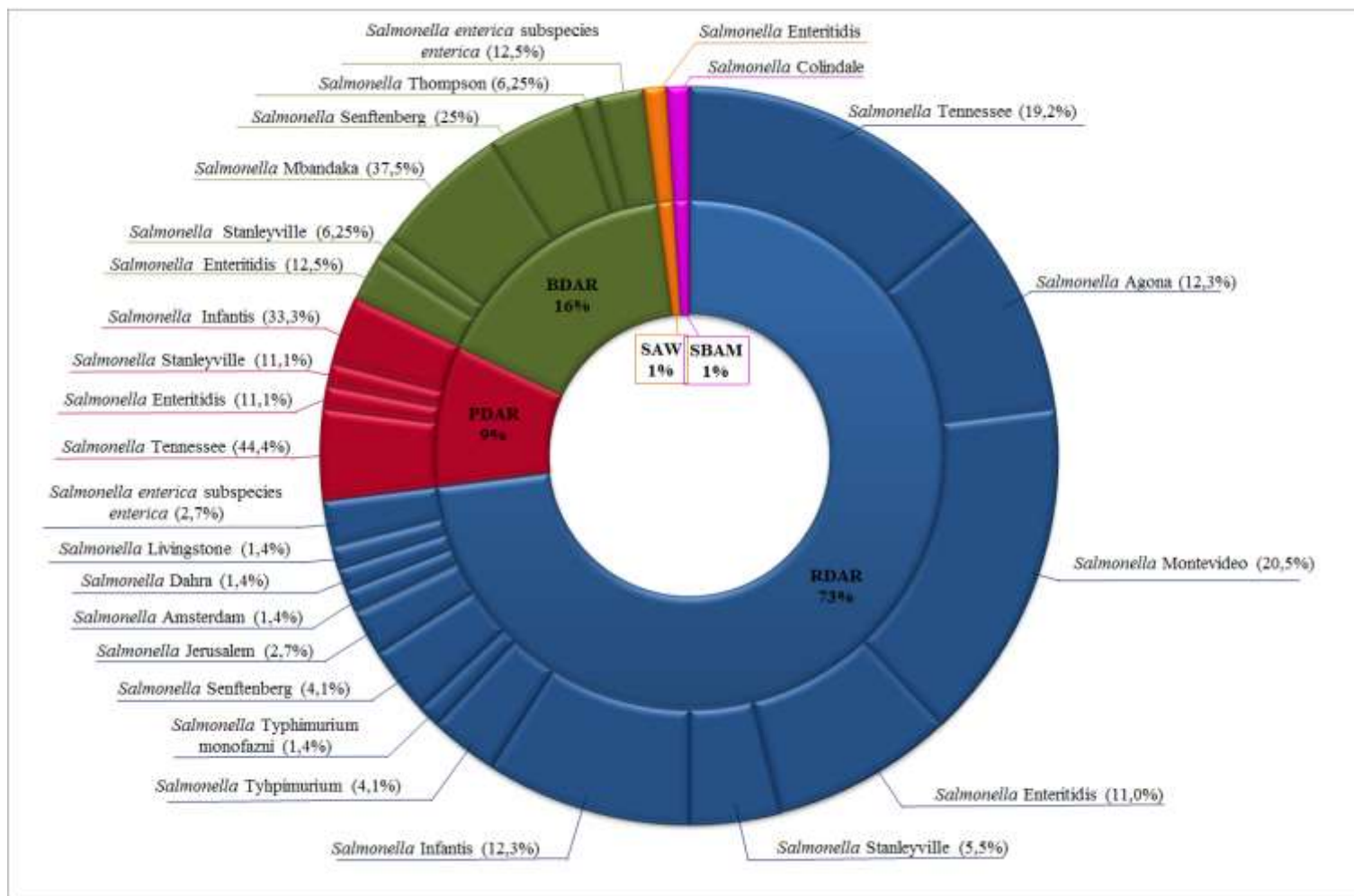
5.2. Congo red agar test

Congo red agar test je primenjen u cilju otkrivanja produkcije jedne ili obe glavne komponente matriksa biofilma salmonela: *curli* fimbrija i celuloze.

Kultivacijom na Congo red agaru, tokom 5 dana na temperaturi od 20°C, izolati *Salmonella* spp. formirali su kolonije sledećih morfotipova:

- RDAR (*red, dry and rough*) - 73 izolata,
- BDAR (*brown, dry and rough*) - 16 izolata,
- PDAR (*pink, dry and rough*) - 9 izolata,
- SAW (*smooth and white*) - 1 izolat,
- SBAM (*smooth, brown and mucoid*) - 1 izolat.

Morfotipovi kolonija na Congo red agaru u odnosu na serovarijetet *Salmonella*, prikazani su na Grafikonu 5.2.



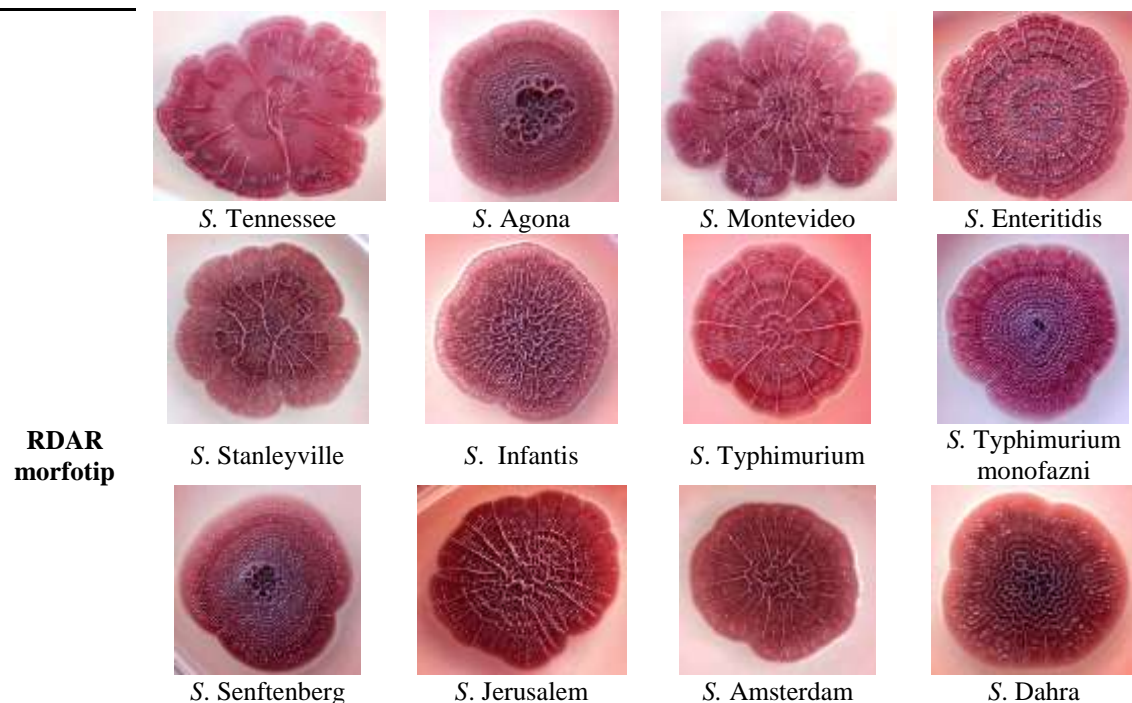
Grafikon 5.2. Prikaz morfortipova kolonija na Congo red agaru u odnosu na serovarijetete *Salmonella* spp. korišćenih u ispitivanju (5 dana inkubacije na temperaturi od 20°C)

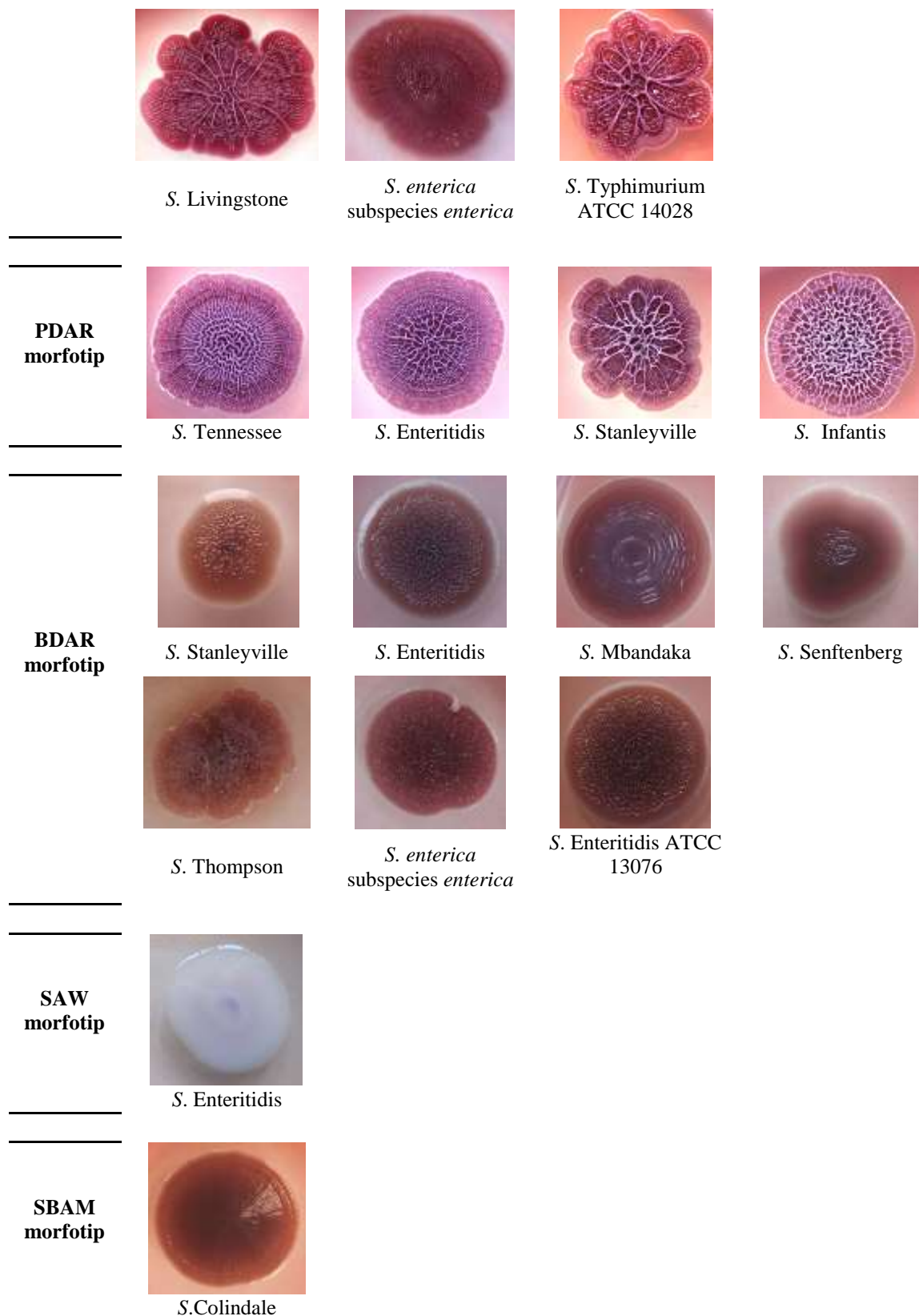
Kolonije RDAR morfotipa na Congo red agaru, inkubacijom na temperaturi od 20°C formirali su svi izolati *S. Montevideo* (15), *S. Agona* (9), *S. Typhimurium* (3), *S. Typhimurium* monofazni serotip (1), *S. Jerusalem* (2), *S. Amsterdam* (1), *S. Dahra* (1) i *S. Livingstone* (1) i većina izolata serovarijeteta: Tennessee (14/18), *Infantis* (9/12), *Enteritidis* (8/12), *Stanleyville* (4/6) i *Senftenberg* (3/7), izolata *S. enterica* subspecies *enterica* (2/4) i referentna kultura *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Kolonije BDAR morfotipa na Congo red agaru, formirali su svi izolati serovarijeteta: Mbandaka (6) i Thompson (1), 4/7 izolata *Senftenberg*, 2/12 izolata *Enteritidis*, 1/6 izolata *Stanleyville*, 2/4 izolata *S. enterica* subspecies *enterica* i referentna kultura *S. Enteritidis* ATCC 13076.

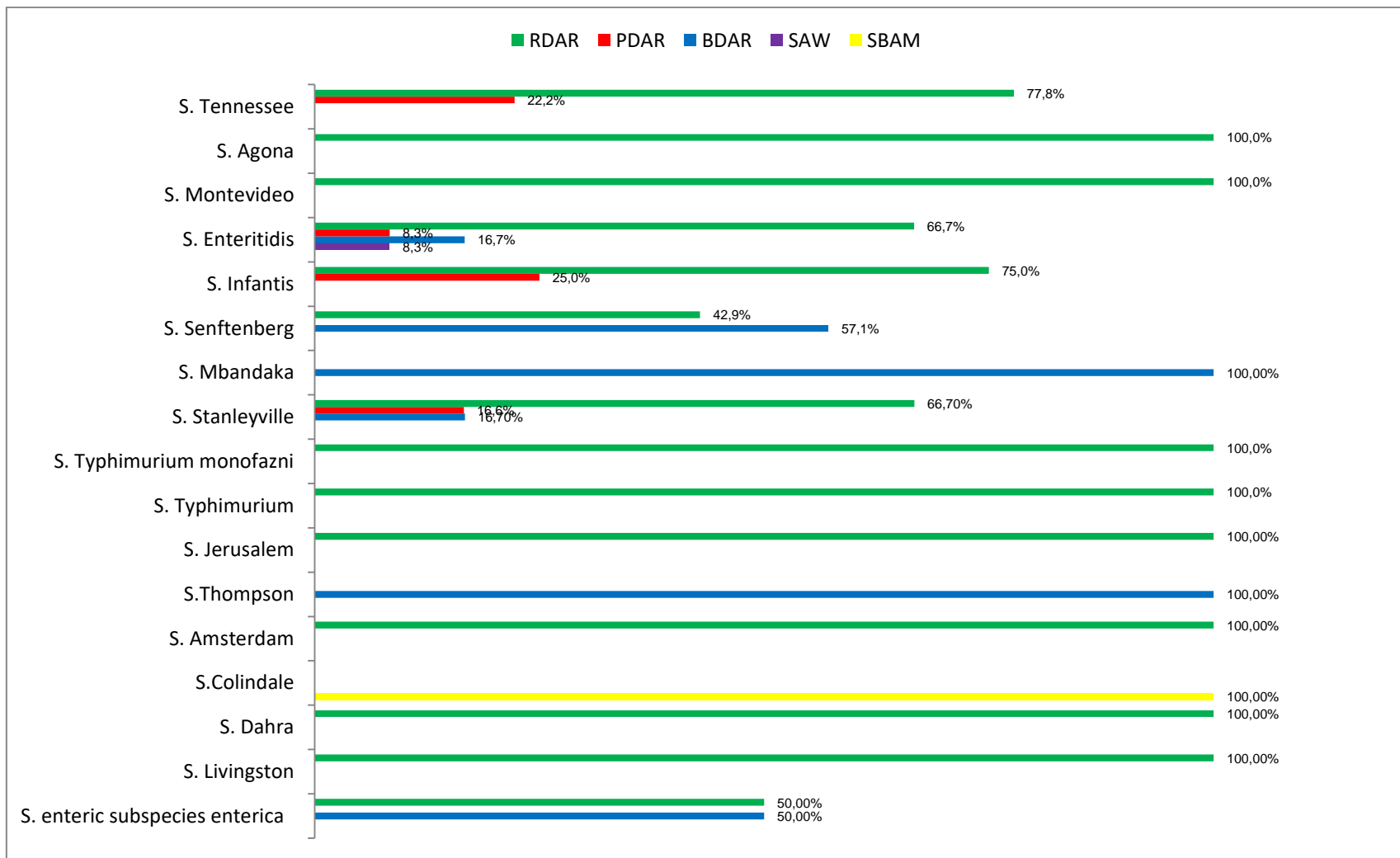
Kolonije PDAR morfotipa na Congo red agaru, formirali su 4/18 izolata *S. Tennessee*, 3/12 izolata *S. Infantis*, 1/12 izolata *S. Enteritidis* i 1/6 izolata *S. Stanleyville*. SAW morfotip kolonije formirao je samo jedan izolat *S. Enteritidis* (n=12). Jedan izolat *S. Colindale* (n=1) formirao je kolonije SBAM morfotipa.

Morfotipovi kolonija koje su izolati *Salmonella* formirali na Congo red agaru nakon inkubacije od 5 dana na temperaturi od 20°C, prikazani su na Slici 5.2. i Grafikonu 5.3.





Slika 5.2. Morfortipovi kolonija izolata *Salmonella* spp. i referentnih kultura korišćenih u ispitivanju na Congo red agaru (5 dana inkubacije na temperaturi od 20°C)



Grafikon 5.3. Morfotipovi kolonija (RDAR, PDAR, BDAR, SAW i SBAM) u odnosu na ispitivane serovarijete *Salmonella enterica*. na Congo red aragu (inkubacija 5 dana na temperaturi od 20°C)

Kultivacijom na Congo red agaru tokom 5 dana na temperaturi od 37°C, svi izolati *Salmonella* i korišćene referentne kulture su formirali kolonije SAW morfotipa, (Slika 5.3.).



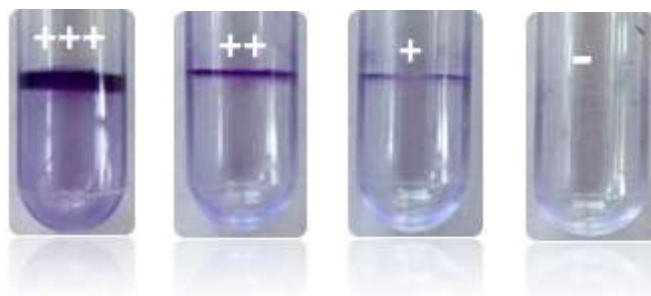
Slika 5.3. SAW morfotip kolonije *Salmonella* spp. na Congo red agaru (inkubacija 5 dana na 37°C).

U ovom istraživanju je 98% izolata *Salmonella* spp. iz hrane za životinje ekspresioniralo jednu ili obe komponente ključne za formiranje matriksa biofilma salmonela, kultivacijom na Congo red agaru tokom 5 dana na temperaturi od 20°C. Inkubacijom na 37°C svi izolati su formirali kolonije SAW morfotipa, svojstvene sojevima koji ne proizvode ni *curli* fimbrije ni celulozu.

5.3. Pelikula test

Fenomen formiranja biofima na granici dva agregatna stanja (tečnost-vazduh) u literaturi je poznat pod nazivom pelikula. Svi izolati su ispitani na sposobnost formiranja pelikule kultivacijom u Luria Bertani i Tripton soja bujonu tokom 6 dana na temperaturama od 20°C i 37°C.

Procena rezultata sposobnosti produkcije pelikule za svaki izolat izvršena je prema kriterijumu prikazanom na Slici 5.4.



Slika 5.4. Tipovi pelikula koje su formirali izolati *Salmonella* spp. korišćeni u ispitivanju: +++ - čvrsta, stabilna pelikula deblja od 1mm (jak biofilm producer); ++ - stabilna pelikula debljine do 1mm (umeren biofilm producer); + - veoma tanka pelikula, tanja od 1mm (slab biofilm producer); - - bez vidljive pelikule (nije biofilm producer).

Rezultati pelikula testa prikazani su u Tabelama 5.3. i 5.4.

Tabela 5.3. Rezultati pelikula testa (inkubacija 6 dana na temperaturama od 20°C i 37°C u Luria Bertani bujonu),

Serovarijetet	Pelikula LB 20°C				Pelikula LB 37°C			
	+++ (%)	++ (%)	+ (%)	- (%)	+++ (%)	++ (%)	+ (%)	- (%)
S. Tennessee (n=18)	9(50,0)	9(50,0)	-	-	-	6(33,3)	8(44,4)	4(22,2)
S. Agona (n=9)	4(44,4)	5(55,6)	-	-	-	-	3(33,3)	6(66,7)
S. Montevideo (n=15)	12(80,0)	2(13,3)	1(6,7)	-	-	-	9(60,0)	6(40)
S. Enteritidis (n=12)	6(50,0)	3(25,0)	3(25,0)	-	12(100)	-	-	-
S. Infantis (n=12)	3(25,0)	6(50,0)	2(16,67)	1(8,33)	-	1(8,3)	8(66,7)	3(25,0)
S. Senftenberg (n=7)	1(14,3)	5(71,4)	1(14,3)	-	-	1(14,3)	2(28,6)	4(57,1)
S. Typhimurium (n=3)	1(33,3)	-	1(33,3)	1(33,3)	-	-	3(100,0)	-
S. Typhimurium monofazni (n=1)	1(100,0)	-	-	-	-	-	1(100,0)	-
S. Mbandaka (n=6)	3(50,0)	3(50,0)	-	-	-	2(33,3)	4(66,7)	-
S. Stanleyville (n=6)	4(66,7)	-	1(16,7)	1(16,7)	-	-	3(50,0)	3(50,0)
S. Jerusalem (n=2)	1(50,0)	-	1(50,0)	-	-	1(50,0)	1(50,0)	-
S. Thompson (n=1)	-	-	1(100,0)	-	-	-	-	1(100,0)
S. Amsterdam (n=1)	-	1(100,0)	-	-	-	-	1(100,0)	-
S. Colindale (n=1)	-	1(100,0)	-	-	-	-	-	1(100,0)
S. Dahra (n=1)	-	-	1(100,0)	-	-	-	1(100,0)	-
S. Livingstone (n=1)	-	1(100,0)	-	-	-	-	1(100,0)	-
S. enterica subspecies enterica (n=4)	1(25,0)	1(25,0)	1(25,0)	1(25,0)	-	-	2(50,0)	2(50,0)
S. Typhimurium ATCC 14028	+++	-	-	-	+++	-	-	-
S. Enteritidis ATCC 13076	-	-	+	-	-	-	+	-

Tabela 5.4. Rezultati pelikula testa (inkubacija 6 dana na temperaturama od 20°C i 37°C u Tripton soja bujonu).

Serovarijetet	Pelikula TSB 20°C				Pelikula TSB 37°C			
	+++ (%)	++ (%)	+ (%)	- (%)	+++ (%)	++ (%)	+ (%)	- (%)
S. Tennessee (n=18)	1(5,6)	2(11,1)	13(72,2)	2(11,1)	-	3(16,7)	15(83,3)	-
S. Agona (n=9)	-	2(22,2)	5(55,6)	2(22,2)	-	1(11,1)	4(44,4)	4(44,4)
S. Montevideo (n=15)	-	3(20,0)	2(13,3)	10(66,7)	-	-	4(26,7)	11(73,3)
S. Enteritidis (n=12)	-	1(8,3)	7(58,3)	4(66,7)	-	5(41,7)	6(50,0)	1(8,3)
S. Infantis (n=12)	-	2(16,7)	5(41,7)	5(41,7)	-	6(50)	3(25,0)	3(25,0)
S. Senftenberg (n=7)	-	1(14,3)	4(57,1)	2(28,6)	-	1(14,3)	4(57,1)	2(28,6)
S. Typhimurium (n=3)	-	2(66,7)	-	1(33,3)	1(33,3)	-	2(66,7)	-
S. Typhimurium mnofazni (n=1)	1(100,0)				1(100,0)			
S. Mbandaka (n=6)	-	1(16,7)	5(83,3)	-	-	-	6(100,0)	-
S. Stanleyville (n=6)	-	-	5(83,3)	1(16,7)	1(16,7)	-	4(66,7)	1(16,7)
S. Jerusalem (n=2)	-	1(50,0)	1(50,0)	-	-	1(50,0)	-	1(50,0)
S. Thompson (n=1)	-	-	-	1(100,0)	-	-	-	1(100,0)
S. Amsterdam (n=1)	-	-	-	1(100,0)	-	-	-	1(100,0)
S. Colindale (n=1)	-	-	1(100,0)	-	-	-	-	1(100,0)
S. Dahra (n=1)	-	-	1(100,0)	-	-	-	1(100,0)	-
S. Livingstone (n=1)	-	-	1(100,0)	-	-	-	1(100,0)	-
S. enterica subspecies enterica (n=4)	1(25,0)	1(25,0)	1(25,0)	1(25,0)	-	-	3(75,0)	1(25,0)
S. Typhimurium ATCC 14028	+++	-	-	-	-	-	+	-
S. Enteritidis ATCC 13076	-	-	+	-	+++	-	-	-

Posle 6 dana inkubacije na temperaturi od 20°C u Luria Bertani bujonu, čvrstu, stabilnu pelikulu deblju od 1mm (+++) formiralo je 46% izolata *Salmonella* spp; stabilnu pelikulu debljine do 1mm (++) formiralo je 37%, tanku pelikulu debljine ispod 1mm (+) 13% izolata, dok 4% izolata nije formiralo vidljivu pelikulu. Inkubacijom na temperaturi od 37°C, 12% izolata je formiralo čvrstu, stabilnu pelikulu (+++), 11% stabilnu pelikulu (++) , 47% izolata veoma tanku pelikulu a 30% izolata nije formiralo pelikulu (-) (Rezultati su prikazani u Tabeli 5.3).

Posle 6 dana inkubacije na temperaturi od 20°C u Tripton soja bujonu, 3% izolata *Salmonella* spp. je formiralo čvrstu, stabilnu pelikulu (+++), 16% izolata formiralo je stabilnu pelikulu (++) , 51% izolata formiralo je tanku pelikulu (+) i 30% izolata je bilo bez vidljive pelikule. Promenom temperature inkubiranja na 37°C u Tripton soja bujonu, 3% izolata je formiralo čvrstu, stabilnu pelikulu (+++), 17% izolata formiralo je stabilnu pelikulu (++) , 53% izolata formiralo je tanku pelikulu (+) i 27% izolata je bilo bez vidljive pelikule (Rezultati su prikazani u Tabeli 5.4.).

Za statističku obradu dobijenih rezultata nisu razmatrani podaci dobijeni za serovarijete: Stanleyville (n=6), Typhimurium (n=3), Typhimurium monofazni serotip (n=1), Jerusalem (n=2), Amsterdam (n=1), Colindale (n=1), Dahra (n=1), Livingstone (n=1), Mbandaka (n=6), Thompson(n=1) i *enterica* subspecies *enterica* (1,3,19 : i : -) (n=1), zato što je njihov broj bio manji od 7.

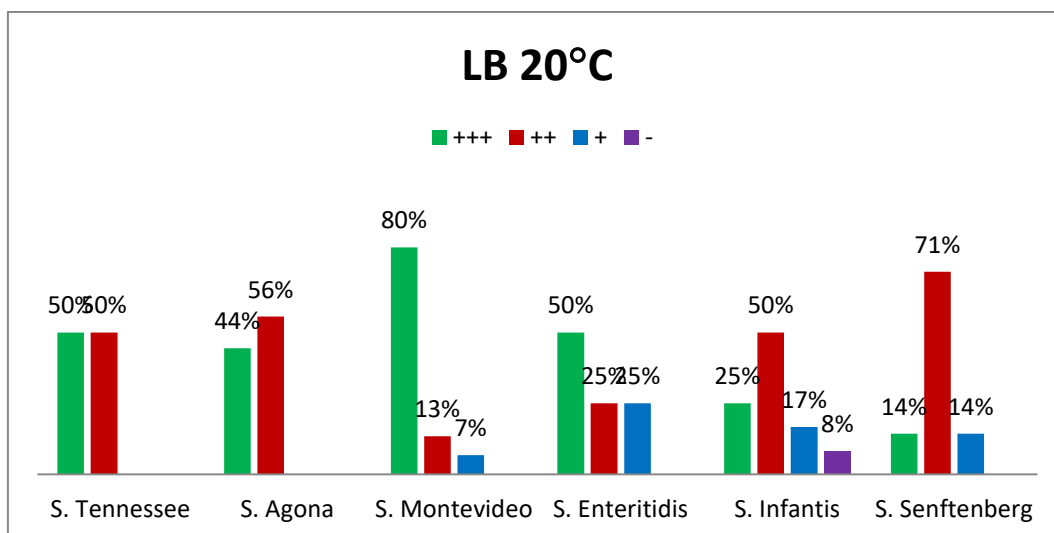
Kultivacija u LB bujonu i inkubacija na 20°C statistički je značajno ($p < 0,01$) uticala na formiranje čvrstih stabilnih (+++) i (++) pelikula, u poređenju sa višom temperaturom inkubacije od 37°C (Grafikoni 5.8. i 5.9).

Kultivacija u TSB bujonu na temperaturi od 20°C i 37°C nije statistički značajno ($p < 0,01$) uticala na formiranje čvrstih(+++) i stabilnih (++) pelikula. Većina izolata je pod ovim uslovima formirala slabu, tanku pelikule (+) ili nije bilo vidljive pelikule (Grafikoni 5.8 i 5.10).

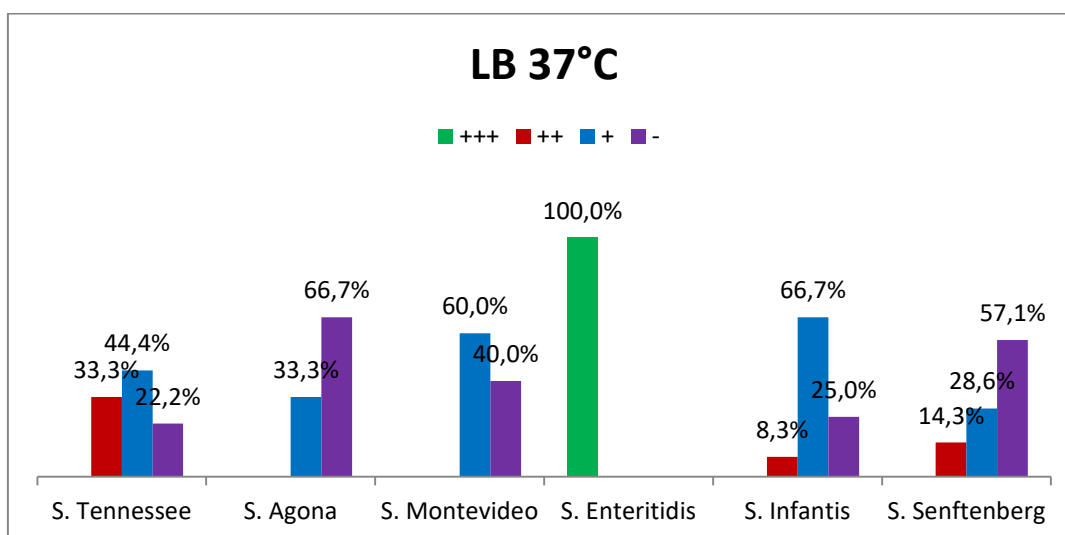
Temperatura inkubacije od 20°C i 37°C nije statistički značajno uticala na sposobnost formiranja pelikule u LB podlozi ($p > 0,01$), dok je statistički značajan uticaj imala na sposobnost formiranja pelikule u TSB podlozi ($p < 0,01$) (Grafikoni 5.9. i 5.10.).

Na temperaturi inkubacije od 20°C nije ustanovljena statistički značajna korelacija ($p > 0,01$) između formiranih tipova pelikula (+++; ++; +) i vrste podloge, kao

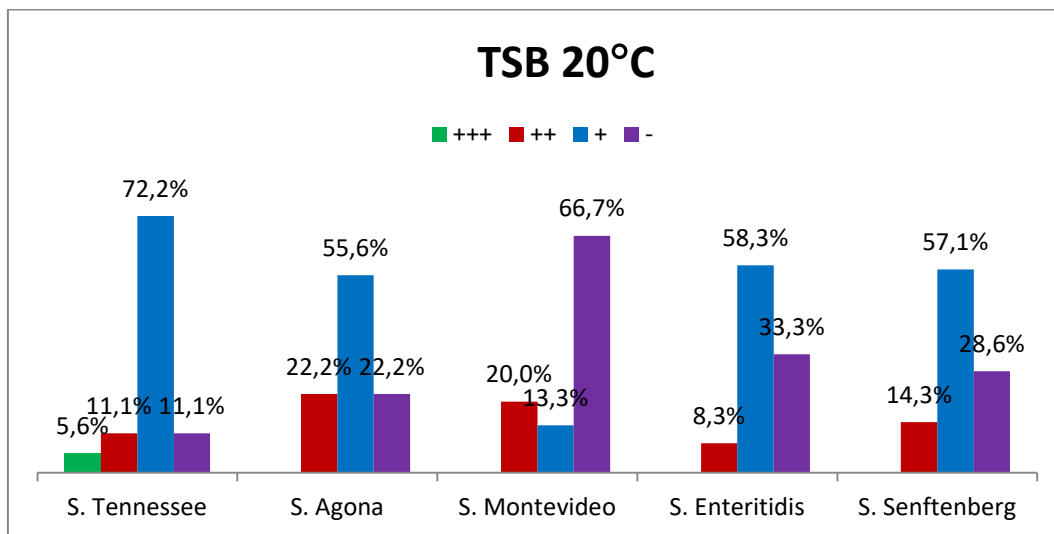
i jačine pelikule i serotipa (Grafikoni 5.4; 5.6. i 5.11). Inkubacijom na 37°C ustanovljena je statistički značajna korelacija ($p < 0,01$) između formiranih pelikula i vrste podloge, kao i statistički značajna veza između jačine pelikule i serotipa (Grafikoni 5.5; 5.7 i 5.12).



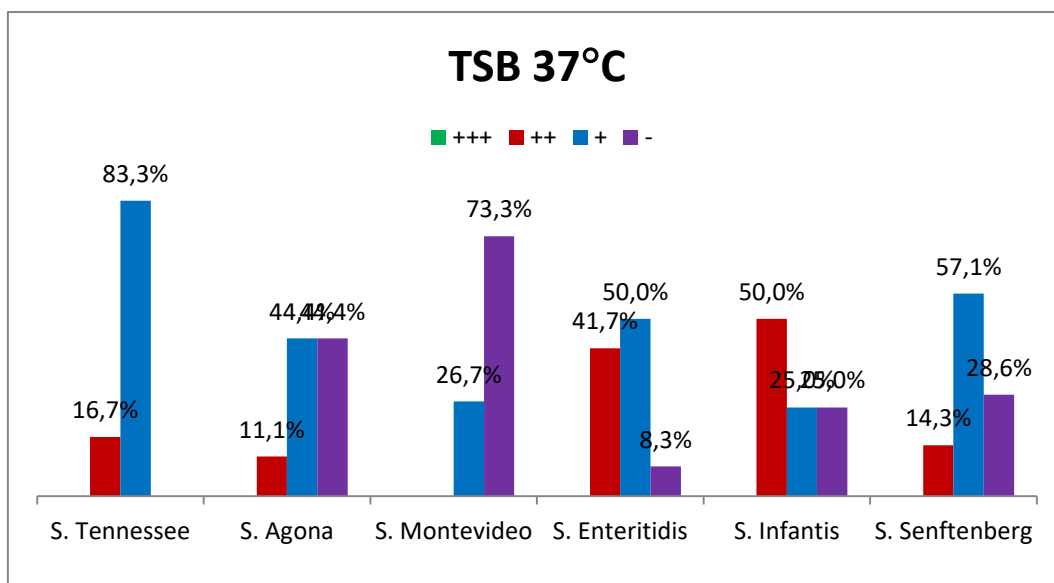
Grafikon 5.4. Rezultati pelikula testa (Luria Bertani bujon, inkubacija na temperaturi od 20°C tokom 6 dana). Legenda: zelena boja: čvrsta debela pelikula (+++); crvena boja: tanka pelikula (++); plava boja: vrlo tanka pelikula (+); ljubičasta boja: odsustvo pelikule (-).



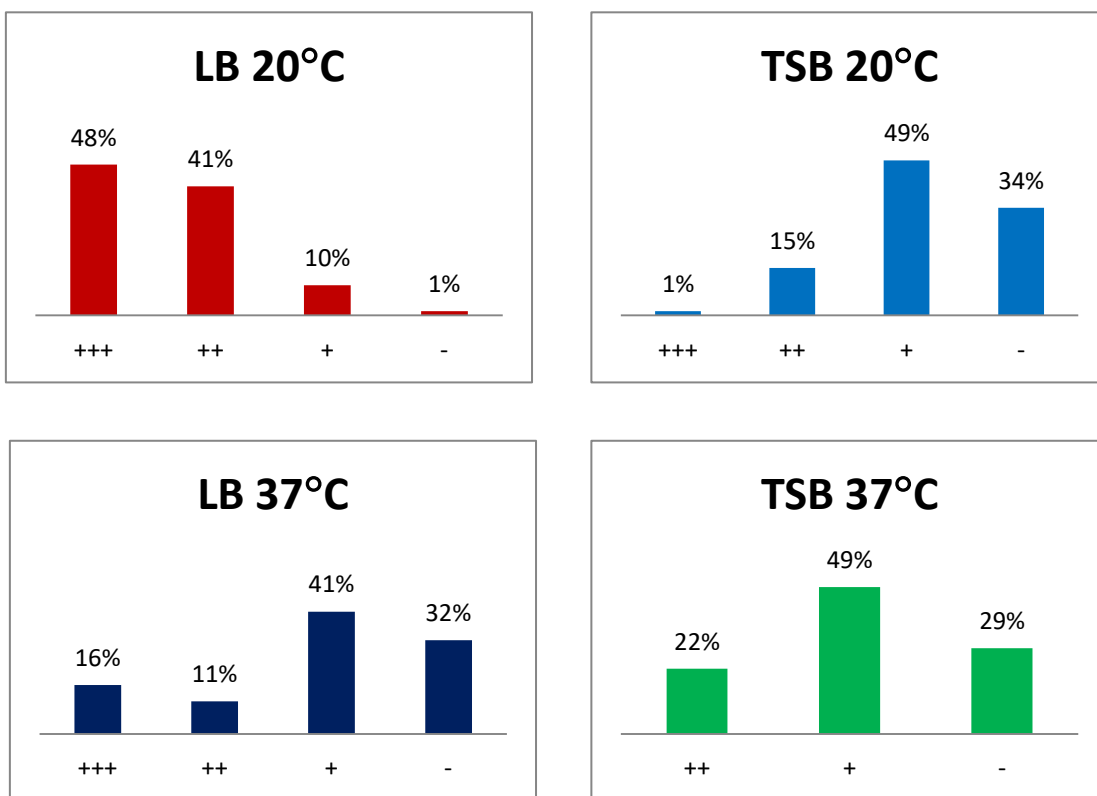
Grafikon 5.5. Rezultati pelikula testa (Luria Bertani bujon, inkubacija na temperaturi od 37°C tokom 6 dana). Legenda: zelena boja: čvrsta debela pelikula (+++); crvena boja: tanka pelikula (++); plava boja: vrlo tanka pelikula (+); ljubičasta boja: odsustvo pelikule (-).



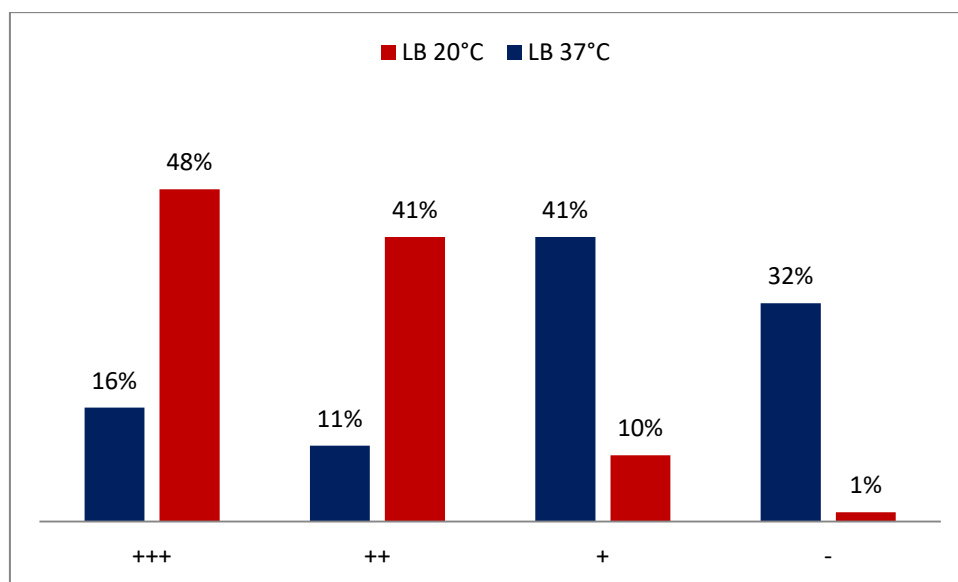
Grafikon 5.6. Rezultati pelikula testa (Trypton soja bujon, inkubacija na temperaturi od 20°C tokom 6 dana). Legenda: zelena boja: čvrsta debela pelikula (+++); crvena boja: tanka pelikula (++); plava boja: vrlo tanka pelikula (+); ljubičasta boja: odsustvo pelikule (-).



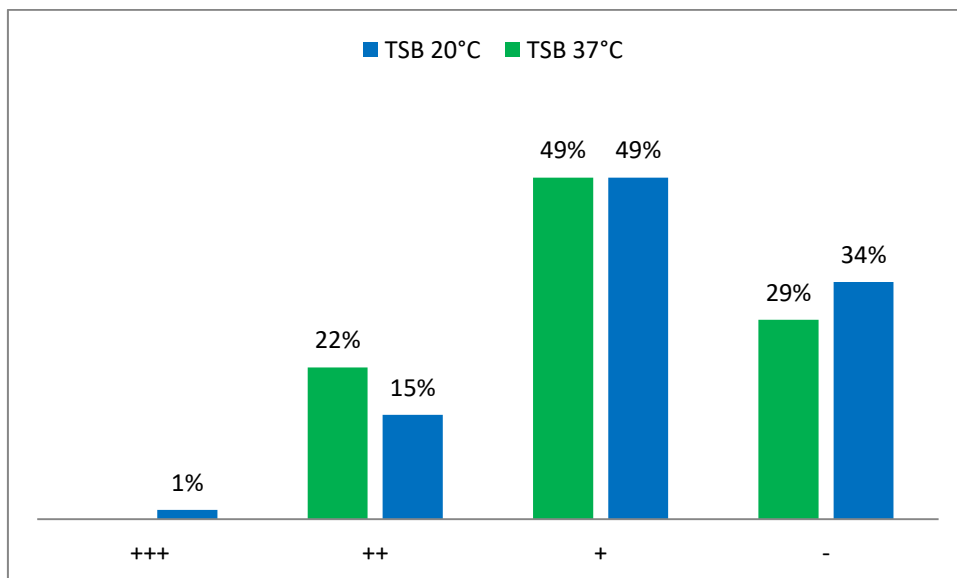
Grafikon 5.7. Rezultati pelikula testa (Trypton soja bujon, inkubacija na temperaturi od 37°C tokom 6 dana). Legenda: zelena boja: čvrsta debela pelikula (+++); crvena boja: tanka pelikula (++); plava boja: vrlo tanka pelikula (+); ljubičasta boja: odsustvo pelikule (-).



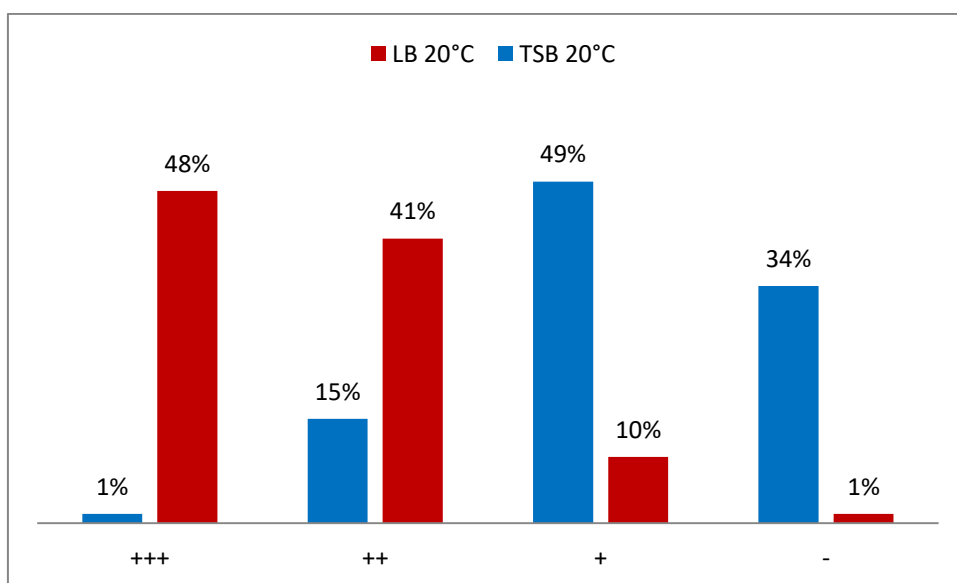
Grafikon 5.8. Rezultata pelikula testa za serovarijete *S. Tennessee*, *S. Montevideo*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Agona* i *S. Senftenberg*.



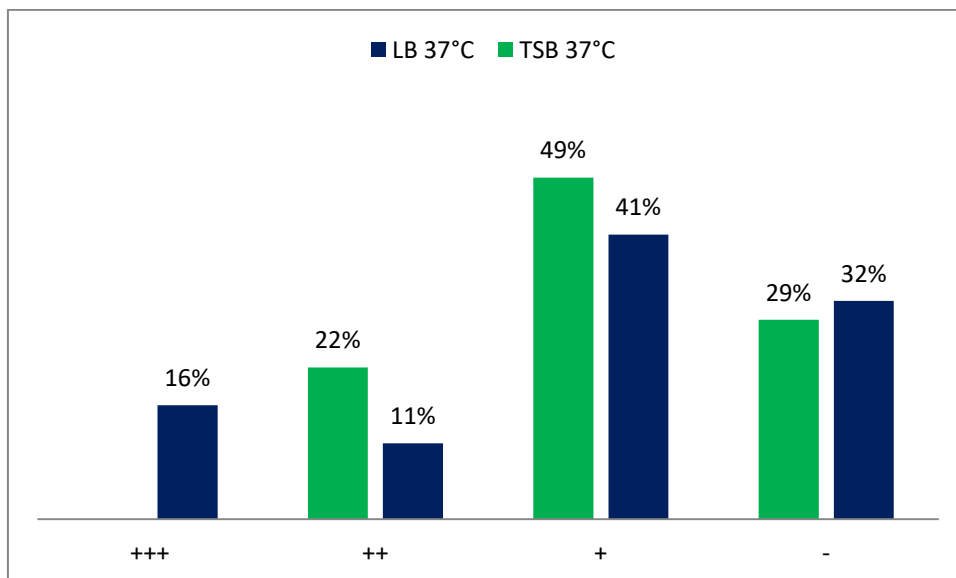
Grafikon 5.9. Spособnost formiranja pelikula u Luria Bertani bujonu tokom 6 dana. Crvena boja: inkubacija na temperaturi od 20°C; plava boja: inkubacija na temperaturi od 37°C.



Grafikon 5.10. Sposobnost formiranja pelikula u Trypton soja bujonu tokom 6 dana.. Plava boja: inkubacija izolata na temperaturi od 20°C; zelena boja: inkubacija izolata na temperaturi od 37°.



Grafikon 5.11. Uticaj podloge na formiranje pelikula serovarijeteta *S. Tennessee*, *S. Montevideo*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Agona* i *S. Senftenberg*. Crvena boja: inkubacija na temperaturi od 20°C u Luria Bertani bujonu; plava boja: inkubacija na temperaturi od 20°C u Trypton soja bujonu.



Grafikon 5.12. Uticaj podloge na formiranje pelikula serovarijeteta *S. Tennessee*, *S. Montevideo*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Agona* i *Senftenberg*. Plava boja: inkubacija na temperaturi od 37°C u Luria Bertani bujonu; zelena boja: inkubacija na temperaturi od 37°C u Tripton soja bujonu.

5.4. Test na mikrotitracionim pločama upotrebom kristal-violet boje

Rezultati dobijeni primenom testa na mikrotitracionim pločama upotrebom kristal-violet boje prikazani su u Tabelama 5.5.; 5.6.; 5.7. i 5.8.

Tabela 5.5. Rezultati testa na mikrotitracionim pločama upotrebom kristal-violet boje (inkubacija 48h u Luria Bertani bujonu, na temperaturi od 20°C)

<i>Salmonella</i> serovarijetet	Formiranje biofilma					
	Jak		Umeren		Slab	
	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD
<i>S.Tennessee</i> (n=18)	8 (44,4)	0,688±0,067	10 (55,6)	0,452±0,081	-	-
<i>S.Agona</i> (n=9)	5 (55,6)	0,941±0,274	4 (44,4)	0,468±0,094	-	-
<i>S.Montevideo</i> (n=15)	12 (80,0)	1,202±0,510	2 (13,3)	0,480±0,106	1 (6,7)	0,238±0,096
<i>S.Enteritidis</i> (n=12)	8 (66,7)	1,158±0,503	1 (8,3)	0,335±0,088	3 (25,0)	0,282±0,014
<i>S.Senftenberg</i> (n=7)	-	-	6 (85,7)	0,406±0,086	1 (14,3)	0,201±0,022
<i>S.Infantis</i> (n=12)	3 (25,0)	0,775±0,063	7 (58,3)	0,471±0,111	2 (16,7)	0,258±0,058
<i>S.Typhimurium</i> (n=3)	-	-	2(66,7)	0,458±0,045	1 (33,3)	0,279±0,018
<i>S.Typhimurium monfazni</i> (n=1)	-	-	1 (100,0)	0,406±0,125	-	-
<i>S.Mbandaka</i> (n=6)	5 (83,3)	0,980±0,454	1 (16,7)	0,619±0,138	-	-
<i>S.Stanleyville</i> (n=6)	4 (66,6)	0,774±0,115	1 (16,7)	0,579±0,133	1 (16,7)	0,180±0,043
<i>S.Jerusalem</i> (n=2)	1 (50,0)	1,252±0,212	1 (50,0)	0,321±0,045	-	-
<i>S.Thompson</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,273±0,039
<i>S.Amsterdam</i> (n=1)	-	-	1 (100,0)	0,342±0,043	-	-
<i>S.Colindale</i> (n=1)	1 (100,0)	0,840±0,169	-	-	-	-
<i>S.Dahra</i> (n=1)	1 (100,0)	0,699±0,146	-	-	-	-
<i>S.Livingstone</i> (n=1)	1 (100,0)	1,814±0,135	-	-	-	-
<i>S. enteric subspecies enterica</i> (n=4)	1 (25,0)	1,465±0,225	1 (25,0)	0,334±0,029	2 (50,0)	0,265±0,013
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-	0,439±0,059	-	-
<i>S.Enteritidis</i> ATCC 13076	-	-	-	-	-	0,283±0,057

Tabela 5.6. Rezultati testa na mikrotitracionim pločama upotrebom kristal-violet boje (inkubacija 48h u Luria Bertani bujonu na temperaturi od 37°C)

<i>Salmonella</i> serovarijetet	Formiranje biofilma							
	Jak		Umeren		Slab		Nisu biofilm produceri	
	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD
<i>S.Tennessee</i> (n=18)	-	-	7 (38,9)	0,470±0,108	10 (55,6)	0,279±0,044	1 (5,5)	0,151±0,017
<i>S.Agona</i> (n=9)	-	-	-	-	6 (66,7)	0,266±0,039	3 (33,3)	0,157±0,011
<i>S.Montevideo</i> (n=15)	-	-	-	-	8 (53,3)	0,207±0,022	7 (46,7)	0,162±0,008
<i>S.Enteritidis</i> (n=12)	12 (100,0)	1,338±0,724	-	-	-	-	-	-
<i>S.Senftenberg</i> (n=7)	-	-	2 (28,6)	0,385±0,031	3 (42,8)	0,213±0,026	2 (28,6)	0,149±0,024
<i>S.Infantis</i> (n=12)	-	-	-	-	8 (66,7)	0,194±0,028	4 (33,3)	0,140±0,006
<i>S.Typhimurium</i> (n=3)	-	-	-	-	2 (66,7)	0,191±0,005	1 (33,3,0)	0,162±0,011
<i>S.Typhimurium monfazni</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,186±0,043	-	-
<i>S.Mbandaka</i> (n=6)	-	-	2 (33,3)	0,402±0,018	4 (66,7)	0,240±0,067	-	-
<i>S.Stanleyville</i> (n=6)	-	-	-	-	5 (83,3)	0,271±0,034	1 (16,7)	0,158±0,004
<i>S.Jerusalem</i> (n=2)	-	-	1 (50,0)	0,515±0,092	1 (50,0)	0,331±0,058	-	-
<i>S.Thompson</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,264±0,043	-	-
<i>S.Amsterdam</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	1 (100,0)	0,155±0,009
<i>S.Colindale</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,243±0,012	-	-
<i>S.Dahra</i> (n=1)	-	-	1 (100,0)	0,356±0,054	-	-	-	-
<i>S.Livingstone</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,212±0,060	-	-
<i>S. enteric subspecies enterica</i> (n=4)	-	-	1 (25,0)	0,390±0,084	3 (75,0)	0,206±0,028	-	-
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-	0,455±0,097	-	-	-	-
<i>S.Enteritidis</i> ATCC 13076	-	1,171±0,289	-	-	-	-	-	-

Tabela 5.7. Rezultati testa na mikrotitracionim pločama upotrebom kristal-violet boje (inkubacija 48h u Tripton soja bujonu na temperaturi od 20°C)

<i>Salmonella</i> serovarijetet	Formiranje biofilma					
	Umeren		Slab		Nisu biofilm produceri	
	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD
<i>S.Tennessee</i> (n=18)	-	-	14 (77,8)	0,230±0,016	4 (22,2)	0,193±0,019
<i>S.Agona</i> (n=9)	-	-	5 (55,6)	0,235±0,017	4 (44,4)	0,174±0,022
<i>S.Montevideo</i> (n=15)	-	-	1 (6,73)	0,240±0,030	14 (93,3)	0,156±0,013
<i>S.Enteritidis</i> (n=12)	-	-	6 (50,0)	0,234±0,020	6 (50,0)	0,186±0,018
<i>S.Senfenberg</i> (n=7)	1 (14,3)	0,424±0,104	6 (85,7)	0,281±0,017	-	-
<i>S.Infantis</i> (n=12)	1 (8,3)	0,436±0,099	1 (8,3)	0,210±0,053	10 (83,4)	0,173±0,016
<i>S.Typhimurium</i> (n=3)	-	-	-	-	3 (66,7)	0,163±0,017
<i>S.Typhimurium monfazni</i> (n=1)	1 (100,0)	0,745±0,149	-	-	-	-
<i>S.Mbandaka</i> (n=6)	-	-	1 (16,7)	0,260±0,035	5 (83,3)	0,169±0,022
<i>S.Stanleyville</i> (n=6)	-	-	4 (66,7)	0,225±0,011	2 (33,3)	0,174±0,032
<i>S.Jerusalem</i> (n=2)	-	-	1 (50,0)	0,231±0,023	1 (50,0)	0,183±0,021
<i>S.Thompson</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,195±0,026
<i>S.Amsterdam</i> (n=1)	-	-	1 (100,0)	0,223±0,037	-	-
<i>S.Colindale</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,163±0,012
<i>S.Dahra</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,198±0,011
<i>S.Livingstone</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,202±0,008
<i>S. enteric subspecies enterica</i> (n=4)	-	-	2 (50,0)	0,292±0,090	2 (50,0)	0,174±0,035
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-	0,242±0,056	-	-
<i>S.Enteritidis</i> ATCC 13076	-	-	-	-	-	0,151±0,022

Tabela 5.8. Rezultati testa na mikrotitracionim pločama upotrebom kristal-violet boje (inkubacija 48h u Trypton soja bujonu na temperaturi od 37°C)

<i>Salmonella</i> serovarijetet	Formiranje biofilma							
	Jak		Umeren		Slab		Nisu biofilm produceri	
	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD	Br. (%)	OD±STD
<i>S.Tennessee</i> (n=18)	-	-	3 (16,7)	0,475±0,046	15 (83,3)	0,340±0,057	-	-
<i>S.Agona</i> (n=9)	-	-	1 (11,1)	0,543±0,154	6 (66,7)	0,271±0,033	2 (22,2)	0,192±0,016
<i>S.Montevideo</i> (n=15)	-	-	-	-	3 (20,0)	0,271±0,037	12 (80,0)	0,197±0,016
<i>S.Enteritidis</i> (n=12)	2 (16,7)	1,139±0,330	1 (8,3)	0,795±0,102	9 (75,0)	0,327±0,074	-	-
<i>S.Senfenberg</i> (n=7)	-	-	-	-	5 (71,4)	0,253±0,017	2 (28,6)	0,170±0,012
<i>S.Infantis</i> (n=12)	-	-	-	-	7 (58,3)	0,242±0,037	5 (41,7)	0,175±0,020
<i>S.Typhimurium</i> (n=3)	-	-	-	-	-	-	3 (100,0)	0,194±0,016
<i>S.Typhimurium monfazni</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	1 (100,0)	0,206±0,038
<i>S.Mbandaka</i> (n=6)	-	-	-	-	6 (100,0)	0,287±0,039	-	-
<i>S.Stanleyville</i> (n=6)	-	-	-	-	5 (83,3)	0,262±0,030	1 (16,7)	0,205±0,064
<i>S.Jerusalem</i> (n=2)	-	-	-	-	2 (100,0)	0,363±0,076	-	-
<i>S.Thompson</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,254±0,057	-	-
<i>S.Amsterdam</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	1 (100,0)	0,165±0,016
<i>S.Colindale</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100,0)	0,310±0,038	-	-
<i>S.Dahra</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	1 (100,0)	0,219±0,021
<i>S.Livingstone</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	1 (100,0)	0,212±0,020
<i>S. enteric subspecies enterica</i> (n=4)	-	-	-	-	4 (100,0)	0,251±0,026	-	-
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-	0,459±0,100	-	-	-	-
<i>S.Enteritidis</i> ATCC 13076	-	0,928±0,175	-	-	-	-	-	-

Testom na mikrotitracionim pločama potvrđena je sposobnost različitih serovarijeteta *Salmonella* izolovanih iz hrane za životinje, da na površini polistirena formiraju biofilm. Sposobnost formiranja biofilma varira između i unutar serovarijeteta, a na formiranje biofilma utiče temperatura inkubacije i sastav hranljive podloge.

Prema izmerenim vrednostima optičke prozračnosti i primenjenih kalkulacija, najpovoljniji uticaj na formiranje biofilma imala je kultivacija izolata *Salmonella* u LB bujonu na temperaturi od 20°C. Pod ovim uslovima, svi izolati su formirali biofilm, pri čemu je 50 izolata procenjeno jakim, 38 izolata umerenim i 12 izolata slabim biofilm producerima. Kultivacija u hranljivo bogatoj podlozi (TSB) na temperaturi od 37°C nepovoljno je uticala na produkciju biofilma.

Zbog malog broja izolata (manje od 7) serovarijeteta: Stanleyville (n=6), Mbandaka (n=6), Typhimurium (n=3), Typhimurium monofazni (n=1), Livingston (n=1), Jerusalem (n=1), Colindale (n=1), Amsterdam (n=1), Thompson (n=1), Dahra (n=1) i *S. enterica* subspecies *enterica* (n=4), (manji od 7), za statističku obradu dobijenih rezultata nisu razmatrani podaci za ove serovarijetete, iako su pojedini bili jaki biofilm produceri: *S. Livingston* ($OD_{595} = 1,814 (\pm 0,135)$), *S. Jerusalem* ($OD_{595} = 1,252 (\pm 0,212)$) i jedan izolat *S. enterica* subspecies *enterica* ($OD_{595} = 1,465 (\pm 0,225)$).

Najpovoljniji uticaj na formiranje biofilma imala je kultivacija izolata u LB podlozi na temperaturi od 20°C. Pod ovim uslovima 80% izolata (12/15) *S. Montevideo* (12/15), 66,7% izolata *S. Enteritidis* (8/12), 55,6% izolata *S. Agona* (5/9), 44,4% izolata *S. Tennessee* (8/18) i 25% izolata *S. Infantis* (3/12) procenjeni su jakim biofilm producerima. Vrednosti dobijenih ekstinkcija (OD_{595}) kretale su se u rasponu od 0,688 do 1,202. Pod istim uslovima kultivacije, 85,7% izolata *S. Senftenberg* (6/7), 55,6% izolata *S. Tennessee* (10/18) i 58,3% izolata *S. Infantis* (7/12), procenjeni su kao umereni biofilm produceri. Izmerene vrednosti optičke gustine (OD_{595}) kretala se u rasponu od 0,335 do 0,480. Svega 7 izolata su bili slabi biofilm produceri (rezultati prikazani na Grafikonu 5.13.). Porast temperature inkubacije na 37°C u istoj podlozi, imao je nepovoljan uticaj na formiranje biofilma, sa izuzetkom dvanaest izolata serovarijeteta *S. Enteritidis* koji su i pod ovim uslovima procenjeni jakim biofilm producerima ($OD_{595} = 1,338 (\pm 0,724)$). Pod ovim uslovima 38,9% izolata *S. Tennessee* (7/18) i 28,6% izolata *S. Senftenberg* (2/7) su procenjeni kao umereni biofilm produceri, dok je 55,6% izolata *S. Tennessee* (10/18), 66,7% *S. Agona* (6/9), 53,3% *S. Montevideo* (8/15), 66,7% *S.*

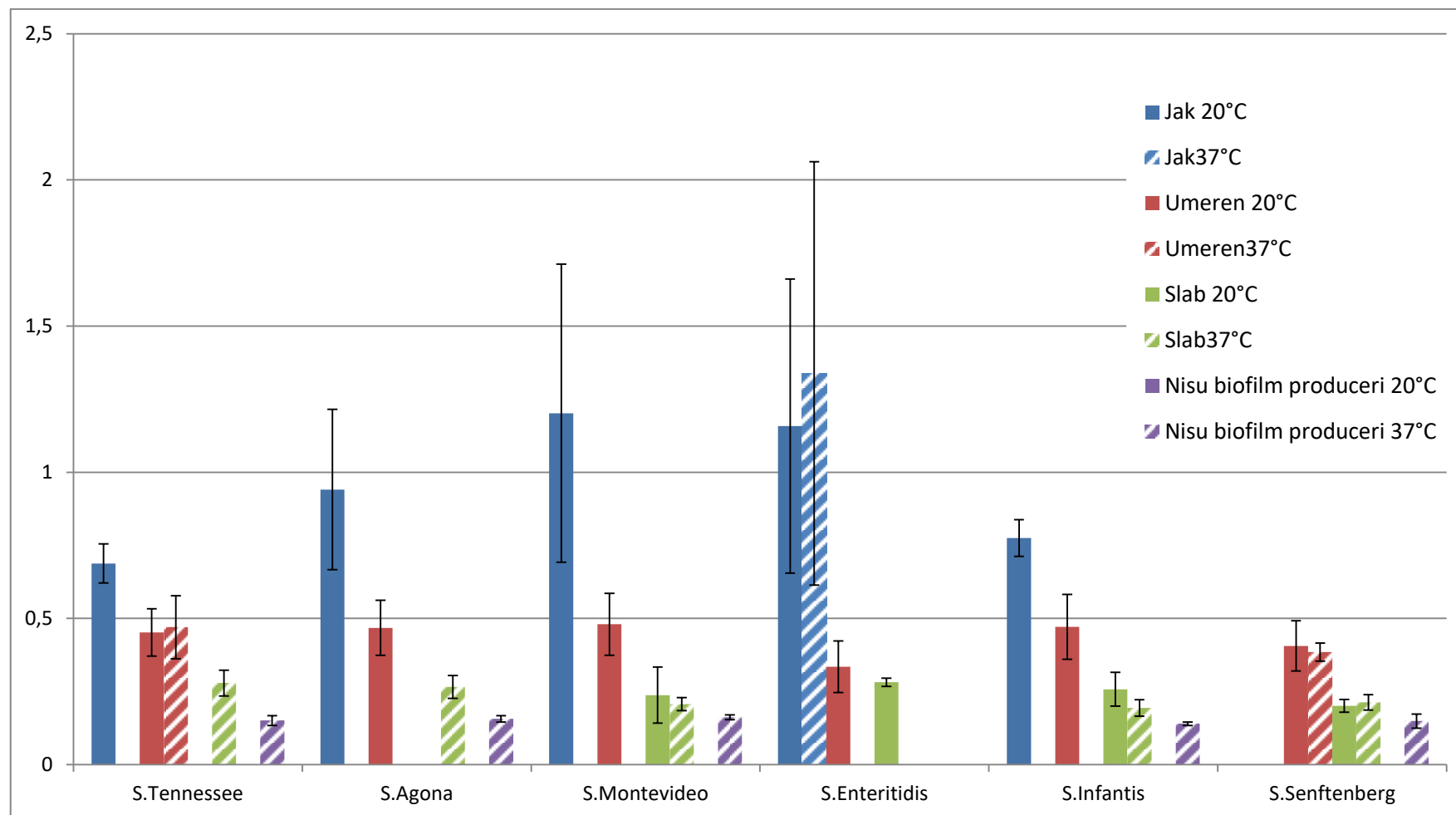
Infantis (8/12) i 42,9% *S. Senftenberg* (3/7) procenjeno slabim biofilm producerima, a 17 izolata nije formiralo merljiv biofilm. Na osnovu dobijenih rezultata testa na mikrotitracionim pločama, utvrđeno je da temperatura inkubacije od 20°C ima statistički značajan uticaj na produkciju biofilma ($p < 0,01$) u odnosu na višu temperaturu inkubacije od 37°C (rezultati prikazani na Grafikonu 5.13.). Kultivacijom izolata u LB podlozi na temperaturi od 20°C, uočava se statistički značajno ($p < 0,01$) više jakih i umerenih biofilm producera u odnosu na inkubaciju na 37°C. Rezultati su prikazani na Grafikonu 5.17.

Nepovoljan uticaj na formiranje biofilma imala je kultivacija izolata u TSB podlozi na obe temperature (20°C i 37°C). Pod ovim uslovima najveći broj izolata nije formirao merljiv biofilm, dok je 33 izolata na 20°C i 45 izolata na 37°C procenjeno slabim biofilm producerima. Vrednosti izmerenih ekstinkcija (OD_{595}) kretale su se u rasponu od 0,210 do 0,340 (Grafikon 5.14.). Kultivacija izolata u hranljivo bogatoj podlozi (TSB) na obe temperature inkubacije, statistički je značajno uticala na smanjenje produkcije biofilma ($p < 0,01$). (Grafikon 5.18).

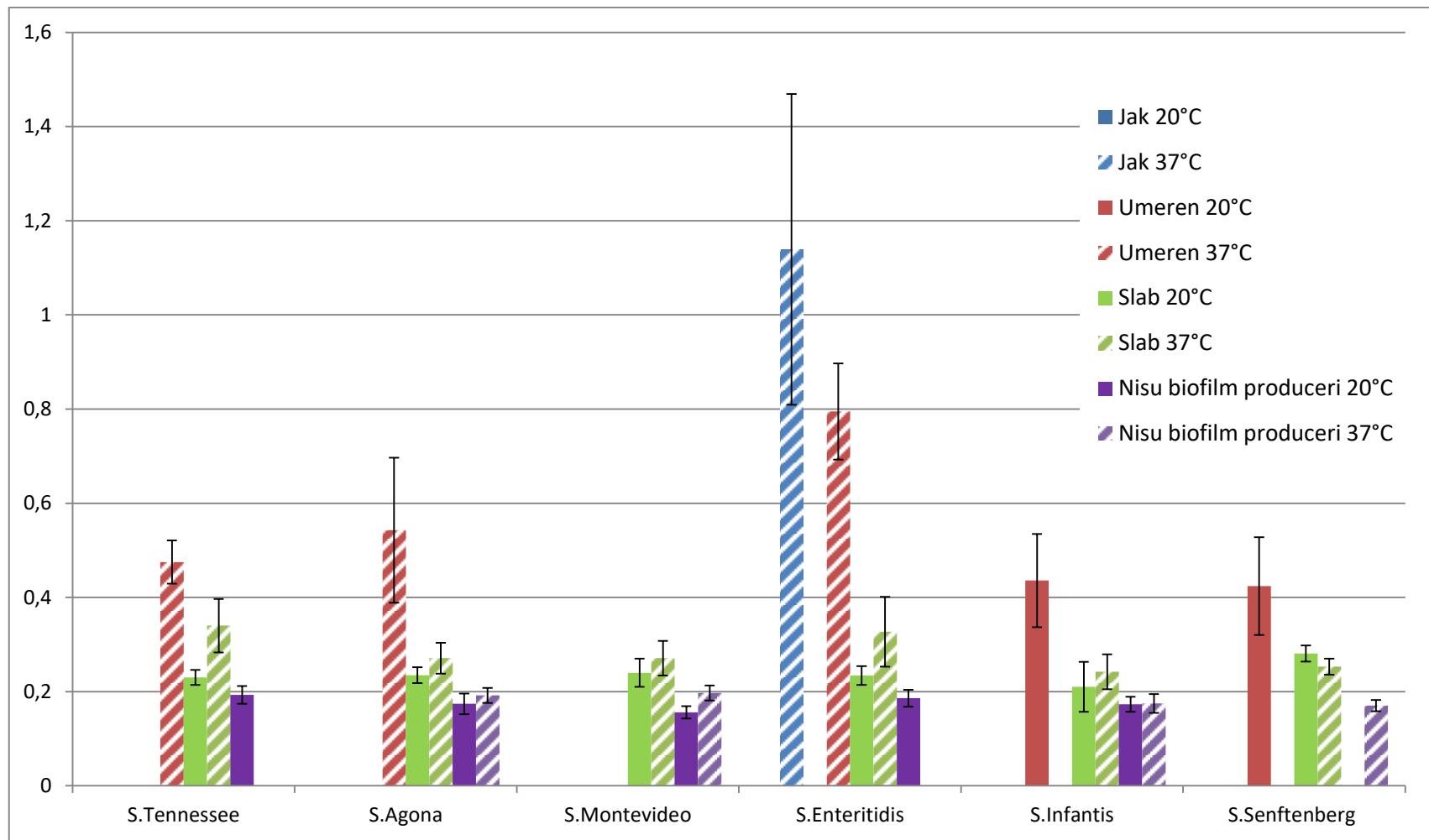
Utvrđeno je statistički značajno ($p < 0,01$) smanjenje srednje vrednosti izmerenih ekstinkcija kultivacijom izolata u TSB podlozi u odnosu na LB (Grafikoni 5.15, 5.16, 5.19. i 5.20).

Kultivacijom izolata u LB i TSB i inkubacijom na temperaturama od 20°C i 37°C uočena je statistički značajna veza između kategorija biofilm producera (jak, umeren, slab) i vrste serovarijeteta ($p < 0,01$). Prikazi dati na Grafikonima 5.21., 5.22, 5.23. i 5.24.

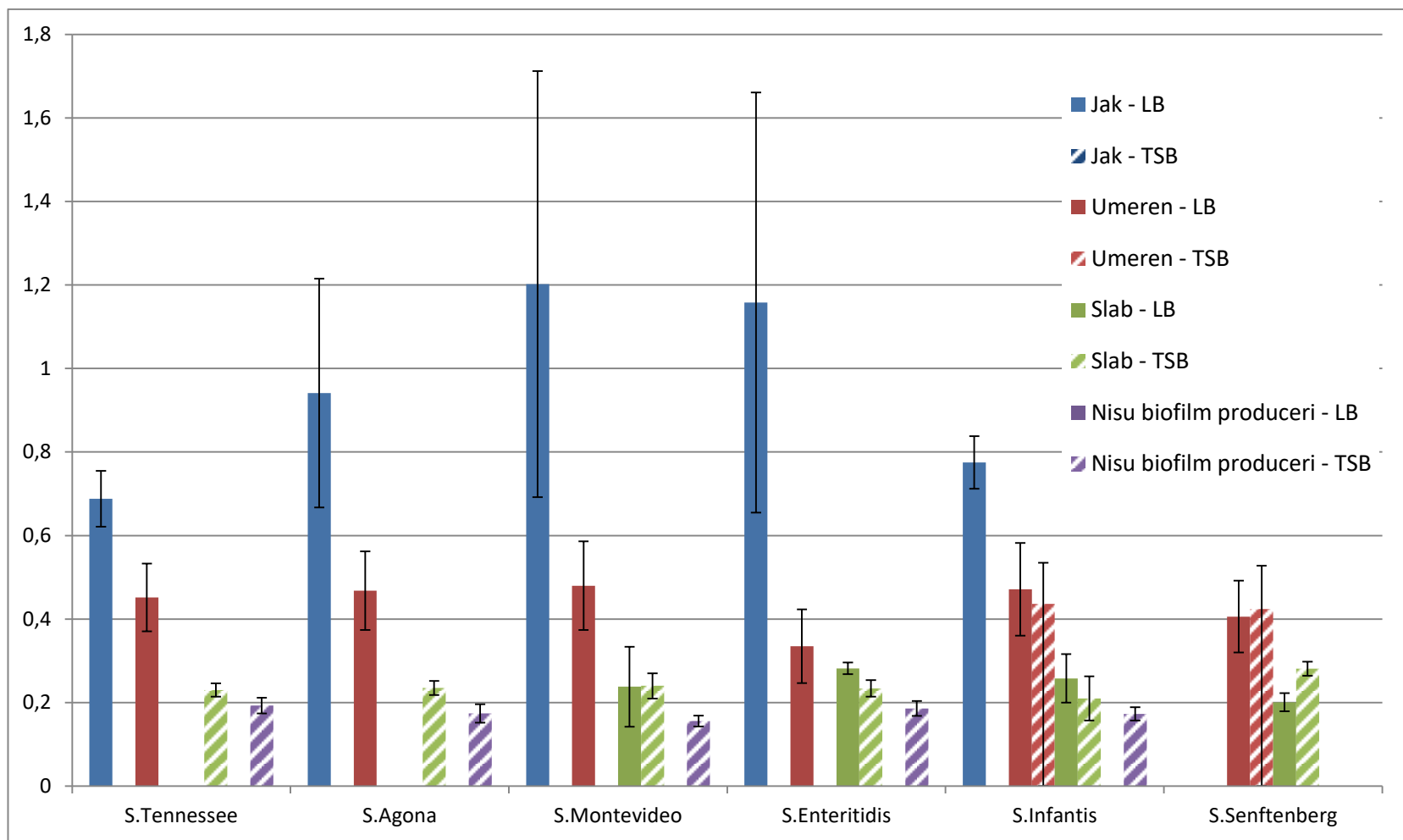
Referentni soj *S. Enteritidis* ATCC 13076 procenjen je jakim biofilm producerom inkubacijom na 37°C u obe podloge, dok je referentni soj *S. Typhimurium* ATCC 14028 procenjen umerenim biofilm producerom inkubacijom na temperaturi od 20°C u obe podloge. (Tabele 5.5., 5.6., 5.7. i 5.8.).



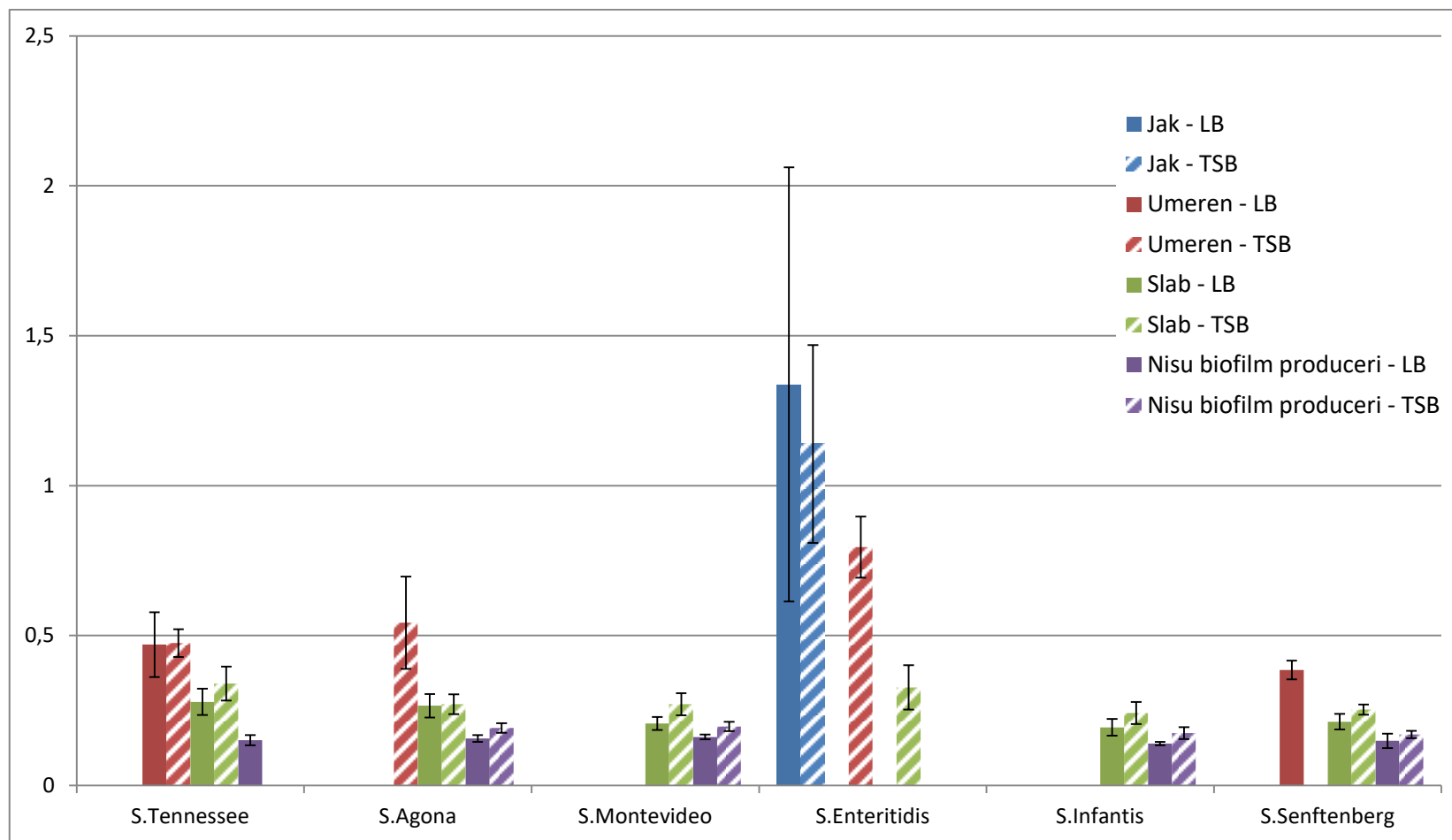
Grafikon 5.13. Utvrđene srednje vrednosti (OD₅₉₅) i standardne devijacije u testu na mikrotitracionim pločama, inkubacija u Luria bertani bujonu na temperaturama od 20°C i 37°C, tokom 48h).



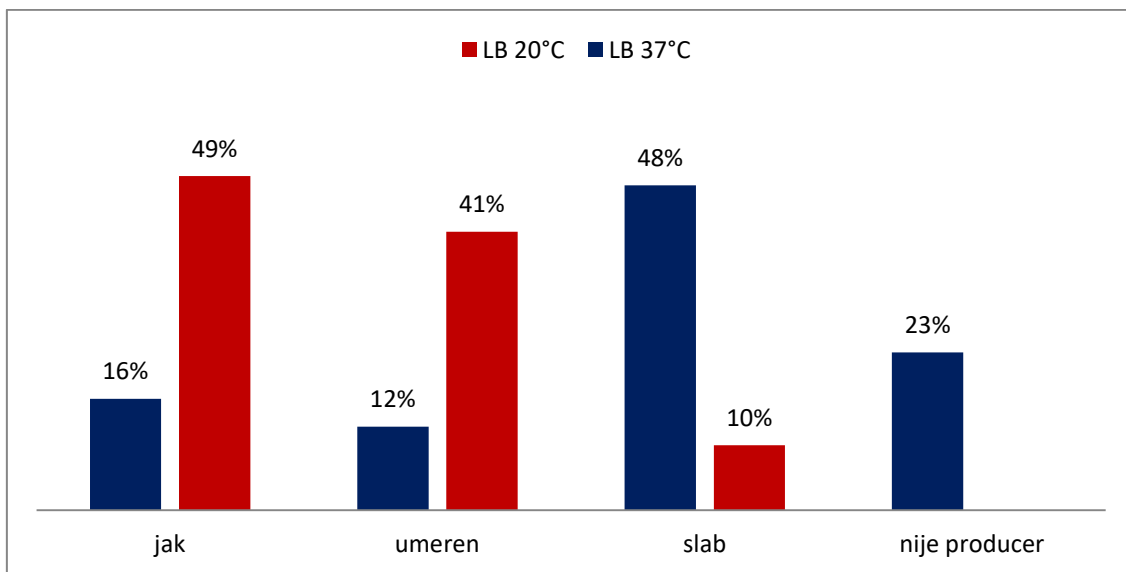
Grafikon 5.14. Utvrđene srednje vrednosti (OD_{595}) i standardne devijacije u testu na mikrotitracionim pločama, inkubacija u Tripton soja bujonu na temperaturama od 20°C i 37°C, tokom 48h).



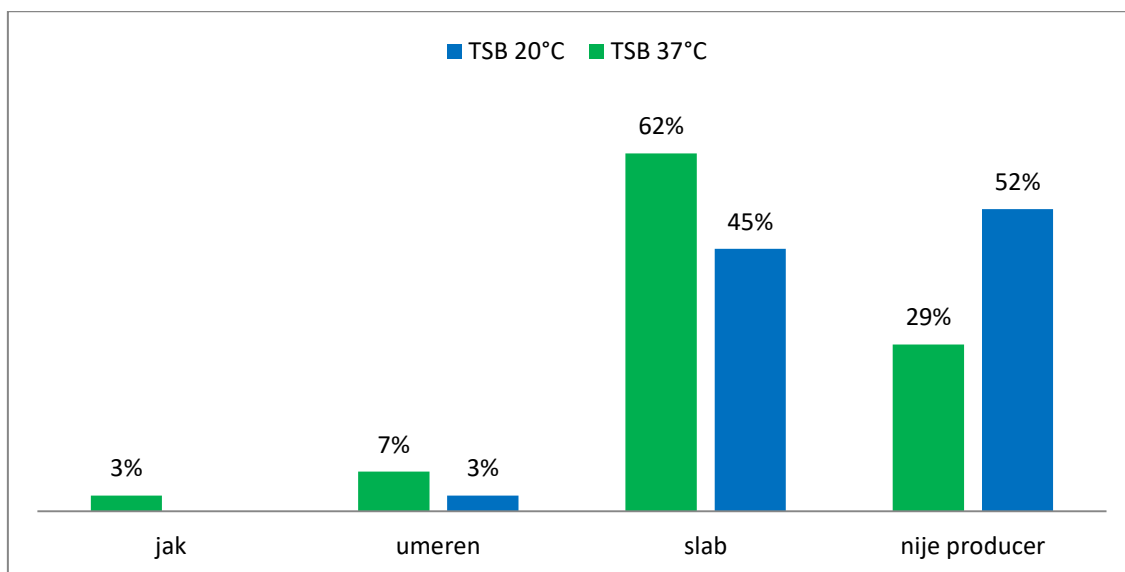
Grafikon 5.15. Utvrđene srednje vrednosti (OD_{595}) i standardne devijacije u testu na mikrotitracionim pločama, inkubacija u Luria bertani i Trypton soja bujonu na temperaturi od 20°C , tokom 48h).



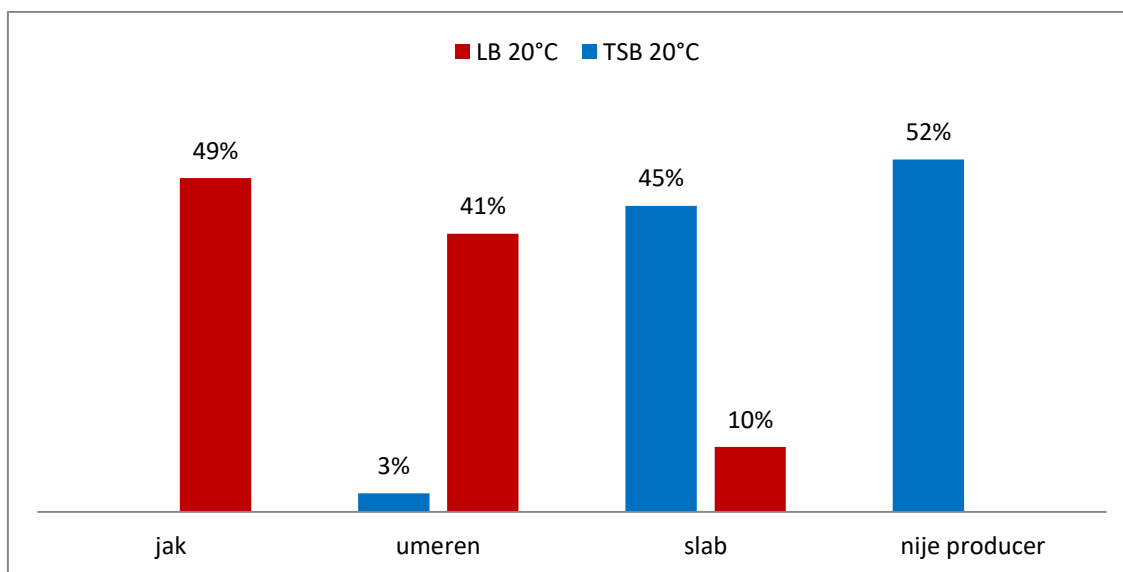
Grafikon 5.16. Utvrđene srednje vrednosti (OD_{595}) i standardne devijacije u testu na mikrotitracionim pločama, inkubacija u Luria bertani i Tripton soja bujonu na temperaturi od $37^{\circ}C$, tokom 48h).



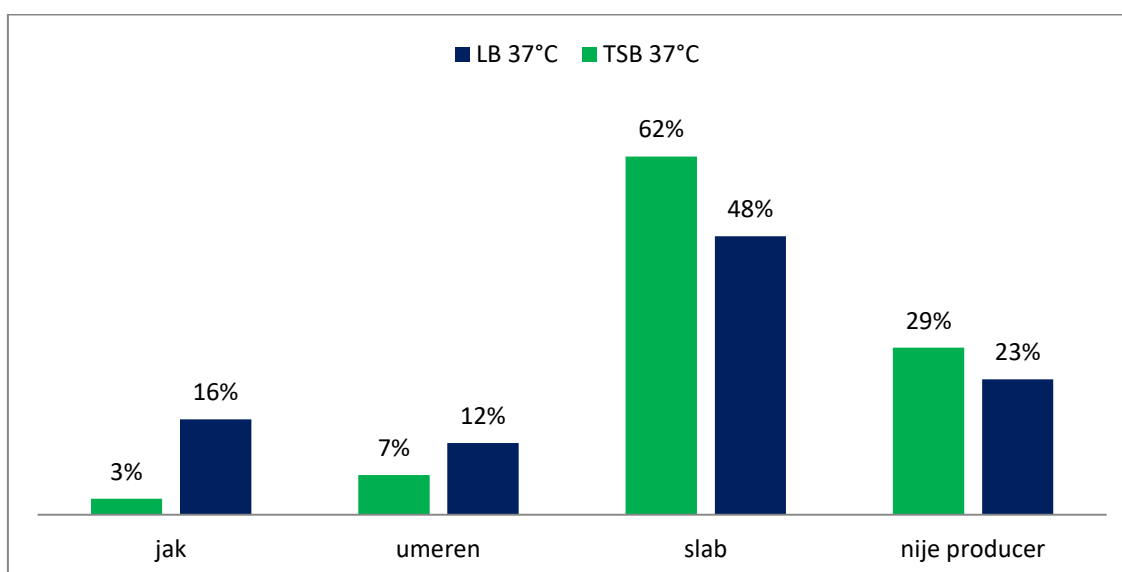
Grafikon 5.17. Uticaj temperature na sposobnost produkcije biofilma (inkubacija u Luria Bertani bujonu na temperaturi od 20°C (crvena boja) i 37°C (plava boja), tokom 48h).



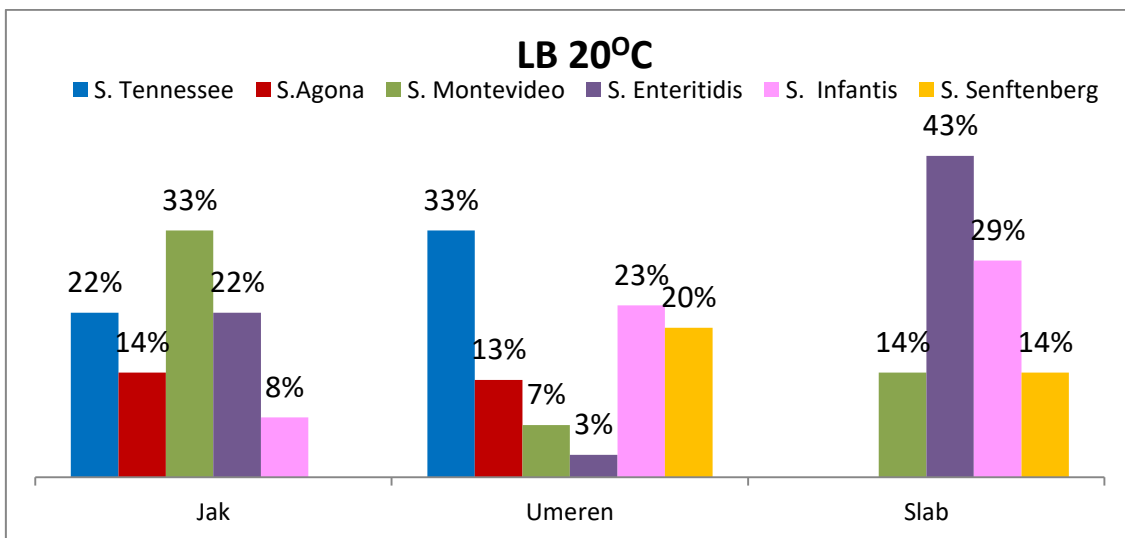
Grafikon 5.18. Uticaj temperature na sposobnost produkcije biofilma (inkubacija u Tryptone soja bujonu na temperaturi od 20°C (plava boja) i 37°C (zelena boja), tokom 48h).



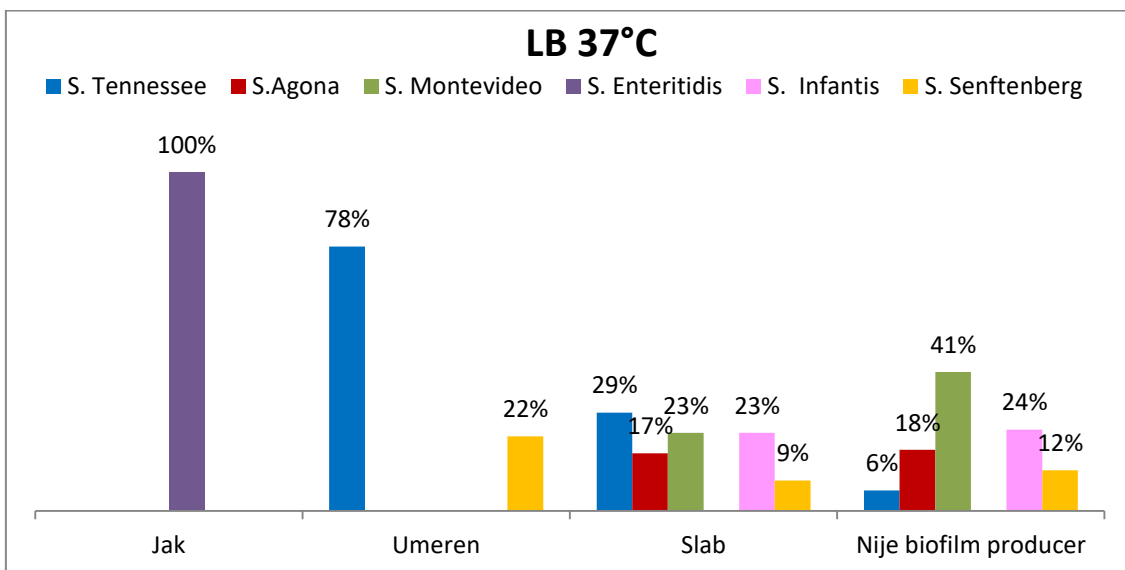
Grafikon 5.19. Uticaj podloge na produkciju biofilma (inkubacija u Luria Bertani bujonu (crvena boja) i Tripton soja bujonu (plava boja) na temperaturi od 20°C, tokom 48h).



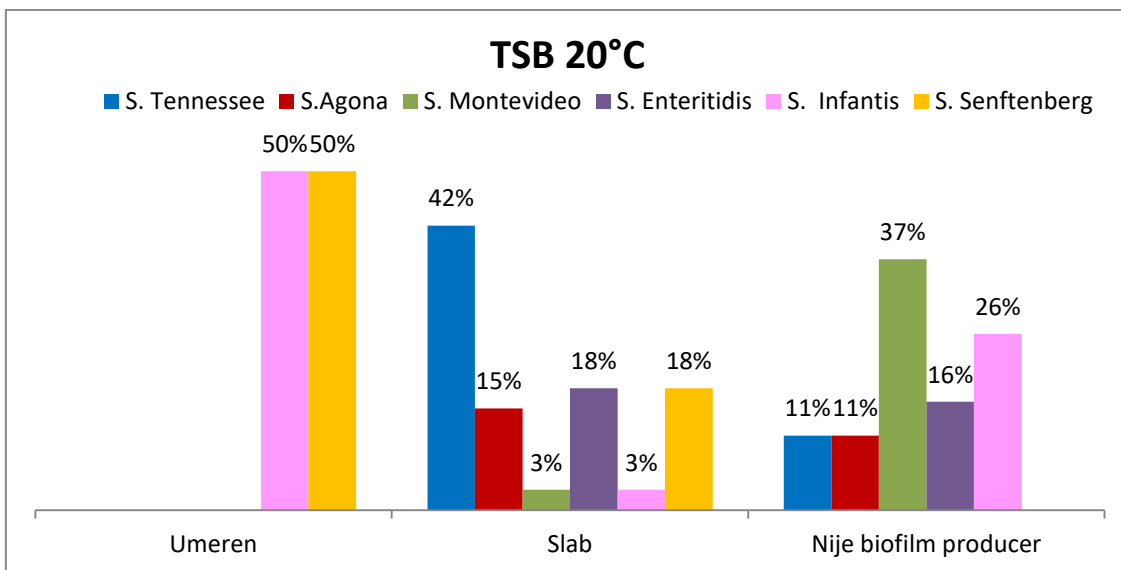
Grafikon 5.20. Uticaj podloge na sposobnost produkcije biofilma (inkubacija u Luria Bertani bujonu (plava boja) i Tripton soja bujonu (zelena boja) na temperaturi od 37°C, tokom 48h).



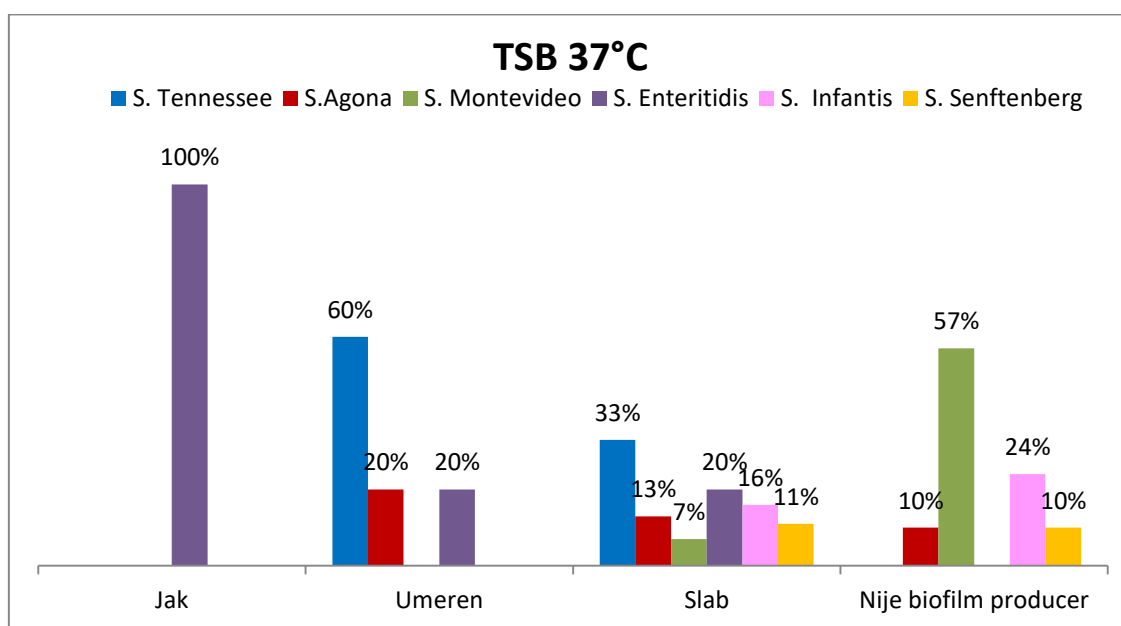
Grafikon 5.21. Spособnost formiranja biofilma u odnosu na serovarijetete (inkubacija u Luria Bertani bujonu na temperaturi od 20°C, tokom 48h).



Grafikon 5.22. Spособnost formiranja biofilma u odnosu na serovarijetete (inkubacija u Luria Bertani bujonu na temperaturi od 37°C, tokom 48h).



Grafikon 5.23. Sposobnost formiranja biofilma u odnosu na serovarijetete (inkubacija u Trypton soja bujonu na temperaturi od 20°C, tokom 48h).



Grafikon 5.24. Sposobnost formiranja biofilma u odnosu na serovarijetete (inkubacija u Trypton soja bujonu na temperaturi od 37°C, tokom 48h).

Uporedni prikaz rezultata testova korišćenih u proceni formiranja biofilma

Rezultati testova korišćenih u ispitivanju formiranja biofilma: Congo red, test na mikrotitracionim pločama sa kristal violet bojom i pelikula test prikazani su u Tabelama 5.9.; 5.10.; 5.11 i 5.12.

Tabela 5.9. Uporedni prikaz rezultata testova korišćenih u ispitivanju sposobnosti formiranja biofilma: Congo red, kristal violet i pelikula test, (Luria Bertani bujon, inkubacija na temperaturi od 20°C).

Izolot	Congo red (n)	Kristal violet test LB (20°C)				Pelikula LB (20°C)			
		Jak	Umeren	Slab	Nije producer	+++	++	+	-
S. Tennessee (n=18)	(14)RDAR	6	8	-	-	7	7	-	-
	(4)PDAR	2	2	-	-	2	2	-	-
S. Agona (n=9)	(9) RDAR	5	4	-	-	4	5	-	-
S. Montevideo (n=15)	(15)RDAR	12	2	1	-	12	2	1	-
	(8) RDAR	6	1	1	-	4	3	1	-
S. Enteritidis (n=12)	(1) PDAR	1	-	-	-	1	-	-	-
	(2) BDAR	1	-	1	-	1	-	1	-
	(1) SAW	-	-	1	-	-	-	1	-
S. Infantis (n=12)	(9) RDAR	3	4	2	-	3	4	2	-
	(3) PDAR	-	3	-	-	-	2	-	1
S. Senftenberg (n=7)	(3) RDAR	-	2	1	-	1	1	1	-
	(4) BDAR	-	4	-	-	-	4	-	-
S. Typhimurium ATCC 14028	RDAR		+			+++			
S. Enteritidis ATCC 17036	BDAR			+				+	

Tabela 5.10. Uporedni prikaz rezultata testova korišćenih u ispitivanju sposobnosti formiranja biofilma: Congo red, kristal violet i pelikula test, (Luria Bertani bujon, inkubacija na temperaturi od 37°C).

Izolot	Congo red (n)	Kristal violet test LB (37°C)				Pelikula LB (37°C)			
		Jak	Umeren	Slab	Nije producer	+++	++	+	-
S. Tennessee (n=18)	(18) SAW	-	7	10	1	-	6	8	4
S. Agona (n=9)	(9) SAW	-	-	6	3	-	-	3	6
S. Montevideo (n=15)	(15) SAW	-	-	8	7	-	-	9	6
S. Enteritidis (n=12)	(12) SAW	12	-	-	-	12	-	-	-
S. Infantis (n=12)	(12) SAW	-	1	8	3	-	-	8	4
S. Senftenberg (n=7)	(7) SAW	-	2	3	2	-	1	2	4
S. Typhimurium ATCC 14028	SAW		+			+++			
S. Enteritidis ATCC 17036	SAW	+						+	

Tabela 5.11. Uporedni prikaz rezultata testova korišćenih u ispitivanju sposobnosti formiranja biofilma: Congo red, kristal violet i pelikula test, (Trypton soja bujon, inkubacija na temperaturi od 20°C).

Izolot	Congo red (n)	Kristal violet test TSB (20°C)				Pelikula TSB(20°C)			
		Jak	Umeren	Slab	Nije producer	+++	++	+	-
<i>S. Tennessee</i> (n=18)	(14)RDAR	-	1	11	2	-	-	11	3
	(4)PDAR	1	1	2	-	-	-	2	2
<i>S. Agona</i> (n=9)	(9) RDAR	-	5	4	-	-	2	5	2
<i>S. Montevideo</i> (n=15)	(15)RDAR	-	-	1	14	-	3	2	10
	(8) RDAR	-	-	3	5	-	1	4	3
<i>S. Enteritidis</i> (n=12)	(1) PDAR	-	-	1	-	-	-	1	-
	(2) BDAR	-	-	1	1	-	1	1	-
	(1) SAW	-	-	1	-	-	-	1	-
<i>S. Infantis</i> (n=12)	(9) RDAR	-	1	-	8	-	1	4	4
	(3) PDAR	-	-	1	2	-	1	1	1
<i>S. Senftenberg</i> (n=7)	(3) RDAR	-	1	2	-	-	1	1	1
	(4) BDAR	-	-	4	-	-	-	3	1
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	RDAR			+			+		
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 17036	BDAR				-		+		

Tabela 5.12. Uporedni prikaz rezultata testova korišćenih u ispitivanju sposobnosti formiranja biofilma: Congo red, kristal violet i pelikula test, (Trypton soja bujon, inkubacija na temperaturi od 37°C).

Izolot	Congo red (n)	Kristal violet test TSB (37°C)				Pelikula TSB (37°C)			
		Jak	Umeren	Slab	Nije producer	+++	++	+	-
<i>S. Tennessee</i> (n=18)	(18) SAW	-	3	15	-	-	3	15	-
<i>S. Agona</i> (n=9)	(9) SAW	-	1	6	2	-	1	4	4
<i>S. Montevideo</i> (n=15)	(15) SAW	-	-	3	12	-	-	4	11
<i>S. Enteritidis</i> (n=12)	(12) SAW	2	1	9	-	-	5	6	1
<i>S. Infantis</i> (n=12)	(12) SAW	-	-	7	5	-	6	3	3
<i>S. Senftenberg</i> (n=7)	(7) SAW	-	-	5	2	-	1	4	2
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	SAW		+					+	
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 17036	SAW	+				+++			

Uporednim prikazom rezultata testova korišćenih u ispitivanju sposobnosti formiranja biofilma (test na mikrotitracionim pločama sa kristal violet bojom i pelikula testa) dobijena je statistički značajna korelacija ($p < 0,01$) između definisanih tipova

pelikule (+++;++;+) i srednjih vrednosti ekstinkcija među svim ispitivanim izolatima u obe testirane podloge (LB i TSB) i na obe temperature (20°C i 37°C). Kod izolata koji su formirali čvrstu, stabilnu pelikulu deblju od 1mm (+++), u Kristal violet testu izmerene su više vrednosti ekstinkcija u odnosu na izolate koji su formirali stabilnu pelikulu debljine od 1mm (++) , vrlo tanku pelikulu ili bili bez vidljive pelikule (-).

Poređenjem rezultata Congo red agar testa, testa na mikrotitracionim pločama i pelikula testa, inkubacijom u LB podlozi na 20°C, ustanovljena je pozitivna korelacija.

Za formiranje biofilma *Salmonella* vrsta optimalnom se pokazala temperatura inkubacije od 20°C, na kojoj je RDAR morfotip kolonija ustanovljen kod 79,5% (58/73) izolata *Salmonella*, PDAR kod 11% (8/73), BDAR kod 8% (6/73) i SAW kod 1,4% (1/73). Za jake biofilm producere procenjeno je 49% (36/73) izolata, od kojih je 89% (32/36) ispoljilo RDAR morfotip kolonija. Stabilnu pelikulu je formiralo 48% (35/73) izolata, a 88,6% tih izolata (31/35) je formiralo kolonije RDAR morfotipa.

Od osam izolata *Samonella enterica* (*S. Tennessee* (4/18), *S. Infantis* (3/12), *S. Enteritidis* (1/12)) koji su formirali PDAR morfotip kolonija na Congo red agaru, tri (37,5%) su formirala čvrstu pelikulu i procenjena jakim biofilm producerima u testu na mikrotitracionim pločama, dok su četiri formirala tanku pelikulu.

Od šest izolata *Samonella* (*S. Enteritidis* (2/12) i *S. Senftenberg* (4/7)) koji su formirali BDAR morfotip kolonija na Congo red agaru, četiri (66,7%) je formiralo stabilnu pelikulu (++) i procenjeno umerenim biofilm producerima.

Uporednom analizom rezultata Congo red testa, kristal violet testa i pelikula testa dobijenih na temperaturi od 20°C, ustanovljena je pozitivna korelacija između morfotipa kolonija na Congo red agaru i sposobnosti produkcije biofilma u kristal violet testu i pelikula testu. RDAR morfotip je povezan sa jakom produkcijom biofilma i formiranjem čvrste, debele pelikule, dok se PDAR i BDAR morfotipovi dovode u vezu sa umerenom produkcijom biofilma i formiranjem tanke pelikule. SAW morfotip je u korelaciji sa slabom produkcijom biofilma i odsustvom pelikule.

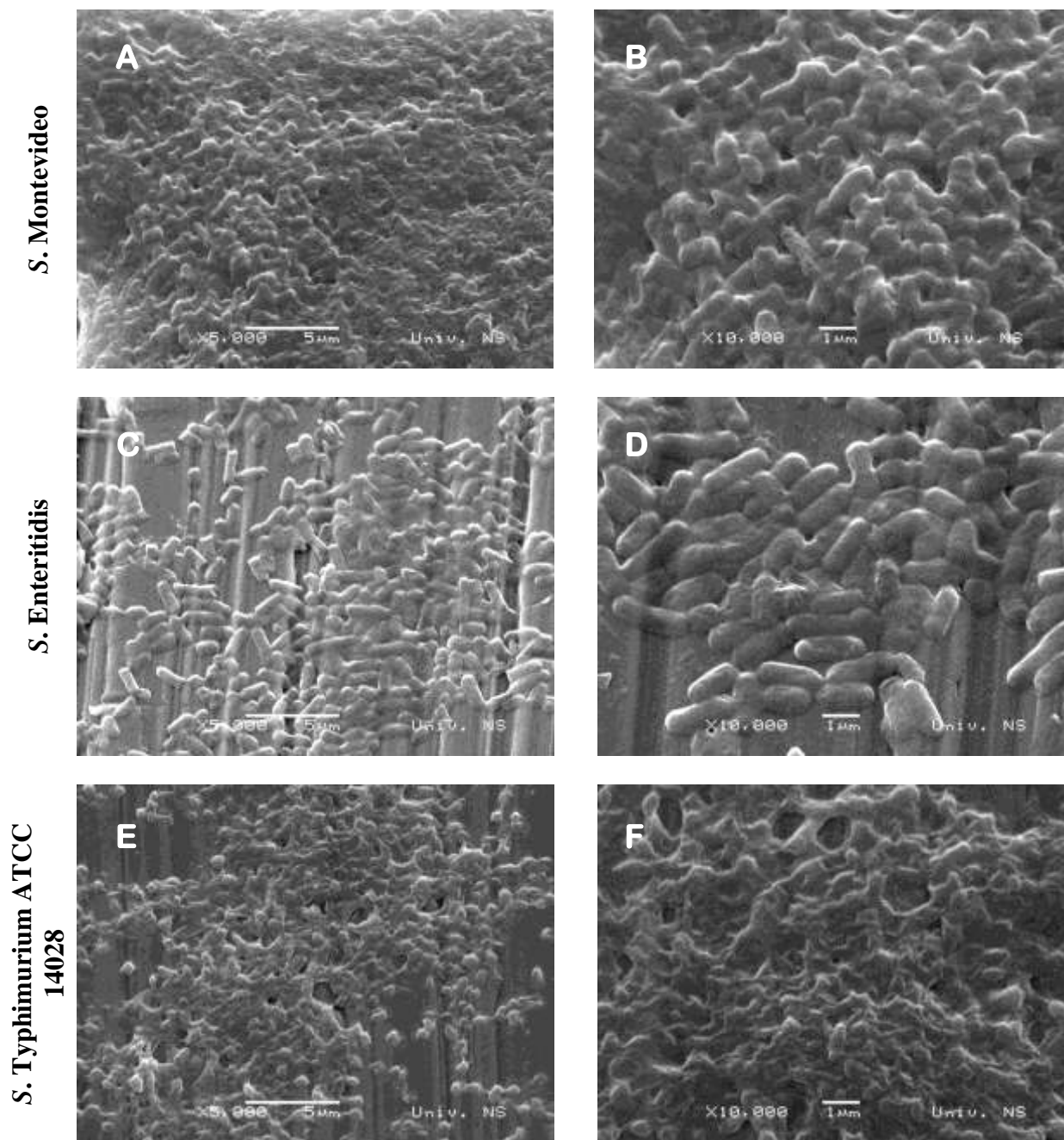
Uporednom analizom rezultata primenjenih testova na temperaturi inkubacije od 37°C u obe podloge, ustanovljena je samo statistički značajna korelacija između kristal violet testa i pelikula testa ali ne i između morfotipa kolonija na Congo red agaru. Inkubacijom na temperaturi od 37°C svi izolati su formirali kolonije SAW morfotipa. Samo je na dvanaest izolata *S. Enteritidis*, LB podloga i temperatura inkubacije od 37°C

povoljno uticala na sposobnost formiranja biofilma. Svi izolati su procenjeni jakim biofilm producerom i svi su formirali stabilne, čvrste pelikule.

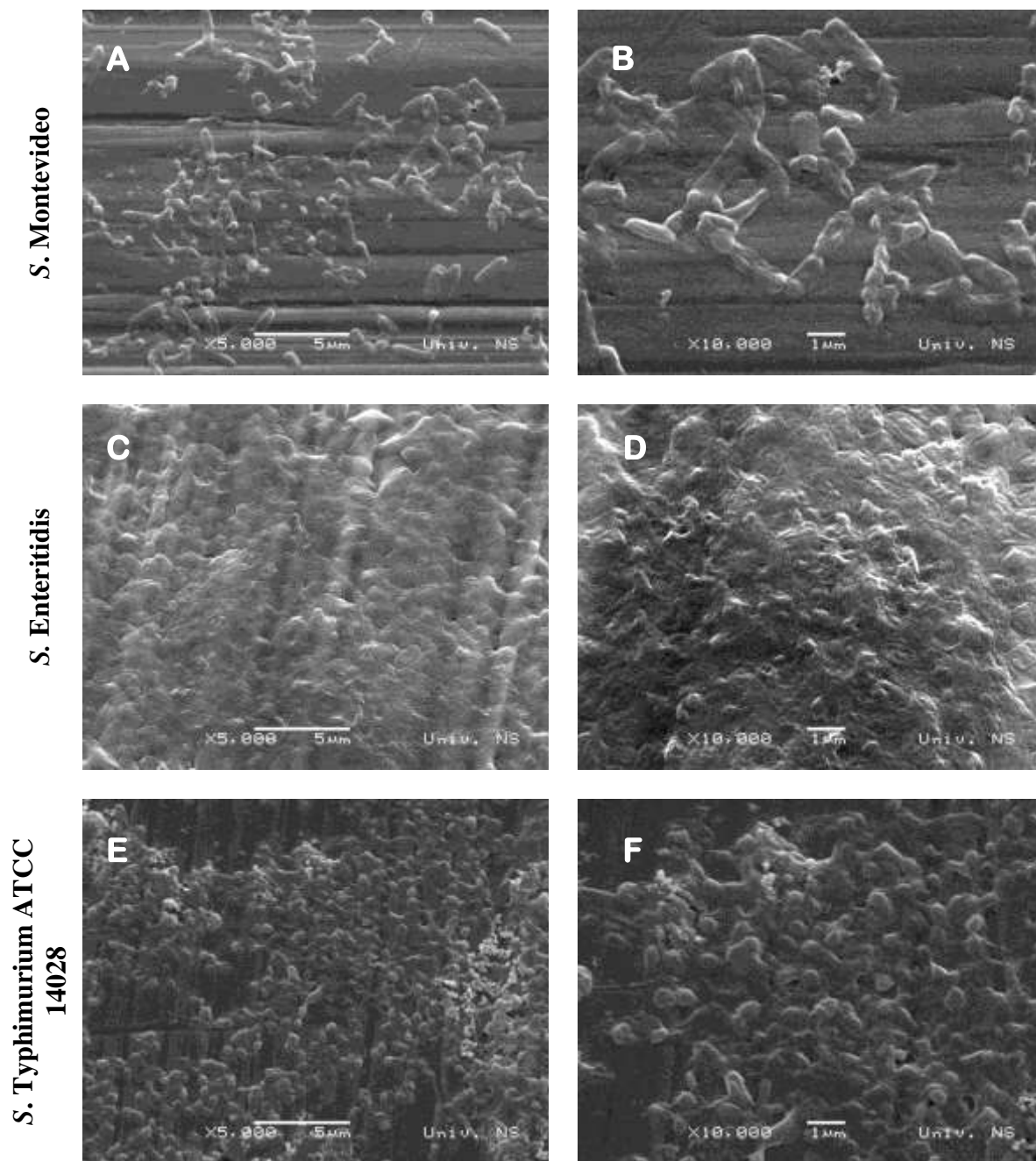
5.5. Skening elektronska mikroskopija (SEM)

Primenom skening elektronske mikroskopije (SEM) potvrđena je sposobnost formiranja biofilma na površini nerđajućeg čelika, odabranih izolata *S. Enteritidis*, *S. Montevideo* i referentne kulture *S. Typhimurium* ATCC 14028 inkubacijom u Luria Bertani i Trypton soja bujonu, na temperaturama od 20°C i 37°C, tokom 48h.

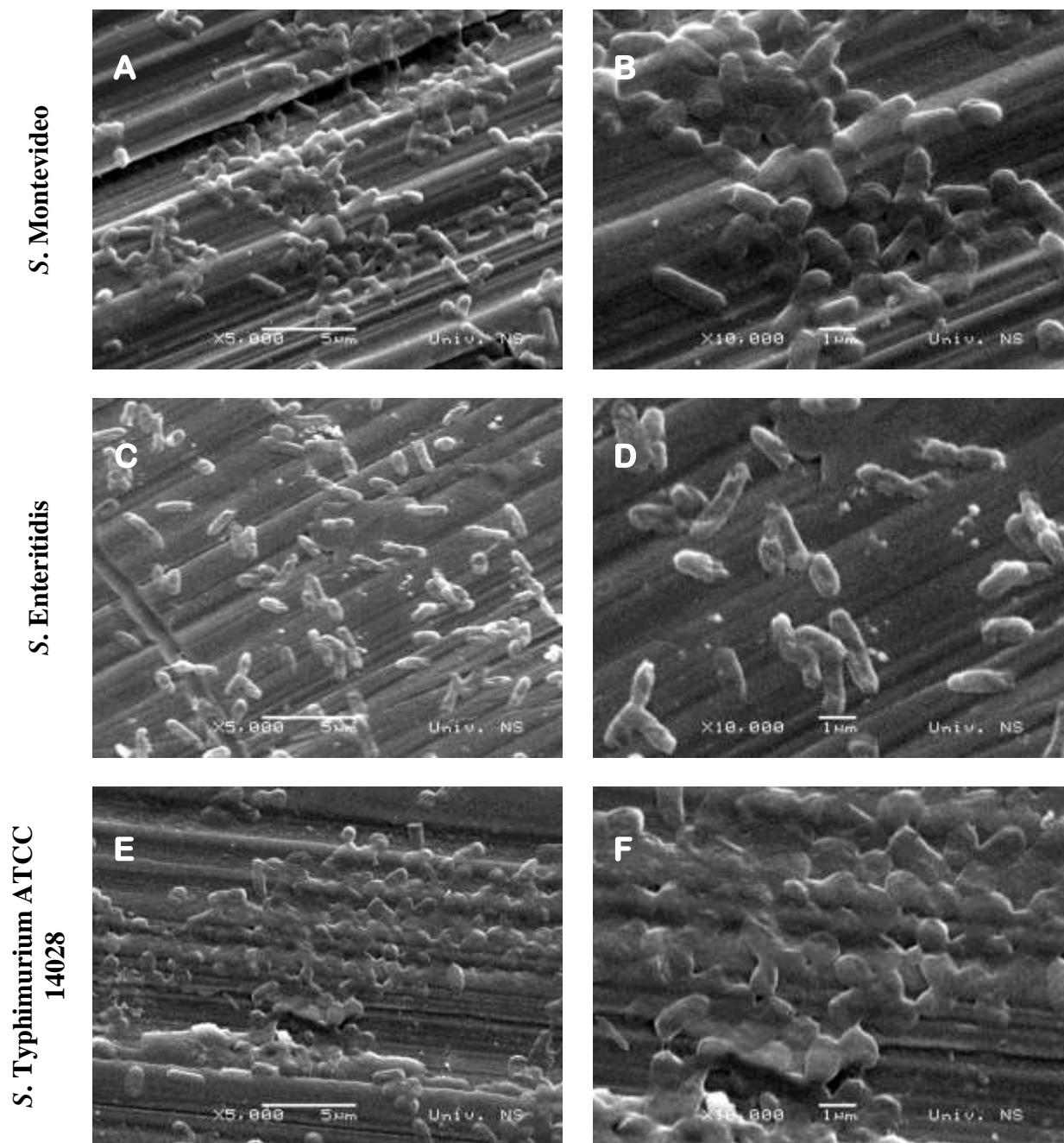
Na mikrografijama manjeg uveličanja, uočljiva je kolonizacija površine kupona ćelijama bakterija, dok je na većim uveličanjima uočljiva trodimenzionalna struktura zrelog biofilma. Rezultati skening elektronske mikroskopije prikazani su na Slikama 5.5; 5.6; 5.7. i 5.8 (uveličanja 5.000 i 10.000).



Slika 5.5. SEM mikrografije: Izolati *S. Montevideo*, *S. Enteritidis* i referentna kultura *S. Typhimurium* ATCC 14028 na površini nerđajućeg čelika (inkubacija u Luria Bertani bujonu na temperaturi od 20°C, tokom 48h). Uveličanje 5.000 (A.C.E.) i 10.000 (B.D.F).

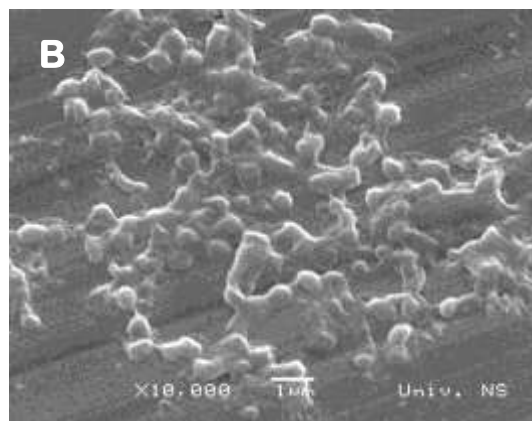
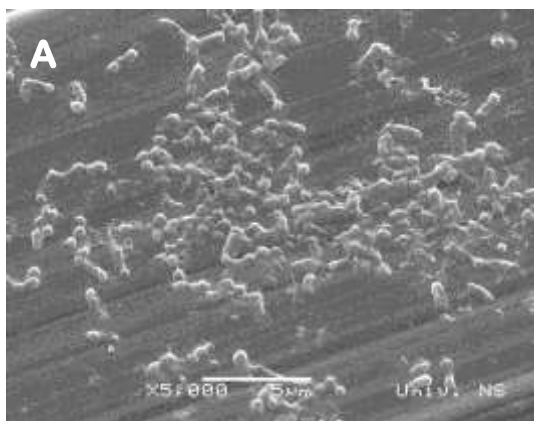


Slika 5.6. SEM mikrografije: Izolati *S. Montevideo*, *S. Enteritidis* i referentna kultura *S. Typhimurium* ATCC 14028 na površini nerđajućeg čelika (inkubacija u Luria Bertani bujonu na temperaturi od 37°C, tokom 48h). Uveličanje 5.000 (A.C.E.) i 10.000 (B.D.F).

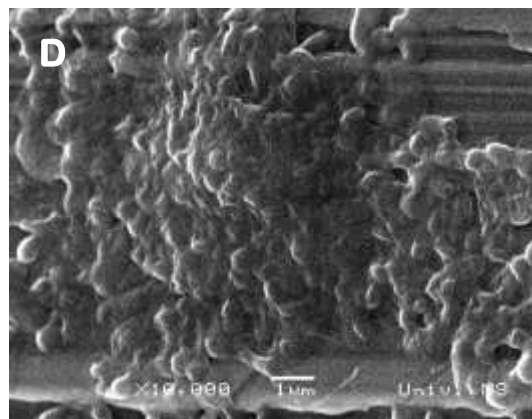
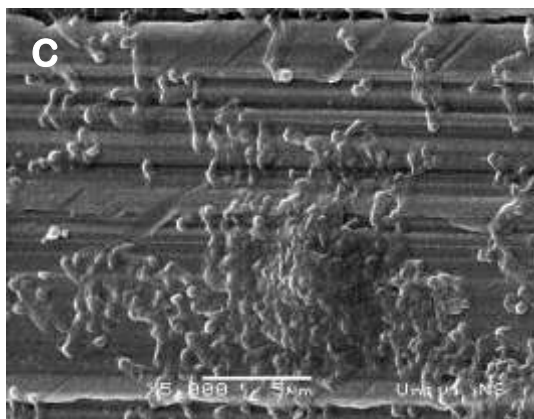


Slika 5.7. SEM mikrografije: Izolati *S. Montevideo*, *S. Enteritidis* i referentna kultura *S. Typhimurium* ATCC 14028 na površini nerđajućeg čelika (inkubacija u Trypton soja bujon na temperaturi od 20°C, tokom 48h). Uveličanje 5.000 (A.C.E.) i 10.000 (B.D.F.).

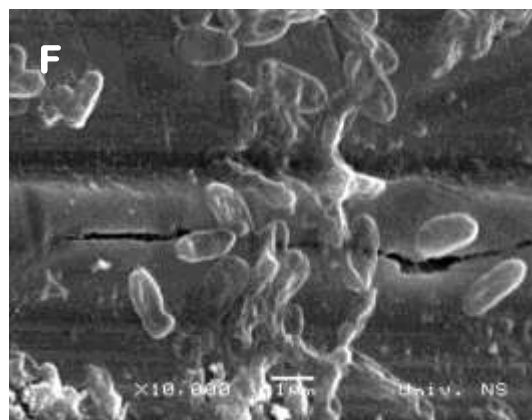
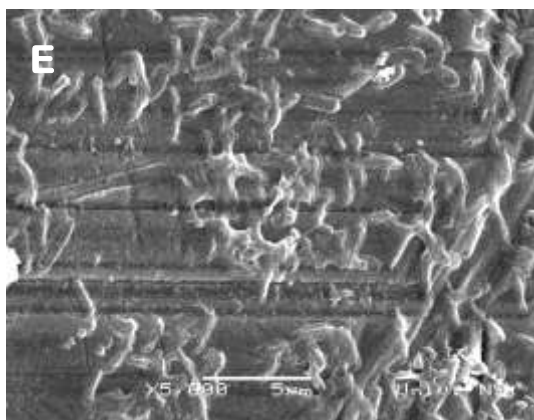
S. Montevideo



S. Enteritidis



S. Typhimurium ATCC
14028



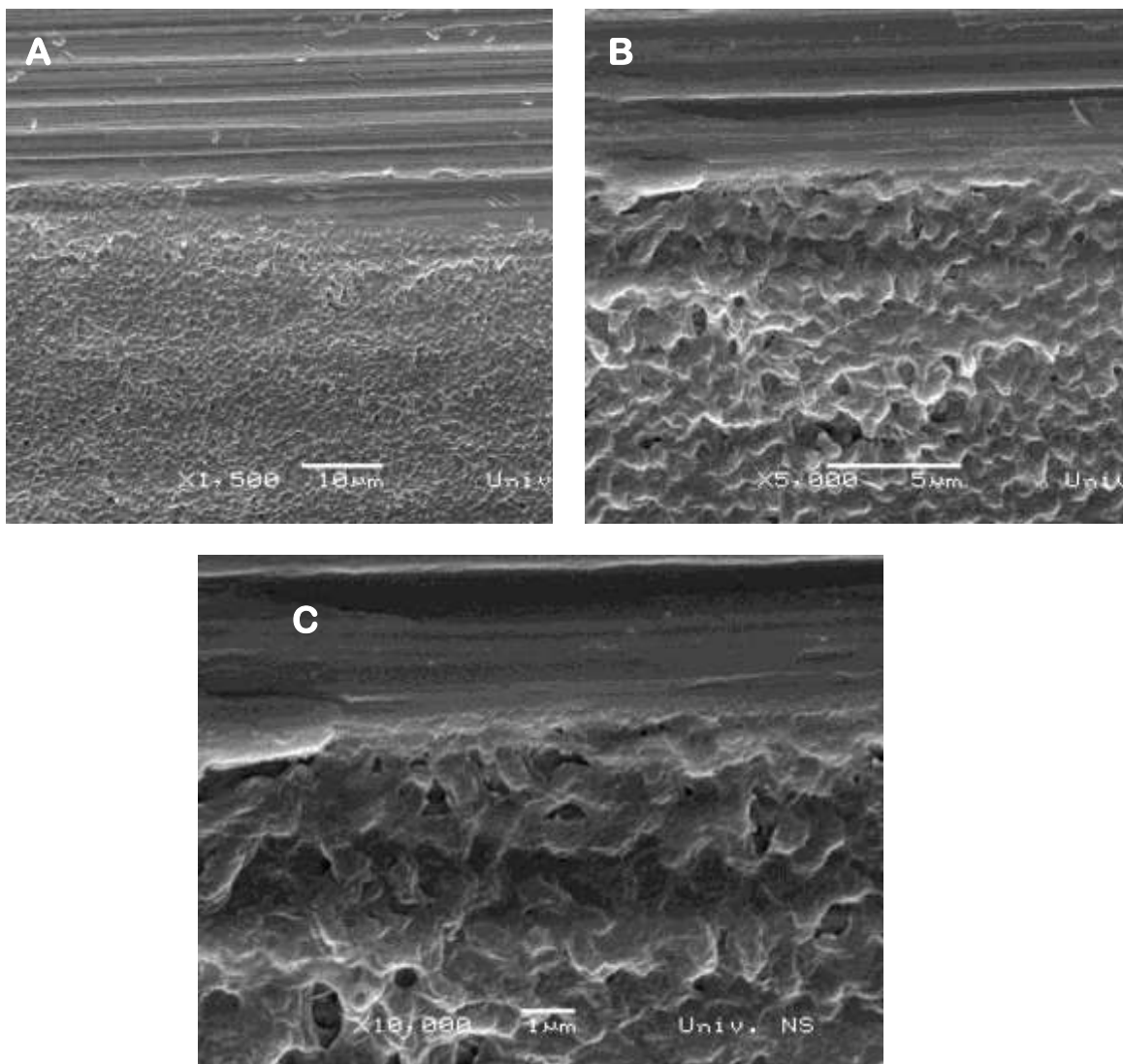
Slika 5.8. SEM mikrofografije: Izolati *S. Montevideo*, *S. Enteritidis* i referentna kultura *S. Typhimurium* ATCC 14028 na površini nerđajućeg čelika (inkubacija u Trypton soja bujonu na temperaturi od 37°C, tokom 48h). Uveličanje 5.000 (A.C.E.) i 10.000 (B.D.F).

Na osnovu pregleda skening elektronskom mikroskopijom, uočen je povoljan uticaj kultivacije u podlozi sa niskim sadržajem hranljivih materija (LB) i nižoj temperaturi (20°C) na sposobnost formiranja biofilma. Pod ovim uslovima, odabrani izolati su velikoj meri kolonizirali površinu nerđajućeg čelika i formirali biofilm.

Kultivacija u podlozi sa visokim sadržajem hranljivih materija (TSB) na obe temperature (20°C i 37°C) je nepovoljno uticala na sposobnost formiranja biofilma. Pod ovim uslovima odabrani izolati su formirali samo manje ćelijske aglomerate na površini nerđajućeg čelika. I skening elektronskom mikroskopijom i testom na mikrotitracionim pločama je dokazano da viša temperatura inkubacije nema nepovoljan uticaj na formiranje biofilma kod izolata serovarijeteta *Enteritidis* (Slika 5.6 C i D).

Na SEM mikrografijama (Slika 5.5. A i B) prikazani su biofilmovi serovarijeteta *S. Montevideo* i *S. Enteritidis* i referentnog soja *S. Typhimurium* ATCC 14028, formirani kultivacijom u LB podlozi na 20°C za 48h inkubacije. Odabrani izolat serovarijeteta *S. Montevideo* je potpuno kolonizirao površinu nerđajućeg čelika i formirao trodimenzionalne aglomerate ćelija svojstvene biofilmu i prekrivene sasušenom masom koja odgovara matriksu biofilma. Sličan nalaz, ali sa nešto ređim i manjim ćelijskim agregatima, zapažen je kod izolata *S. Enteritidis* i referentnog soja *S. Typhimurium* ATCC 14028 (Slika 5.5. C, D, E i F). Izolat *S. Enteritidis* je inkubacijom na temperaturi od 37°C kolonizirao površinu nerđajućeg čelika i formirao krupne ćelijske agregate svojstvene biofilmu, koji se mestimično izdižu sa površine kupona (Slika 5.6). Kako je matriks biofilma visoko hidrirana, mekana struktura, dehidratacija preparata u pripremi za SEM dovodi do njegovog oštećenja, pa on u vidu sasušene prevlake prekriva ćelije *S. Enteritidis* (Slika 5.6.). Izolat *S. Montevideo* je samo mestimično kolonizirao površinu nerđajućeg čelika inkubacijom na 37°C .

Na Slikama 5.7. i 5.8. prikazani su biofilmovi izolata *S. Montevideo*, *S. Enteritidis* i referentnog soja *S. Typhimurium* ATCC 14028, posle 48 h inkubacije u TSB bujonu na temperaturama od 20°C i 37°C. Uočljiva su područja koja nisu pokrivena bakterijama, dok se istovremeno zapažaju i formirani manji ćelijski agregati.



Slika 5.9. SEM mikrografije- formirana pelikula izolata *S. Montevideo* na površini nerđajućeg čelika. (Luria Bertani bujon, inkubacija na temperaturi od 20°C nakon 48h). Uveličanje 1.500 (A), 5.000 (B) i 10.000 (C).

Na SEM mikrografijama (Slika 5.9.) uočava se formiranje biofilma na granici dva agregatna stanja (pelikula).

5.6. Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)

Retrospektivnom analizom porekla uzoraka hrane (po proizvodnim objektima) i izolovanih serovarijeteta, u tri objekta je uočena ponavljana izolacija *S. Tennessee* (7/18) u objektu A, *S. Montevideo* (8/15) u objektu B i *S. Infantis* (4/12) u objektu C, u odnosu na ukupan broj izolovanih *Salmonella* (Tabela 5.13). Polazeći od pretpostavke da ponavljana izolacija i veća učestalost ovih u odnosu na druge ustanovljavane serovarijetete *Salmonella*, može biti posledica njihove perzistencije u fabričkom

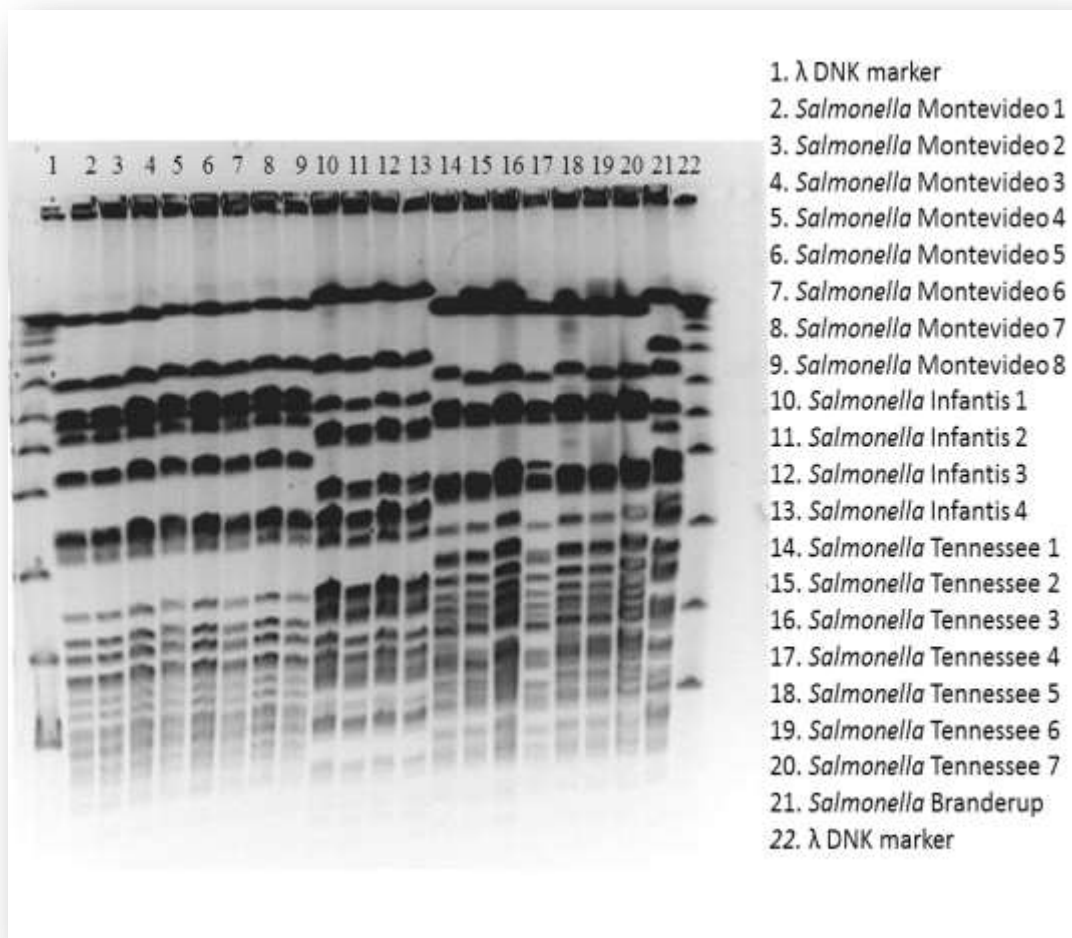
okruženju za proizvodnju hrane, ispitan je njihov genetički diverzitet primenom ekeltoforeze u pulsirajućem polju.

Table 5.13. Vrsta i broj uzoraka hrane za životinje iz proizvodnih objekata A, B i C i izolovani serovarijeteti *Salmonella*

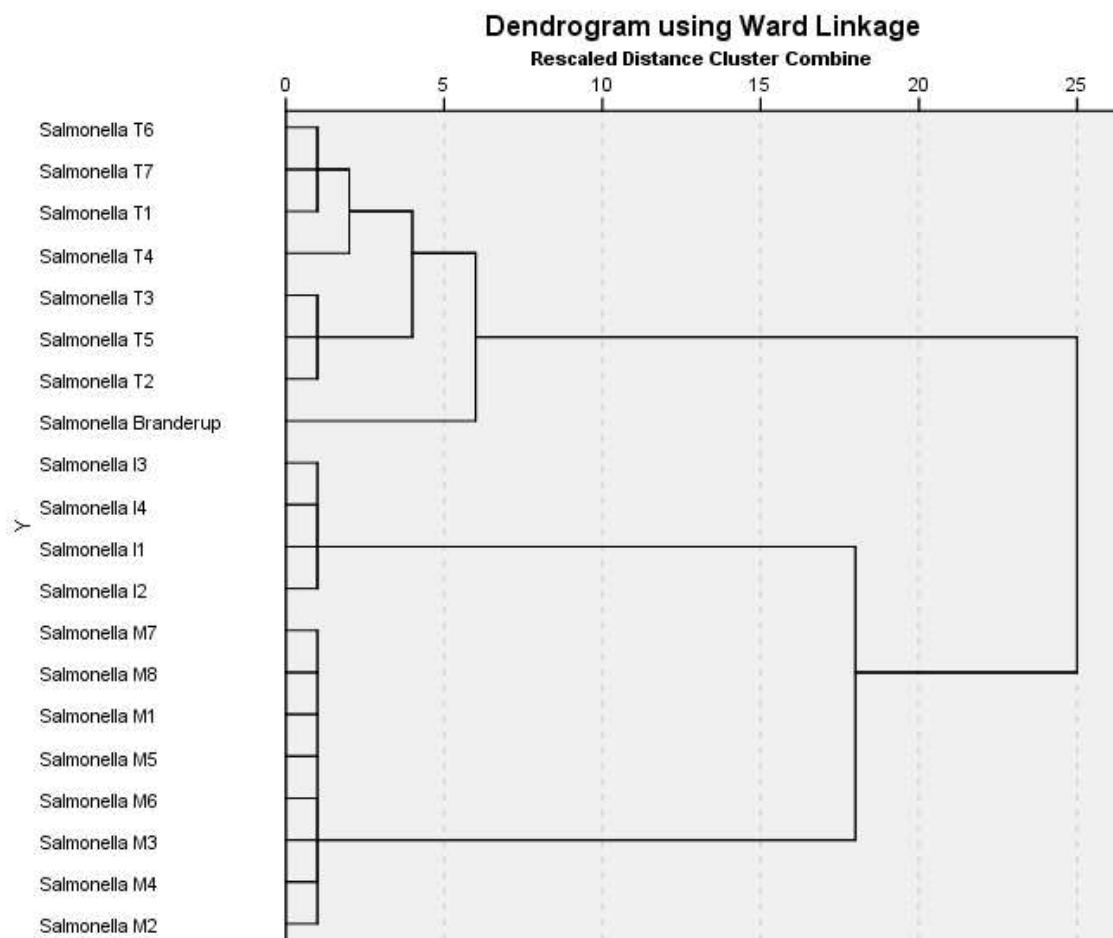
Tip i broj hrane	Fabrika hrane A		Fabrika hrane B		Fabrika hrane C	
	(n)	Boj izolata i serovarijeteta	(n)	Boj izolata i serovarijeteta	(n)	Boj izolata i serovarijeteta
Gotova smeša za goveda	16	<i>S. Tennessee</i> (3) <i>S. Agona</i> (1)	-	-	23	<i>S. Jerusalem</i> (1)
Gotova smeša za svinje	19	<i>S. Tennessee</i> (1) <i>S. Senftenberg</i> (1) <i>S. Enteritidis</i> (1) <i>S. Agona</i> (1) <i>S. Typhimurium</i> (1)	17	<i>S. Montevideo</i> (1)	18	<i>S. Infantis</i> (1) <i>S. Dahra</i> (1) <i>S. Typhimurium</i> (1)
Gotova smeša za živinu	24	<i>S. Tennessee</i> (2) <i>S. Senftenberg</i> (1) <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (1,3,19:i:-) (1) <i>S. Mbandaka</i> (1)	94	<i>S. Montevideo</i> (7) <i>S. Senftenberg</i> (1) <i>S. Agona</i> (1) <i>S. Infantis</i> (1)	25	<i>S. Infantis</i> (2) <i>S. Senftenberg</i> (1)
- sojina sačma	5	<i>S. Tennessee</i> (1)	-	-	6	<i>S. Infantis</i> (1)
-suncokretova sačma	3	-	-	-	5	-
-sojin griz	1	-	-	-	-	-
Ukupno:	68	<i>Salmonella</i> spp.=15 <i>S. Tennessee</i> =7	11 3	<i>Salmonella</i> spp.= 11 <i>S. Montevideo</i> = 8	86	<i>Salmonella</i> spp.= 8 <i>S. Infantis</i> = 4

Na osnovu *SpeI* (Slika 5.10. i 5.11.) i *XbaI* makrorestrikcionog profila (Slika 5.12. i 5.13) ustanovljeno je da su izolati *S. Montevideo* identični, kao i izolati *S. Infantis*, dok su izolati *S. Tennessee* genetički najraznovrsniji, iako razlike među njima ne prelaze 10% (Slika 5.10. i 5.11.).

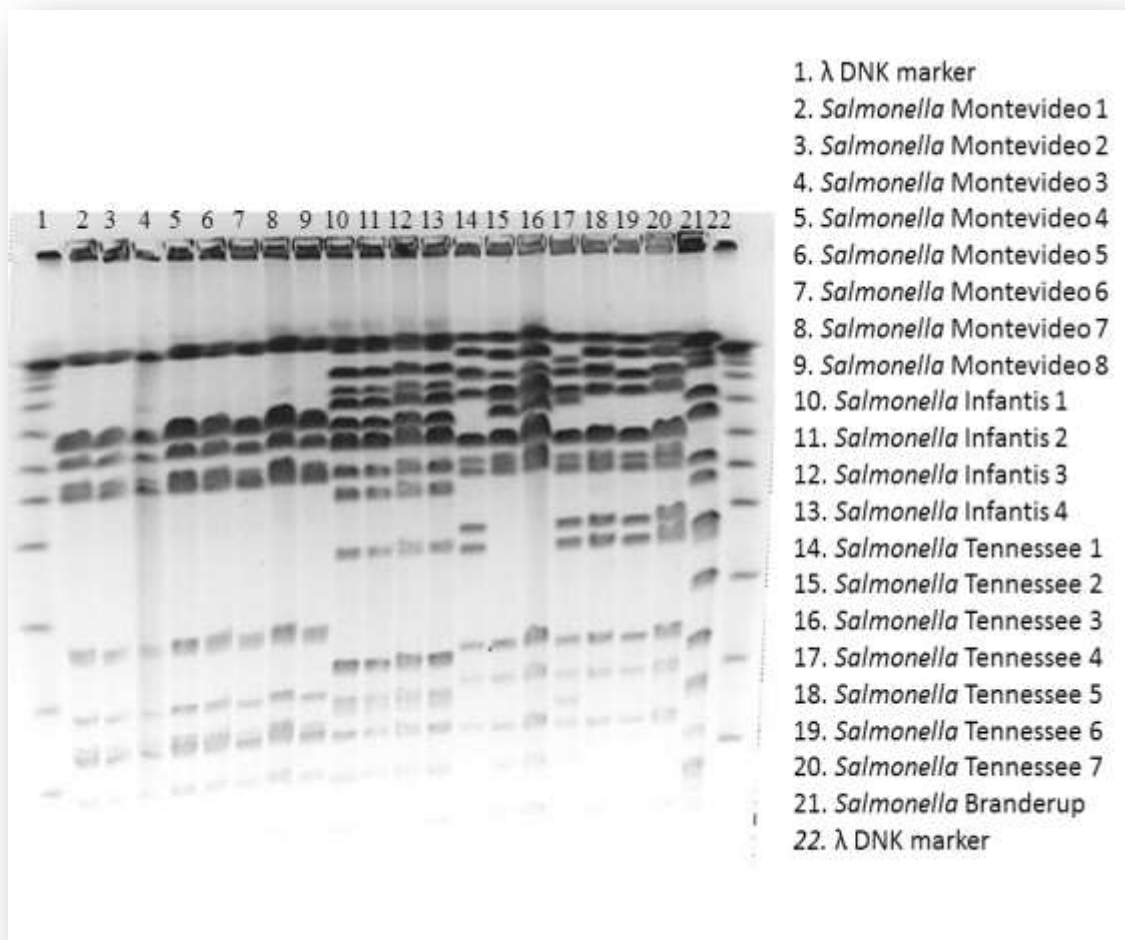
Upotrebom *XbaI* restrikcionog enzima na izolate *S. Tennessee* izolovane iz fabrike hrane A, ustanovljena je makrorestrikciona šema koja sugerise klonalnu perzistenciju, ali sa blagim genetskim razlikama. Najdominantniji pulstotip kod *S. Tennessee* je A1 dok je u A2 grupi pronađen dodatni veći fragment. U grupi A3, jedan veliki fragment nije identifikovan, dok je jedan veći fragment uočen kao i u grupi A2. Makrorestrikciona šema uspostavljena upotrebom *SpeI* restrikcionog enzima sugerise da je A1 pulstotip najzastupljeniji kod *S. Tennessee*. Kod dva dodatna izolata iz A2 grupe, jedan dodatni fragment je takođe primećen. U A3 grupi, jedan veliki fragment, drugačije molekularne težine je primećen kod izolata broj 17 (Slika 5.9). Statističkim analizama je dokazano da varijacije manje od 10% sugerisu prisustvo klonske prirode *S. Tennessee*.



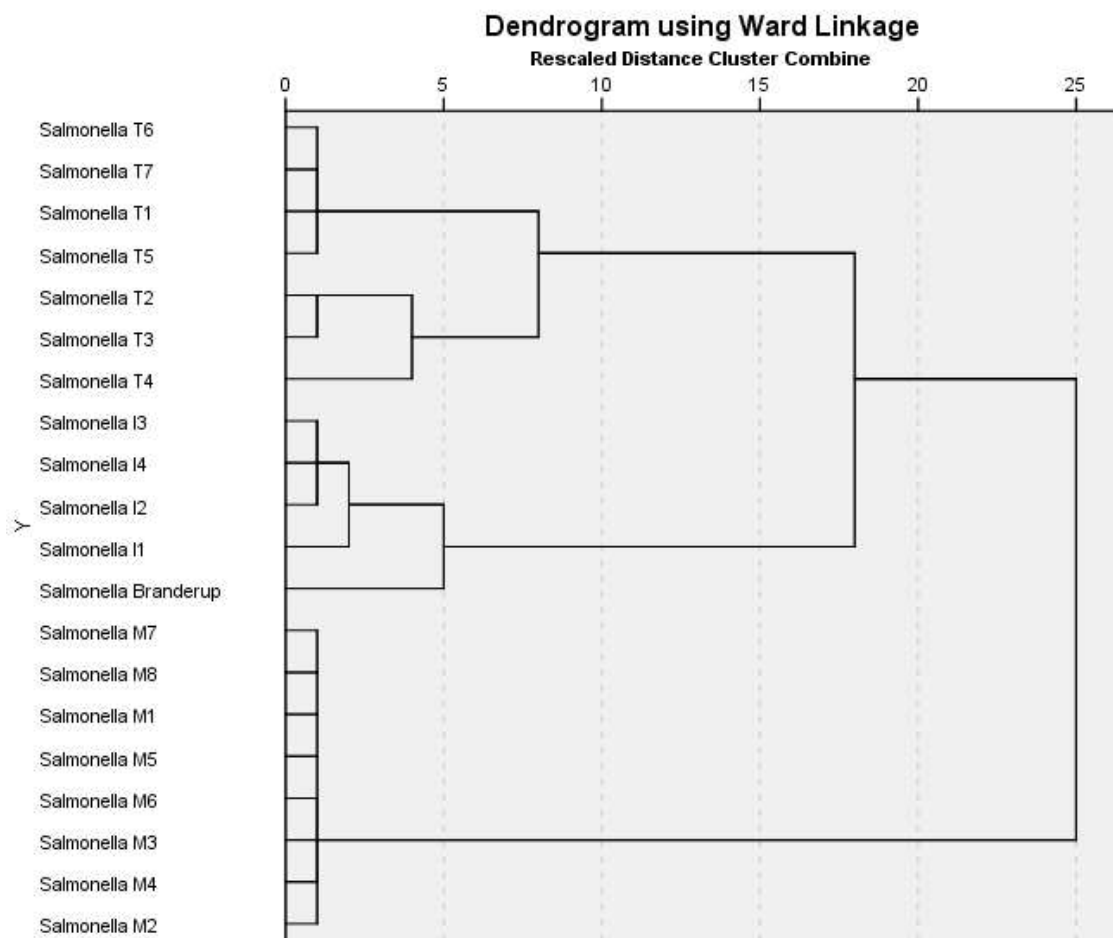
Slika 5.10. Genotipizacija izolata *Salmonella* analizom *SpeI* makrorestrikcionog profila genomske DNK, PFGE metodom.



Slika 5.11. Dendrogram izveden na osnovu Ward linkage koeficijenta korelacije među dobijenim *SpeI* PFGE makrorestrikcijonim profilima.



Slika 5.12. Genotipizacija izolata *Salmonella* analizom *Xba*I makrorestrikcionog profila genomske DNK PFGE metodom.



Slika 5.13. Dendrogram izveden na osnovu Ward linkage koeficijenta korelacije među dobijenim PFGE *Xba*I makrorestriktionim profilima.

5.7. Ispitivanje osetljivosti *Salmonella* spp. na antibiotike

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Salmonella* na antibiotike primenom disk difuzionog testa, prikazani su u Tabeli 5.14.

Tabela 5.14. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Salmonella* spp. na antibiotike primenom disk-difuzione metode.

<i>Salmonella</i> serovarijetet	Tip rezistencije		
	Osetljiv	Intermedijalan	Rezistentan
	Br. (%)	Br. (%)	Br. (%)
<i>S. Tennessee</i> (n=18)	18(100,0)	-	-
<i>S. Agona</i> (n=9)	9 (100,0)	-	-
<i>S. Montevideo</i> (n=15)	15 (100,0)	-	-
<i>S. Enteritidis</i> (n=12)	12 (100,0)	-	-
<i>S. Stanleyville</i> (n=6)	6 (100,0)	-	-
<i>S. Infantis</i> (n=12)	11 (91,7)	-	1 (8,3) NAL*;TET**
<i>S. Typhimurium</i> (n=3)	3(100,0)	-	-
<i>S. Typhimurium</i> monofazni (n=1)	1 (100,0)	-	-
<i>S. Mbandaka</i> (n=6)	6(100,0)	-	-
<i>S. Senftenberg</i> (n=7)	7 (100,0)	-	-
<i>S. Jerusalem</i> (n=2)	2 (100,0)	-	-
<i>S. Thompson</i> (n=1)	1 (100,0)	-	-
<i>S. Amsterdam</i> (n=1)	1(100,0)	-	-
<i>S. Colindale</i> (n=1)	1 (100,0)	-	-
<i>S. Dahra</i> (n=1)	1 (100,0)	-	-
<i>S. Livingstone</i> (n=1)	1 (100,0)	-	-
<i>S. enteric</i> subspecies <i>enterica</i> (1,3,19 : i : -) (n=4)	4(100,0)	-	-

* Nalidixic acid 30 µg (NAL);

** Tetracycline 30 µg (TET)

Od ukupno 100 izolata koji su obuhvaćeni ispitivanjem, kod 99% izolata ustanovljena je osetljivost na svih 14 antibiotika. Samo kod jednog izolata *S. Infantis* (n=12) utvrđena je rezistencija na dva antibiotika (nalidiksinsku kiselinu (30 µg) i tetraciklin (30 µg)).

6. DISKUSIJA

6.1. Učestalost nalaza *Salmonella* serovarijeteta u hrani i komponentama hrane za životinje

Prema rezultatima serološke tipizacije izolata *Salmonella*, iz hrane za životinje na našem epizootiološkom području, tokom 2 godine ispitivanja (period 2012-2014. godina), najfrekventnije su ustanovljavani serovarijeteti: Tennessee (18%) i Montevideo (15%). Serovarijetet Tennessee se ne razmatra kao serovarijetet od posebnog značaja u epidemiologiji salmoneloze. U periodu od 1995. do 2009, *S. Tennessee* je identifikovana kao etiološki agens u 0.1% svih prijavljenih slučajeva salmoneloza (CDC, 2011). U Republici Srbiji, u periodu od 1999-2010, nema izveštaja ni o jednom slučaju infekcije ljudi izazvane ovim serovarijetetom (WHO, 2015). Međutim, ovaj serovarijetet *Salmonella* se često ustanovljava u hrani za životinje. U velikoj Britaniji, *S. Tennessee* je jedan od pet najčešće ustanovljavanih serovarijeteta *Salmonella* u hrani za goveda, svinje i živinu (Papadopoulou i saradnici, 2009). Veoma učestalo ovaj serovarijetet je ustanovljen u hrani i komponentama hrane za životinje u Danskoj (Christensen i saradnici, 1997). Pretpostavka je da *S. Tennessee* odlikuje dobra sposobnost preživljavanja u prirodnom okruženju, a posebno na biljnoj materiji koja je glavna komponenta hrane za životinje. Eksperimentalno je potvrđena sposobnost izolata *S. Tennessee* da se vezuju na površinu celog i rezanog lišća kupusa i zelene salate i to u značajno većem broju u odnosu na serovarijetete Braenderup, Negev i Newport (Patel i Sharma, 2010). Takođe, istraživanja su potvrdila visoku otpornost ovog serovarijeteta na isušivanje i njegovu sposobnost da dugo vremena preživljava u skladištenoj hrani (Aviles i saradnici, 2013). Eksperimentalno je potvrđeno da je broj vijabilnih ćelija (CFU) *S. Tennessee* u hrani sa niskim sadržajem vode, značajno viši u poređenju sa drugim serovarijetetima *Salmonella* posle 24 sata (Aviles i saradnici, 2013). Takođe, u mleku u prahu, broj *S. Tennessee* se veoma malo redukuje tokom 30 dana čuvanja, što potvrđuje njegovu visoku otpornost na isušivanje (Aviles i saradnici, 2013). Jedna od početnih pretpostavki ovog istraživanja je bila da se frekventno ustanovljavanje ovog serovarijeteta u hrani za životinje može dovesti u vezu sa njegovom sposobnošću da formira biofilm, što doprinosi njegovoj rasprostranjenosti u prirodi (na biljnoj materiji) ili u objektima za proizvodnju hrane za životinje.

Drugi najčešće ustanovljavan serovarijetet *Salmonella* u hrani za životinje u ovom istraživanju je Montevideo (n=15). Infekcije ljudi i životinja koje su izazvane ovim serovarijetetom, zabeležene su širom sveta (Kim i saradnici, 2004). Infekcije kod ljudi uobičajeno rezultiraju pojavom dijareje, abdominalnih grčeva, mučninom i povraćanjem (Lawlor i Reinert, 2013). *S. Montevideo* je identifikovana kao uzročnik 0,1% svih slučajeva salmoneloza ljudi u Nemačkoj, pri čemu je tokom 2008 i 2009 godine, prijavljeno 65/38 slučajeva infekcija ljudi izazvanih ovim serovarijetetom (Stocker i saradnici, 2011). Prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije, *S. Montevideo* je u Republici Srbiji identifikovana kao uzročnik salmoneloze ljudi 2004. godine (WHO, 2015). U Sjedinjenim Američkim Državama *S. Montevideo* je među deset najučestalije ustanovljenih serovarijeteta *Salmonella* u hrani (Allard i saradnici, 2012).

Dva serovarijeteta od posebnog značaja za javno zdravlje: *S. Enteritidis* i *S. Infantis* činili su značajan procenat izolovanih sojeva (po 12% svaki), što ukazuje da je hrana za životinje njihov značajan rezervoar. Međutim, značaj koji salmonele koje se ustanovljavaju u hrani za životinje mogu imati u pojavi salmoneloza životinja i ljudi, veoma je teško proceniti. Mali broj epidemioloških istraživanja je obuhvatio retrogradne analize izvora infekcije za ljude do hrane za životinje, i potvrdio direktnu vezu između *Salmonella* u hrani za životinje i pojave infekcije kod ljudi (Crump i saradnici, 2002; Jones, 2011). *Salmonella* spp. u hrani za životinje predstavljaju rizik za kolonizaciju i/ili infekciju životinja, a posledično i ljudi koji konzumiraju proizvode životinjskog porekla. Precizni podaci o značaju hrane za životinje kao izvora epidemiološki važnih sojeva *Salmonella*, nedostaju, jer se izolati uobičajeno ne tipiziraju do serovarijeteta.

Serovarijeteti: Agona (n=9), Senftenberg (n=7), Stanleyville (n=6) i Mbandaka (n=6), činili su značajan procenat izolata u ovom ispitivanju. Prema literaturnim podacima, oni se često ustanovljavaju u hrani za životinje, a takođe se uobičajeno izoluju sa površina u objektima za njihovu preradu, pa ih pojedni autori razmatraju kao „*feed adapted*“ (Nesse i saradnici, 2003; Vestby i saradnici, 2009b). Ovaj termin ne ukazuje na neki specifični mehanizam adaptacije, već se koristi u značenju da se uobičajeno ustanovljavaju u hrani za životinje. Serovarijetet Mbandaka je poslednjih godina jedan od najučestalije ustanovljenih serovarijeteta salmonela kod ljudi, a često se izoluje i kod životinja, pre svega živine (Vidanović i saradnici, 2008).

6.2. Congo red agar test

Kultivacijom na Congo red agaru tokom 5 dana na temperaturi od 20°C, 98% izolata *Salmonella* spp. iz hrane za životinje je ekspresioniralo jednu ili obe komponente ključne za formiranje matriksa biofilma. Viša temperatura inkubacije (37°C) nepovoljno je uticala na ovu pojavu, tako da su svi izolati formirali kolonije SAW morfotipa odnosno, nisu produkovali ni *curli* fimbrije ni celulozu. Inhibitorni efekat temperature više od 30°C objašnjava se činjenicom da se maksimalna ekspresija glavnog transkripcionog regulatora *csgD* (*curli subunit genes*) koji pokreće transkripciju gena odgovornih za produkciju *curli* fimbrija i celuloze, odigrava na temperaturama nižim od 30°C (Römling i saradnici, 2000; Zogaj i saradnici, 2001; Solano i saradnici, 2002; Gerstel i Römling 2003).

Laviniki i saradnici (2015) su sproveli istraživanje na 54 izolata *Salmonella* serovarijeteta: Agona, Anatum, Cerro, Infantis, Mbandaka, Montevideo, Morehead, Newport, Orion, *Salmonella enterica* (O:3,10), *Salmonella enterica* (O:16:c:-), Schwarzengrad, Senftenberg, Tennessee, Typhimurium i Worthington izolovanih iz sastojaka hrane za životinje i sa opreme iz objekata za njihovu preradu. Svi izolati formirali su kolonije RDAR morfotipa na temperaturi od 28°C, a na 37°C kolonije SAW morfotipa.

Vestby i saradnici (2009b) su ispitali 148 izolata *Salmonella* serovarijeteta: Agona, Montevideo, Senftenberg i Typhimurium koji su poreklom iz ribljeg brašna i fabrika za proizvodnju hrane. Na Congo red agaru, za 8 dana inkubacije na 20°C, 74% izolata *S. Typhimurium* formiralo je kolonije RDAR morfotipa, međutim čak 55% izolata *S. Agone* i 19% izolata *S. Senftenberg* formiralo je kolonije BDAR morfotipa. RDAR morfotip kolonija ustanovljen je kod 90% sojeva *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* poreklom iz kliničkog materijala ljudi i životinja i hrane inkubacijom na temperaturi od 28°C (Römling i saradnici, 2003).

Solano i saradnici (2002) su ispitali 204 izolata *S. Enteritidis* različitog porekla. Posle 96h inkubacije na temperaturi od 28°C, ustanovljen je najveći procenat RDAR kolonija (66%), zatim SAW (27,5) i BDAR (1,5%).

6.3. Pelikula test

Formiranje pelikule kod *Salmonella* prvi su opisali Römling i Rhode (1999). Karakteristična osobina *Salmonella* je da se tokom rasta u tečnim podlogama vezuju za bočne zidove epruvete na granici dva agregatna stanja, formirajući pelikule (Romling i Rhode, 1999). Granica između dva agregatna stanja (tečna hranljiva podloga-vazduh) za salmonele predstavlja povoljnu sredinu koja im omogućava pristup i kiseoniku i hranljivim materijama (Solano i saradnici, 2002).

U ovom istraživanju 46% izolata *Salmonella* spp. iz hrane za životinje je formiralo čvrstu, stabilnu pelikulu deblju od 1mm (+++), kultivacijom u hranljivo siromašnoj podlozi (LB) tokom 6 dana na temperaturi od 20°C. Viša temperatura inkubacije (37°C) je nepovoljno uticala na sposobnost formiranja pelikule kod svih ispitanih serovarijeteta *Salmonella* u obe hranljive podloge. Izuzetak predstavljaju izolati serovarijeteta Enteritidis (n=12), koji su i na ovoj temperaturi u LB bujonu, formirali čvrste, stabilne pelikule (+++).

Stimulativni efekat deficita hranljivih materija i temperature niže od 30°C na sposobnost formiranja pelikule poznat je u literaturi i opisan od strane više autora (Latasa i saradnici, 2005; Jonas i saradnici, 2007). Pojava se može objasniti činjenicom da se maksimalna ekspresija *csgD* promotera koji je odgovoran za produkciju *curli* fimbrija, celuloze i BapA proteina, odigrava u uslovima niske koncentracije hranljivih materija i na temperaturama nižim od 30°C. Značajnu ulogu u agregaciji bakterija i formiranju pelikule, pored matriksa (*curli* fimbrije i celuloza), ima BapA protein, koji je slabo povezan sa površinom ćelije, a luči se sekretornim putem preko BapBCD tipa I proteina koji kodira *bapABCD* operon (Latasa i saradnici, 2005; Jonas i saradnici, 2007; Vestby i saradnici, 2009b). Prekomerna produkcija BapA proteina dovodi do jačanja pelikule, a nedostatak BapA može se nadomestiti hiperprodukcijom *curli* fimbrija, ali ne i celuloze (Latasa i saradnici, 2005). Sposobnost izolata *S. Enteritidis* da formiraju pelikulu na višoj temperaturi može se objasniti aktivacijom gena odgovornih za sintezu komponenti matriksa na temperaturi iznad 30°C.

Solano i saradnici (2002) su sproveli istraživanje na 204 izolata *S. Enteritidis* različitog porekla kultivacijom u dve hranljivo različite podloge (LB i ATM) i na dve temperature (28°C i 37°C). Pelikulu je formiralo 71% izolata u Luria-Bertani bujonu za 96h na temperaturi od 28°C. Kultivacijom u ATM (hranljivo siromašnija podloga), 97%

izolata je formiralo pelikulu već nakon 4h inkubacije na temperaturi od 37°C. Postojanje makroskopski vidljive razlike u sposobnosti formiranja pelikule u LB i ATM na 28°C autori objašnjavaju pretpostavkom da je svaki biofilm fenotip karakterističan za skup uslova i jedinstven za dato okruženje.

O'Leary i saradnici (2013) su sprovedli istraživanje na ukupno 172 izolata *S. Typhimurium* (142 izolata poreklom iz hrane životinjskog porekla i 30 izolata iz kliničkih materijala od svinja) na sposobnost formiranja pelikule. Kultivacijom u Luria Bertani bujonu na temperaturi od 22°C za 96h, 14% (20/142) izolata iz hrane je formiralo čvrstu, stabilnu pelikulu, dok je ovu sposobnost ispoljilo svega 3,3% (1/30) kliničkih izolata.

Vestby i saradnici (2009a) su ustanovili statistički značajnu ($p < 0,01$) korelaciju između sposobnosti formiranja pelikule i serovarijeteta *S. Agona* i *S. Montevideo*. Pretpostavlja se da je formiranje pelikule način da se spreči isparavanje vode i stvaranje mikrookoline sa visokom a_w (Water activity-aktivnost vode) vrednošću.

U pojedinim istraživanjima je ustanovljena pozitivna korelacija između rezultata pelikula i Congo red agar testa (Vestby i saradnici, 2009b; White i saradnici, 2006). Međutim, poređenje ova dva testa može biti problematično, jer kultivacija na čvrstoj i u tečnoj podlozi rezultira drugačijom regulacijom gena (Wang i saradnici, 2004).

Formiranje biofilma ne zavisi samo od vrste bakterija, već unutar iste vrste postoje značajne razlike među sojevima i serovarijetetima, kao i među izolatima istog serovarijeteta. Sposobnost formiranja pelikule u ovom istraživanju, može se dovesti u vezu sa serovarijetetom, jer je kod svih izolata *Salmonelle* Enteritidis ustanovljeno da formiraju čvrstu, stabilnu pelikulu na višoj temperaturi inkubacije, za razliku od ostalih.

6.4. Test na mikrotitracionim pločama upotrebom boje kristal-violet

Test na mikrotitracionim pločama je u širokoj upotrebi za ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma kod većeg broja izolata iste ili različitih vrsta bakterija. Formiranje biofilma je pod uticajem različitih faktora, uključujući raspoloživost hranjivih materija, pH, temperaturu, period inkubacije, gustinu suspenzije bakterije i karakteristike kontaktne površine (Stepanović i saradnici, 2003; Giaouris i saradnici, 2005). Površine od plastičnih materijala su pogodne za upotrebu zbog hidrofobne nepolarne prirode (Donlan, 2002). Test na mikrotitracionim pločama izveden je kultivacijom u LB i TSB, na temperaturama od 20°C i 37°C.

Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđen je stimulatívni efekat deficita hranljivih materija (kultivacija u LB) i niže temperature inkubacije (20°C) na sposobnost produkcije biofilma izolata *Salmonella*. Ovo se može objasniti činjenicom da se maksimalna ekspresija glavnog transkripcionog regulatora CsgD odigrava pod aerobnim uslovima, pri deficitu hranljivih materija i temperaturama nižim od 30°C (Römling, 2005; Jonas i saradnici, 2007).

Slične rezultate objavili su autori: Solano i saradnici, 2002; Stepanović i saradnici, 2003; Stepanović i saradnici, 2004; Agarwal i saradnici, 2011; Díez-García i saradnici, 2012; Karaca i saradnici, 2013; Castelijns i saradnici, 2013; Cabarkapa i saradnici, 2015).

Stepanović i saradnici (2003) su ispitali uticaj tri različite temperature inkubacije (22°C, 30°C i 37°C) na formiranje biofilma 30 izolata *S. enterica* (*S. Enteritidis* n=29 i *S. Typhimurium* n=1) u TSB bujonu. Izolati su formirali biofilmna sve tri temperature, ali je najveća produkcija biofilma ustanovljena posle 48h inkubacije na temperaturi od 22°C.

Karaca i saradnici (2013) su ispitali uticaj različitih temperatura inkubacije (5°C, 20°C i 37°C), pH vrednosti LB bujona (4,5, 5,5, 6,5 i 7,4) i koncentracija NaCl (0,5, 1,5, 5,5 i 10,5%) na sposobnost formiranja biofilma 4 izolata *S. enterica* (*S. Typhimurium*, *S. Infantis* i *S. Roughform*) testom na mikrotitar pločama. Maksimalna produkcija biofilma ustanovljena je na temperaturi od 20°C posle 48h inkubacije.

Cabarkapa i saradnici (2015) su ispitali 14 izolata *S. Enteritidis* poreklom iz fecesa i organa živine i hrane za životinje, na sposobnost formiranja biofilma inkubacijom u TSB bujonu na temperaturama od 25°C i 37°C. I u ovom istraživanju su

svi izolati formirali statistički značajno veću količinu biofilma ($p < 0,05$) na 25°C u poređenju sa vrednostima dobijenim inkubacijom izolata na 37°C.

Razlike u sposobnosti formiranja biofilma u odnosu na raspoloživost hranljivih materija, potvrđene su u istraživanju Stepanovića i saradnika (2004). Oni su koristili četiri različite hranjive podloge: moždano srčani bujon (BHI); tripton soja bujon (TSB), mesni bujon (MB) i razređeni 1/20TSB bujon u kojima su ispitali 122 izolata *Salmonella* spp. na sposobnost produkcije biofilma testom na mikrotitracionim pločama. Najviše izolata (72,9%) je formiralo biofilm u 1/20 razređenom TSB bujonu. Agarwal i saradnici (2011) su ispitali uticaj raspoloživosti hranljivih materija (upotrebom LB i TSB) na produkciju biofilma 24h, 48h i 72h inkubacije devet različitih serovarijeteta *Salmonella* (*Abortus equi*, *Paratyphi*, *Budapest*, *Typhimurium*, *Grumpensis*, *Typhi 901*, *Berta*, *Java* i *Bonariensis*). Produkcija biofilma bila je jača u LB u odnosu na TSB, posle 48h inkubacije. Jakih i umerenih proizvođača biofilma bilo je znatno više kultivacijom u LB podlozi u odnosu na TSB bujon.

Test na mikrotitracionim pločama je pogodan kao skrining metoda u ispitivanju većeg broja serovarijeteta *Salmonella* i izolata istog serovarijeteta. U ovom istraživanju uočene su razlike u produkciji biofilma između serovarijeteta kao i između izolata istog serovarijeteta, pri istim uslovima kultivacije.

Slične rezultate našim nalazimo u prethodno pomenutom istraživanju Agarwal i saradnici (2011) koji su analizom sposobnosti produkcije biofilma kod 151 izolata *S. enterica* različitog porekla a koji su činili 69 serovarijeteta, ustanovili da produkcija biofilma nije u korelaciji sa serovarijetetom, već sojem. Od ukupno 31 izolata *S. Typhimurium*, 22 (71%) izolata kategorisano umerenim, zatim 19% jakim i 10% slabim biofilm producerima. Kao i između 14 sojeva *S. Galinarum*, 71% su bili jaki, dok su 29% izolata bili umereni.

Takođe, Castelijn i saradnici (2013) nisu ustanovili korelaciju u sposobnosti formiranja biofilma između serovarijeteta *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* i *S. Infantis*, kao i između sojeva istog serovarijeteta. Najveća razlika u izmerenim ekstinkcijama optičke prozračnosti uočena je kod 78% izolata *S. Typhimurium* i 67% *S. Infantis* koji su pokazali slabu biofilm produktivnost ili nisu formirali biofilm, dok je *S. Derby* kod 82% izolata formirao slab biofilm. Visoka produkcija biofilma je zabeležena

kod *S. Brandenburg* (80%), u odnosu na ostale serovarijetete *S. Typhimurium* 22%, *S. Infantis* 33% i *S. Derby* 8% koji su takođe pokazali visoku biofilm produkciju.

Díez-García i saradnici (2012) su ustanovili korelaciju između serovarijeteta *Salmonella enterica* i sposobnosti formiranja biofilma. Od ukupno 69 testiranih izolata koji pripadaju serovarijetetima *Typhimurium*, *Newport*, *Paratyphi B*, *Poona*, *Derby*, *Infantis*, *Enteritidis*, *Virchow*, *Agona* i *Typhi*, utvrđeno je da svi jaki biofilm produceeri pripadaju serovarijetetima *S. Agona* i *S. Typhi*, dok su izolati serotipova *S. Paratyphi B* i *S. Virchow* kategorisani kao slabi proizvođači biofilma. Sojevi *S. Newport* su procenjeni umerenim biofilm producerima. Ostali serovarijeteti pokazali su veće varijacije u sposobnosti da formiraju biofilm

Solano i saradnici (2002) su ustanovili pozitivnu korelaciju između sposobnosti formiranja pelikule i sposobnosti formiranja biofilma na mikrotitracionim pločama Karaca i saradnici (2013) nisu ustanovili pozitivnu korelaciju između sposobnosti formiranja pelikule i količine biofilma izmerenog u test na mikrotitracionim pločama sa kristal violet bojom.

Solano i saradnici, (2002) su ispitivanjem sposobnosti formiranja pelikule 204 izolata *S. Enteritidis* utvrdili da 71% izolata formira čvrstu, debelu pelikulu u LB bujonu RDAR morfotip kolonija formiralo je 93% tih sojeva tri izolata je BDAR morfotip. Izolati (27,5%) koji nisu formirali pelikulu, Kongo crvenom agaru su formirali kolonije SAW morfotipa. Korelacija između morfotipa i sposobnosti formiranja biofilma na mikrotitracionim pločama potvrđena je u istraživanju Malcova i saradnici (2008).

Uporednom analizom rezultata primenjenih testova za utvrđivanje sposobnosti produkcije biofilma (Congo red test, kristal violet test i pelikula test) na temperaturi inkubacije od 20°C, ustanovljena je korelacija između morfotipa kolonija na Congo red agaru i sposobnosti produkcije biofilma u kristal violet testu i pelikula testu. RDAR morfotip se dovodi u vezu sa jakom produkcijom biofilma i formiranjem čvrste, debele pelikule (+++), dok se PDAR i BDAR morfotipovi dovode u vezu sa umerenom produkcijom biofilma i tankom pelikulom (++) . SAW morfotip se u oba testa dovodi u vezu sa slabom biofilm produkcijom.

Uporednom analizom pomenutih testova na temperaturi inkubiranja od 37°C u LB i TSB, ustanovljena je statistički značajna korelacija između kristal violet testa i pelikula testa, ali ne i između morfotipa kolonija na Congo red agaru. Inkubacijom na

temperaturi od 37°C svi ispitani izolati su formirali kolonije SAW morfotipa. Dvanaest izolata *S. Enteritidis* (100%) su kultivacijom u LB na temperaturi od 37°C procenjeni jakim biofilm producerima i svi su formirali stabilne, čvrste (+++) pelikule. Ovakav nalaz izolata *S. Enteritidis* pod ovim uslovima kultivacije, može se objasniti činjenicom da je oko 30% genoma *Salmonella* spp. različito regulisano u agaru i bujonu (Steenackers i saradnici, 2012). Pojava SAW morfotipa pri ovoj temperaturi inkubacije je najverovatnije posledica nefunkcionalnosti *csgD* transkripcionog regulatora, dok se izvestan stepen adhezije dobijen primenom testova u tečnim podlogama može pripisati aktivaciji različitih setova gena koji omogućavaju sintezu fimbrija tip 1 čija sinteza je uslovljena temperaturom od 37°C (Steenackers i saradnici, 2012).

Na osnovu statističke obrade dobijenih rezultata, sposobnost formiranja biofilma može se dovesti u vezu sa morfotipom kolonija formiranih na agaru (Congo red), ali ne i za serovarijetet kao i morfotip kolonija unutar istog serovarijeteta.

6.5. Skening elektronska mikroskopija (SEM)

Rezultati ovog istraživanja biće upoređeni sa rezultatima drugih autora: Castelijn i saradnici, 2012; Wang i saradnici, 2013b.

Castelijn i saradnici (2012) su kultivacijom 51 izolata *S. Typhimurium* u TSB bujonu i 1/20TSB na temperaturama od 25°C i 37°C, pokazali da produkcija biofilma zavisi od uslova životne sredine i da je povezana sa poreklom sojeva. Klinički izolati su formirali biofilmove u obe podloge na 25°C i 37°C. Međutim, izolati poreklom iz industrijskih pogona formirali su biofilm samo kultivacijom u 1/20 razređenom TSB na 25°C, što ukazuje da uslovi okoline utiču na ekstracelularni matriks i morfologiju biofilma.

Wang i saradnici (2013b), su u periodu od sedam dana, pratili razvoj biofilma na površini od nerđajućeg čelika, mešane bakterijske kulture koju su činili šest različitih sojeva *S. enterica* subspecies *Typhimurium*, *Agona*, *Heidelberg*, *Derby*, *Indiana* i *Infantis* kultivisanih u TSB bujonu na temperaturi od 20°C primenom CLSM i SEM. Prvog dana inkubiranja zapažene su samo pojedinačne ćelije neravnomerno raspoređene po površini čelika i manji ćelijski agregati (mikrokolonije). Trećeg dana zapaženi su većinom ćelijski agregati, dok je petog dana primećen biofilm koji pokriva više od 80% površine čelika. Sedmog dana je ustanovljen zero biofilm.

Rezultati dobijeni u testu na mikrotitracionim pločama kojim su odabrani izolati *S. Montevideo* i *S. Enteritidis* procenjeni jakim biofilm producerima, potvrđeni su skening elektronskom mikroskopijom

Činjenica je da salmonele imaju sposobnost adherencije za različite materijale (plastiku, čelik, teflon, staklo i dr.) koje se uobičajeno koriste u objektima prehrambene industrije i objektima za proizvodnju hrane za životinje, ali se stepen adherencije razlikuje u zavisnosti od vrste materijala pri istim eksperimentalnim uslovima (Vestby i saradnici, 2009b; Patel i Sharma, 2010; Lianou i Koutsoumanis, 2012).

Skening elektronskom mikroskopijom ustanovljene su zrele biofilm strukture odabranih izolata *Salmonella* koji su procenjeni jakim biofilm producerima u testu na mikrotitracionim pločama.

Formiranje pelikule u uslovima niske koncentracije hranljivih materija i pri temperaturi inkubacije od 20°C objašnjava se prekomerenom produkcijom BapA proteina. Deficitarnost ili disfunkciju BapA proteina u tečnoj podlozi može nadomestiti hiperprodukcija *curli* fimbrija ali ne i celuloze, što dovodi do formiranja čvrste pelikule u uslovima niske koncentracije hraniva (Latasa i saradnici, 2005).

Metoda pripreme preparata za vizuelizaciju biofilma dovode do značajne izmene biofilm arhitekture od svog prirodnog oblika jer oštećuje matriks biofilma. Mnogo više informacija o biofilmu može se dobiti primenom tehnika za *in situ* vizualizaciju, kao što je konfokalna laserska skening mikroskopija (CLSM). Primenom CSLM dobija se trodimenzionalna slika biofilm strukture i omogućava uvid u celularni i polimerni sastav biofilma (Kamjunke i saradnici, 2012). Vizualizacija bakterijske površine (flagele, fimbrije, kapsula kao i interakcija ćelija-ćelija) na formiranje biofilma omogućena je kombinacijom konfokalne laserske skening mikroskopije (CLSM) i skening elektronske mikroskopije (SEM).

6.6. Elektroforeza u pulsnom polju (PFGE)

Elektroforeza u pulsnom polju predstavlja zlatni standard za molekularnu tipizaciju *Salmonella* i drugih vrsta bakterija kako bi se utvrdio stepen genetske povezanosti između izolata iste vrste ili serotipa (Ross i Heuzenroeder, 2005; Myers, 2009). Zahvaljujući visokom stepenu razdvajanja fragmenata, rezultati PFGE omogućavaju da se izvrši identifikacija izvora infekcije i/ili kontaminacije kao i da se na osnovu dobijenog profila epidemiološki povežu izolati kod pojave oboljenja. Samim tim PFGE metoda predstavlja podršku za sprovođenje epizootioloških i epidemioloških mera kontrole i/ili eradikacije oboljenja koja su opasna po zdravlje ljudi i životinja (Vidanović i saradnici, 2008; Bailey i saradnici, 2010).

Restrikcioni enzimi koji prepoznaju mala mesta u hromozomu koriste se za generisanje velikih fragmenta DNK (Molbak i saradnici, 2006). Ovi fragmenti se odvajaju konstantno menjajući pravac u električnom polju tokom elektroforeze. Enzimi se koriste za uzimanje otisaka, a izabrani su na osnovu dužine sekvence prepoznavanja enzima i sadržaja GC (Römling i saradnici, 1994). Za *Salmonella* otisak *Xba*I (5'... TCTAGA ... 3') je enzim izbora, a kad izolati zahtevaju dalju karakterizaciju *Spe*I i/ili *Bln*I nukleaza enzim se takođe smatra dobrim izborom (Levin, 2010; Zou i saradnici, 2010). Kako se PFGE zasniva na razdvajanju fragmenta DNK, nakon digestije restriktivnim enzimom dobija se 10-20 fragmenata različite dužine. Ovi fragmenti su suviše veliki da bi se mogli razdvojiti klasičnom elektroforezom u agarozu pa se primenjuje tehnika pulsirajućeg električnog polja. Tako, nakon digestije i elektroforeze PFGE ako je profil dve ili više bakterija identičan, one pripadaju istom klonu i obrnuto, ako se nakon digestije i elektroforeze PFGE profil dve ili više bakterija razlikuje, one ne pripadaju istom klonu. Prema objavljenim podacima izolati se ne mogu razlikovati između sebe ako restrikciona šema daje isti broj fragmenata iste molekularne težine, dok se izolati koji su tesno povezani i ukoliko se desio jedan genetički događaj koji je uslovio pojavu tri benda razlike, mogu da se razlikuju (Tenover i saradnici, 1995).

Hrana za životinje je kombinacija sastojaka životinjskog i biljnog porekla, a izvori kontaminacije *Salmonella* vrstama mnogobrojni. Mesto za proizvodnju hrane je jedan od mogućih, ali retko istraživanih izvora kontaminacije finalnih proizvoda, iako je poznato da hranom prenosivi patogeni, kao što su *Salmonella* spp. mogu dospeti u finalne proizvode kontaktom sa kontaminiranom opremom tokom proizvodnog procesa.

Tokom dvogodišnjeg perioda (2012-2014), iz uzoraka hrane za životinje poreklom iz proizvodnih objekata izolovano je 16 različitih serovarijeteta *Salmonella*. Slično rezultatima drugih istraživanja, učestalo su izolovani pojedini serovarijeteti koji se razmatraju kao „feed adapted“, *S. Agona*, *S. Montevideo* i *S. Senftenberg* (Vestby i saradnici, 2009a; Nesse i saradnici, 2003). Retrospektivnom analizom porekla hrane (Tabela 5.13.), u proizvodnim objektima A, B i C, u odnosu na ukupan broj izolovanih *Salmonella*, ustanovljena je značajna učestalost serovarijeteta *S. Tennessee*, *S. Montevideo* i *S. Infantis*. Ovi serovarijeteti izolovani su ponavljano tokom dvogodišnjeg perioda ispitivanja. Polazeći od pretpostavke da ponavljana izolacija i veća učestalost ovih, u odnosu na druge ustanovljavane serovarijetete *Salmonella*, može biti posledica njihove perzistencije na mestima proizvodnje hrane, ispitali smo njihov genetički diverzitet i multićelijske obrasce ponašanja.

Na osnovu *SpeI* (Slika 5.10. i 5.11.) i *XbaI* makrorestrikcionog profila (Slika 5.12. i 5.13) ustanovljeno je da su izolati *S. Montevideo* identični, kao i izolati *S. Infantis*, dok su izolati *S. Tennessee* genetički najraznovrsniji, iako razlike među njima ne prelaze 10% (Slika 5.10. i 5.11.). Varijacije manje od 10% ukazuju na pripadnost istom klonu.

Nesse i saradnici (2003) su kod četiri najučestalija serotipa *Salmonella*: *Senftenberg*, *Agona*, *Montevideo* i *Kentucky*, izolovanih iz fabrika za proizvodnju hrane za ribe, ustanovili samo dva različita PFGE profila. Mala je verovatnoća da određenim sastojkom hrane ili preko ptica, malih glodara, ili insekata, isti klon nekog serovarijeteta *Salmonella* ponavljano dospeva u hranu, u odnosu na verovatnoću da taj klon već postoji (egzistira) u fabrikama za proizvodnju hrane u biofilm zajednicama.

Iako objekti za proizvodnju hrane za životinje podrazumevaju održavanje suvog okruženja, kondenzacija uslovljena promenama temperature može obezbediti dovoljno vlage na pojedinim mestima, koja omogućavaju razvoj biofilмова različitih bakterija, uključujući i salmonele (Møretro i saradnici, 2009). Formiranje biofilma *Salmonella* vrsta na abiotičkim površinama deo je njihovog životnog ciklusa (Jonas i saradnici, 2007; Steenackers i saradnici, 2012). Razvoj molekularnih tehnika istraživanja (PFGE-*pulsed-field gel electrophoresis* i plasmid profile typing) pružio je dokaze da klonovi različitih serovarijeteta *Salmonella* (takozvani „hous strain“) mogu perzistirati mesecima, pa čak i godinama u fabrikama za proizvodnju hrane (Nesse i saradnici,

2003; Vestby i saradnici, 2009a; Vestby i saradnici, 2009b; Møretro i saradnici, 2009; Habimana i saradnici, 2010). Takođe je dokazan i pozitivni efekat za rast *Salmonella* u multispecies biofilmovima koji se sastoji od vrsta *Staphylococcus* i *Pseudomonas*, koje se najčešće pojavljuju u fabrikama za proizvodnju hrane kao perzistirajuće bakterije (Habimana i saradnici, 2010). Najveći broj izolata *S. Montevideo*, *S. Tennessee* i *S. Infantis* u ovom ispitivanju ispoljilo je sposobnost produkcije komponenti matriksa biofilma. Sposobnost sinteze *curli* fibrija i celuloze je od ključnog značaja za formiranje biofilma (Vestby i saradnici, 2009b; Steenackers i saradnici, 2012).

U više slučajeva epidemija ljudi izazvanih salmonelama istraživanja su identifikovala hranu za životinje kao izvor istih serovarijeteta, iako je veoma teško kod epidemija salmoneloza pratiti izvor do hrane za životinje zbog ograničene indetifikacije životinja i ograničene evidencije na farmi (Crump i saradnici, 2002). Švedska ima sveobuhvatni nadzor „od farme do trpeze“ u kontroli *Salmonella* koji prepoznaje važnost svakog koraka u lancu ishrane, uključujući i hranu za životinje i objekte za njihovu proizvodnju. Takav sveobuhvatni sistem dao je izvrsne rezultate u padu učestalosti humanih salmoneloza (Crump i saradnici, 2002; Swedish Zoonosis Center, 2001). U našoj zemlji, nadzor nad fabrikama za proizvodnju hrane i bakterijskom kontaminacijom hrane za životinje nije dovoljno razvijen i nije adekvatno integrisan sa nadzorom mikrobiološke kontaminacije proizvoda životinjskog porekla namenjenih ishrani ljudi, kao ni pojavama alimentarnih infekcija kod ljudi. Takođe, serotipizacija *Salmonella* izolovanih iz hrane za životinje i kliničkih materijala poreklom od životinja, ograničava se na 5 serovarijeteta *S. enterica* subsp. *enterica*: Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Infantis i Hadar, pa pravi podaci nedostaju. Strategije redukcije *Salmonella* moraju biti usmerene na sve serovarijetete *Salmonella*, a ne samo na nekoliko odabranih (Forshell i Wierup, 2006).

Identifikacija istog klona serovarijeteta *S. Montevideo* i *S. Infantis*, kao i mali genetički diverzitet serovarijeteta *S. Tennessee*, koji su tokom dve godine ponavljano ustanovljavani u uzorcima hrane za životinje iz tri proizvodna objekta, posredno ukazuju na opravdanu mogućnost njihove perzistencije u fabrikama za proizvodnju hrane. Ekspresija RDAR morfotipa kolonija, , potvrđuje dodatno ovu pretpostavku. Uobičajene mere dezinfekcije nisu efikasne u eliminaciji bakterija organizovanih u biofilm, uključujući i *Salmonella* spp. (Møretro i saradnici, 2009; Steenackers i

saradnici, 2012). Stoga se programi za kontrolu *Salmonella* u hrani za životinje, moraju bazirati ne samo na njihovom otkrivanju u gotovim proizvodima, već i u proizvodnom lancu. Neophodna je implementacija HACCP koncepta (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) i efikasnog programa sanitacije koji treba da obezbede siguran proces proizvodnje (Forshell i Wierup, 2006).

6.7. Osetljivosti *Salmonella* spp. na antibiotike

Od ukupno 100 izolata koji su obuhvaćeni ispitivanjem, kod 99% izolata ustanovljena je osetljivost na svih 14 korišćenih antibiotika. Samo kod jednog izolata *S. Infantis* utvrđena je rezistencija na dva antibiotika (nalidiksinsku kiselinu (30 µg) i tetraciklin (30 µg).

Salmonella vrste su tokom 20.veka decenijama bile kategorisane kao „antibiotik predvidive bakterije“. Drukčije rečeno, to su bile bakterije koje su uvek bile osetjive na sve ispitujuće antibiotike, odnosno, kod njih nije bilo zabeležene rezistencije. Tako je bilo sve do početka 70-tih godina prošlog veka kada su počeli pristizati prvi naučni izveštaji o pojavi rezistencije na tetraciklin ili ampicilin kod *Salmonella* vrsta izolovanih od farmških životinja. Ovakvi rezultati su bili donekle i očekivani zbog toga što su tetraciklin i ampicilin bili najviše upotrebljavani antibiotici kod životinja na teritoriji današnje EU. Međutim, da bi se ova problematika mogla prodiskutovati na validan način potrebno je da se naglasi da izuzetno veliki značaj u proceni i interpretaciji rezultata osetljivosti na antibiotike kod *Salmonella* ima i vrsta uzoraka iz kojih su *Salmonell*-e izolovane. Naime, iz uzoraka poreklom od životinja iz intenzivnog uzgoja tokom prethodne 3 decenije u svetu su bili izolovani sojevi *Salmonella* vrsta rezistentni na 3 ili više (u nekim slučajevima preko 10) antibiotika, uključujući i fluorohinolone i cefalosporine III generacije (Parven i saradnici, 2007; Chao i saradnici, 2007; Prapas i saradnici, 2008; EFSA, 2012; Wang i saradnici, 2013c). Najvažniji razlog za to je upotreba antibiotika kod životinja, u terapijske svrhe ali ako se posmatra istorijski, značajna je i upotreba antibiotika kao promotera rasta koja je u EU bila aktuelna do početka 21. veka, kao i profilaktička upotreba antibiotika koja je dugo bila dozvoljena. Slično tome, zbog široke upotrebe antibiotika kod ljudi, nisu retki slučajevi izolacije *Salmonella* iz uzoraka poreklom od čoveka sa multiplom rezistencijom na antibiotike. Glavni uzrok pojave rezistencije kod ovih sojeva *Salmonella* jeste primena antibiotika i

selektivni pritisak kao posledica toga. Sa druge strane, *Salmonella* vrste prisutne u uzorcima hrane za životinje, u procesu proizvodnje i skladištenja ne dolaze u kontakt sa antibioticima. U skladu sa tim nema selektivnog pritiska. Stoga se u uzorcima hrane za životinje i ne očekuje pojava rezistencije kod sojeva *Salmonella*, odnosno rezultati ovog dela ispitivanja dobijeni u ovoj disertaciji nisu iznenađujući. Zbog toga nije ispravno komparirati rezultate o rezistenciji na antibiotike kod istih serovarijeteta *Salmonella* vrsta izolovanih iz različitih vrsta uzoraka.

Rastuća rezistencija bakterija na antibiotike postaje fokus rasprave na globalnom nivou i sve veća pretnja očuvanju javnog zdravlja. Visoka prevalencija rezistencije na antibiotike kod salmonela najčešće je ustanovljena u zemljama u razvoju, a nastaje zbog prekomerne primene antibiotika (Velhner i saradnici, 2010). Švedska ima najuspešniji program kontrole salmoneloze i monitoringa rezistencije bakterija na antibiotike, jer program kontrole obuhvata različite nivoe u proizvodnji, uključujući i hranu za životinje. Međutim, u našoj zemlji nema monitoringa koji uključuje ispitivanje rezistencije salmonela izolovanih iz hrane za životinje, ni u unutrašnjem prometu, ni kod uvoza. Na taj način, nepoznata je uloga hrane za životinje kao vektora u prenošenju sojeva sa rezistencijom ili multiplom rezistencijom na antibiotike (Milanov i saradnici, 2012).

Može se reći da su ispitivanja osetljivosti bakterija izolovanih iz uzoraka hrane za životinje na antibiotike, gotovo u potpunosti zapostavljena. Nadzor nad mikrobiološkom bezbednošću hrane za životinje, podrazumeva izolaciju i identifikaciju bakterija iz roda *Salmonella*, ali ne i ispitivanje njihove osetljivosti na antibiotike. Intenzivan unutrašnji promet, a posebno uvoz hrane i komponenata hrane za životinje, predstavlja potencijalni put za prenos sojeva sa rezistencijom na antibiotike i njihov ulazak u lanac ishrane. Monitoring rezistencije na antibiotike sprovodi se kod izolata *Salmonella* poreklom iz kliničkih materijala od životinja. U prethodnim istraživanjima koja su obuhvatila različita epizootiološka područja u Srbiji, ustanovljena je rezistencija enrofloksacin kod sojeva salmonela izolovanih od ljudi i živine, što se smatra izrazito nepovoljnom epidemiološkom pojavom (Velhner i saradnici, 2014). Najveća pažnja naučne i stručne javnosti u svetu usmerena je na otkrivanje sojeva *Salmonella* rezistentnih na fluorohinolone jer su ovi antibiotici važni u medicinskoj praksi za lečenje ljudi (Vidanović i saradnici, 2008; Velhner i saradnici, 2015). Kod

98% izolata *Salmonella* utvrđena je osetljivost na sve antibiotike korišćene u ovom ispitivanju. Zbog toga ne možemo proceniti hranu za životinje značajnim vektorom za prenošenje sojeva rezistentnih na antibiotike, ali to ne isključuje potrebu za monitoringom rezistencije kod izolata *Salmonella* iz hrane za životinje, posebno kada je u pitanju hrana animalnog porekla i sirovine iz uvoza.

7. ZAKLJUČCI

1. Iz hrane za životinje sa područja južnobačkog i sremskog okruga Vojvodine, najčešće su izolovani serovarijeteti *Salmonella* Tennessee (18%) i Montevideo (15%).
2. Serovarijeteti od posebnog značaja u epizootiologiji i epidemiologiji salmoneloza, Enteritidis i Infantis izolovani su u značajnom procentu (po 12%), zbog čega hrana za životinje predstavlja njihov značajan izvor.
3. Kultivacijom na Congo red agaru tokom 5 dana inkubacije na temperaturi od 20°C 98% izolata *Salmonella* iz hrane za životinje produkovalo je jednu ili obe komponente ključne za formiranje matriksa biofilma (*curli* fimbrije i celuloza).
4. Temperatura inkubacije od 20°C i deficit hranljivih materija u podlozi za kultivisanje povoljno deluju na formiranje biofilma i u ovim uslovima na mikrotitracionim pločama su svi ispitivani izolati *Salmonella* formirali biofilm.
5. Temperatura inkubacije od 37°C, imala je nepovoljan uticaj na formiranje biofilma bez obzira na vrstu hranljive podloge. Ukupno 35 izolata *Salmonella* se u ovim uslovima na mikrotitracionim pločama pokazala slabim proizvođačima biofima, a 17 izolata uopšte nije formiralo merljiv biofilm.
6. Uprkos tome što je temperatura inkubacije od 37°C imala nepovoljan uticaj na formiranje biofilmova, svi izolati serovarijeteta Enteritidis su bili izuzetak i u ovim uslovima su produkovali dobre biofilmove na mikrotitracionim pločama.
7. Sve izolate *Salmonella* (bez obzira na serovarijetet) odlikovala je izražena sposobnost formiranja biofilma na granici dva agregatna stanja (tečnost-vazduh).
8. Izolati *Salmonella* poreklom iz hrane za životinje, ispoljili su karakterističnu osobinu da biofilm ne formiraju na hidrofobnoj površini (polistirenu) koja je potopljena u tečnost. Pod takvim uslovima biofilm su formirali samo u graničnoj zoni između tečnosti i vazduha. Ova osobina se ne zapaža u odnosu na hidrofilni supstrat (nerđajući čelik), na kojem su ispitivani izolati *Salmonella* formirali biofilm
9. Primenom metode PFGE potvrđeno je da svi izolati serovarijeteta Montevideo, Tennessee i Infantis, pripadaju istim klonovima. Ovi klonovi su ponavljano izolovani tokom više meseci ispitivanja, iz uzoraka hrane za životinje poreklom

iz istog proizvodnog objekta. To ukazuje na moguće perzistiranje ovih klonova u objektima za proizvodnju hrane za životinje i da ovi klonovi *Salmonella* u finalne proizvode dospevaju procesnom kontaminacijom, a ne preko kontaminiranih sirovina.

10. Na osnovu rezultata ispitivanja osetljivosti izolata *Salmonella* spp. na antibiotike, hrana za životinje nije bila značajan izvor sojeva *Salmonella* sa rezistencijom i multiplom rezistencijom na antibiotike jer su svi ispitani izolati bili osetljivi na sve ili na većinu primenjenih antibiotika.

8. LITERATURA

1. Adams, M.R., Moss, M.O. (2008). Food microbiology. 3 Ed. Royal Society of Chemistry.
2. Agarwal, R.K., Singh, S., Bhilegaonkar, K.N., Singh, V.P. (2011). Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. International Food Research Journal, (18) 5, 1493 -1498.
3. Allard, M.W., Luo, Y., Strain, E., Li, C., Keys, C.E., Son, I., Stones, R., Musser, S.M., Brown, E.W. (2012). High resolution clustering of *Salmonella enterica* serovar Montevideo strains using a next-generation sequencing approach. BMC Genomics,13-32.
4. Allison, D.G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A., Gilbert, P. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. FEMS Microbiol Lett 167, 179-184.
5. Allison, D.G. (2003). The Biofilm Matrix. Biofouling, 19 (2), 139-150.
6. Alvarez, J., Porwollik, S., Laconcha, I., Gisakis, V., Vivanco, A.,Gonzalez, I., Echenagusia, S., Zabala, N., Blackmer, F., McClelland, M., Rementeria, A., Garaizar, J. (2003). Detection of a *Salmonella enterica* serovar California Strain Spreading in Spanish Feed Mills and Genetic Characterization with DNA Microarrays. Applied and Environmental Microbiology, 69 (12), 7531–7534.
7. Anderl, J.N., Zahller, J., Roe, F., Stewart, P.S. (2003). Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother , 47, 1251–1256.
8. Anriany, Y., Sahu, S.N., Wessels, K.R., McCann, L.M., Joseph, S.W. (2006). Alteration of the Rugose Phenotype in *waaG* and *ddhC* Mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is Associated with Inverse Production of Curli and Cellulose. Applied and Environmental Microbiology, (72) 7, 5002-5012.
9. Anwar, H., Strap, J.L., Costerton, J.W. (1992). Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. Antimicrob Agents Chemother, 36, 1347–1351.

10. Armitano, J., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C. (2014). Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environmental Microbiology Reports*, (6) 6, 534-544.
11. Austin, J.W., Sanders, G., Kay, W.W., Collinson, S.K. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 162 (2), 295-301.
12. Aviles, B., Klotz, C., Eifert, J., Williams, R., Ponder, M. (2013). Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 252-259.
13. Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E. P. and Høiby, N. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1175–1187.
14. Bailey, S., Richardson, J., Cox, N., Cosby, D. (2010). *Salmonella*. In V. Juneja, J. Sofos. *Pathogens and Toxins in Foods*, 108-116.
15. Barak, J.D., Jahn, C.E., Gibson, D.L., Charkowski, A.O. (2007). The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 20 (9), 1083–1091.
16. Barak, J.D., Liang, A.S. (2008). Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in *Salmonella enterica* contamination of tomato plants. *PLoS ONE*, 3(2), e1657.
17. Barak, J.D., Gorski, L., Liang, A.S., Narm, K.E. (2009). Previously uncharacterized *Salmonella enterica* genes required for swarming play a role in seedling colonization. *Microbiology*, 155 (11), 3701–3709.
18. Benskin, C.M.H., Wilson, K., Jones, K., Hartley, I.R. (2009). Bacterial pathogens in wild birds: A review of the frequency and effects of infection. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 84,349–373.
19. Berge, A.C., Wierup, M. (2012). Nutritional strategies to combat *Salmonella* in mono-gastric food animal production. *Animal* 6, 4, 557–564.
20. Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12 (9), 2385–2397.

21. Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4(4), 413–423.
22. Bogvist, S., Hansson, I., Bjerselius, U.N., Hamilton, C., Wahlström, H., Noll, B., Tysen, E., Engvall, A. (2003): *Salmonella* isolated from animals and feed production in Sweden between 1993 and 1997. *Acta Vet. Scand.*, 44, 181.
23. Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. (2009). Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium. Author manuscript, published in "Veterinary Microbiology 135, 3-4, 18.
24. Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13 (1), 20-26.
25. Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (7), 2465-2467.
26. Brooun A., Liu S., Lewis K. (2000). A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44, (3), 640-646.
27. Buffet-Bataillon, S., Le Jeune, A., Le Gall-David, S., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A. (2012). Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 12 (67), 2837-2842.
28. Burmolle, M., Thomsen, T.R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homoe, P., (2010). Biofilms in chronic infections—a matter of opportunity—monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 324–336.
29. Butcher, G.D., Miles, R.D. (1995). Minimizing microbial contamination in feed mills producing poultry feed. Coop. Ext. Serv. Publ. No. VM93. University of Florida, Gainesville.

30. Cabarkapa, I., Škrinjar, M., Lević, J., Kokić, B., Blagojev, N., Milanov, D., Suvajdžić, Lj. (2015). Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis in vitro. *Acta Veterinaria*, 65 (3), 371-389.
31. Caldwell, D.E., Wolfardt, G.M., Korber, D.R., Karthikeyan, S., Lawrence, J. R., Brannan, D.K. (2002). Cultivation of microbial communities. In: *Manual of Environmental Microbiology*, 2nd ed. Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J. and Stetzenback L. D. (Eds.). ASM Press, Washington, DC, 92–100.
32. Carrasco, E., Morales-Rueda, A., García-Gimeno, R.M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International* 45, 545–556.
33. Castelijn, G.A.A., van der Veena, S., Zwietering, M.H., Moezelaara, R., Abee T. (2012). Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling*, 28(1), 51-63.
34. Castelijn, G.A.A., Parabarsing, J.A., Zwietering, M.H., Moezelaar, R., Abee, T. (2013). Surface behaviour of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* and *S. Infantis*. *Veterinary Microbiology*, (161) 3–4, 305-314. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011. National *Salmonella* surveillance annual data summary, 2009. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA.
35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011. National *Salmonella* surveillance annual data summary, 2009. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA.
36. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: Annual Report. (<http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf>).
37. Cevallos-Cevallos J.M., Gu, G., Danyluk M.D., van Bruggen A.H.C. (2012). Adhesion and splash dispersal of *Salmonella enterica* Typhimurium on tomato leaflets: Effects of rdar morphotype and trichome density. *International Journal of Food Microbiology*. 160, 58-64.

38. Chao, G.X., Zhou, X.H., Jiao, X.A., Qian, X.Q., Xu, L. (2007). Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4, 277-284.
39. Christensen, J.P., Brown, D.J., Madsen, M., Olsen, J.E., Bisgaard, M. (1997). Hatchery-borne *Salmonella enterica* serovar Tennessee infections in broilers. *Avian Pathology*. 26, 155-168.
40. CLSI 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Ninth Edition, document M07-A9, Vol.32 No2, Replaces M07-A8, Vol 29 No2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
41. Coburn, B., Sekirov, I., Finlay, B. B. (2007). Type III Secretion Systems and Disease. *Clinical microbiology reviews*. Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada. 20,(4) 535–549.
42. Collinson, S.K., Emödy, L., Müller, K.H., Trust, T.J., Kay, W.W. (1991). Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology*, (173) 15, 4773-4781.
43. Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, G.K. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, (238) 86–95.
44. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews of Microbiology*, 49, 711-745.
45. Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318–1322.
46. Crosa, J.H., Brenner, D.J., Ewing, W.H., Falkow, S. (1973). Molecular relationships among the *Salmonella*. *Journal Bacteriology*, 115: 307-315.
47. Crump, J.A., Griffin, P.M., Angulo, F.J. (2002). Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human illness. *Clin. Infect. Dis.*, 35, 859–865.
48. Dahiya, J.P., Wilkie, D.C., Van Kessel, A.G., Drew, M.D. (2006). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim. Feed Sci. Tech.* 129, 60-88.

49. Danese, P.N., Pratt, L.A., and Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriol.*, 182, 3592–3596.
50. Davey, M.E., O’Toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 847-867.
51. Davidson, C.J., White, A.P., Suretee, M.G. (2008). Evolutionary loss of the rdar morphotype in *Salmonella* as a results of high mutation rates during laboratory passage. *ISME Journal* 2, 293-307.
52. De Rezende, C.E., Anriany, Y., Carr, L.E., Joseph, S.W., Weiner, R.M. (2005). Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7345-7351.
53. Deibel, V., Schoeni J. (2003), Biofilms: Forming a Defense Strategy for the Food Plant, *Food Safety magazine*. Izvor: <http://www.foodsafetymagazine.com>.
54. DeKeersmaecker, S.C., Vanderleyden, J. (2003). Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology*, 149 (8), 1953-1956.
55. Dhanoa, A., Fatt, Q.K. (2009). Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: Epidemiology, clinical characteristics and it's association with severe immunosuppression. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 8, 15.
56. Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, 31, 173-180.
57. Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881–890.
58. Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, (2), 167-193.
59. Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, 5, 1213–1219.
60. Dunne, WM., Jr, (2002). FOCUS, Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately *Clinical Microbiology Reviews*, 15, (2), 155-166.

61. EFSA (2008). European Food Safety Authority. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. The EFSA Journal, 720, 1-84.
62. EFSA (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. The EFSA Journal, 9 (3), 2090.
63. EFSA (2012). European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. EFSA Journal, 10, 2598.
64. EFSA (2013a). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, 250.
65. EFSA (2013b). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Panel; Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, 1-138.
66. EFSA and ECDC (2014). European Food Safety Authority and European centre for disease prevention and control. (2014). The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012 EFSA. EFSA Journal, 12 (2), 3547.
67. EFSA and ECDC (2015). EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 13(1):3991
68. Evangelopoulou, G.D., Burriel, A., Spyrou, V., Ευαγγελοπούλου, Γ. Δ., Σπύρου, Β. (2010). A concise history of *Salmonella* spp.. nomenclature. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 61(4), 323-329.
69. FAO (2010): Manual of Good Practices for the Feed Industry. Link: <http://www.fao.org/docrep/012/i1379e/i1379e00.pdf>

70. Flemming, H.C., Wingender, J., Griegbe, T., Mayer, C. (2000). Physico-chemical properties of biofilms. In: *Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control*. Evans, L. V. (Ed.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 19–34.
71. Flemming, H.C., Wingender, J. (2002). Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance, in: Bitton, G. (Ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, Wiley, New York.
72. Flemming, H.C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, 8 (9), 623-633.
73. Foley, S.L., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Rhodes, B., Fedorka-Cray, P.J., Simjee, S., Zhao, S. (2006). Comparison of Subtyping Methods for Differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Isolates Obtained from Food Animal Sources. *J. Clin Microbiol.*, 44, 3569-3577.
74. Forshell, L.P., Wierup, M. (2006). *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev sci tech Off int Epiz* 25 (2), 541-554.
75. Gerstel, U., Römling, U. (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Microbiol.* 3, 638–648.
76. Gerstel, U., Römling, U. (2003). The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella Typhimurium*. *Research in Microbiology*, 154 (10), 659–667.
77. Giaouris, E.D., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E. (2005). Effect of Temperature, pH, and Water Activity on Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on Stainless Steel Surfaces as Indicated by the Bead Vortexing Method and Conductance Measurements. *Journal of Food Protection*, (68) 10, 2149-2154.
78. Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Skandamis, P.N., Nychas, G.J. (2012). Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments, in: Barakat, S.M.M. (Ed.), *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen*. InTech, Rijeka, Croatia, 57–180.

79. Gibson, D.L., White, A.P., Snyder, S.D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M., and Kay, W.W. (2006). *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188,(22), 7722-7730.
80. Golovlev, E.L. (2002). The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. *Mikrobiologija*, 71, 293–300.
81. Gordon, C. A., Hodges, N. A., Marriott, C. (1988). Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Antimicrob Agents Chemother*, 22, 667-674.
82. Gordon, C.A., Hodges, N.A., Marriott, C. (1991) Use of slime dispersants to promote antibiotic penetration through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Antimicrob Agents Chemother*, 35, 1258– 1260.
83. Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K., Römling, U. (2010). Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.*, 192, 456–466.
84. Grimont, P.A.D., Weill, F.H. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
85. Gunell, M. (2010). *Salmonella enterica*: Mechanisms of Fluoroquinolone and Macrolide Resistance. Thesis PhD. University of Turku, Finland.
86. Gupte, A.R., de Rezende, C.L.E., Joseph, S.W. (2003). Induction and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, 11 (69), 6669-6675.
87. Habimana, O., Møretrø, T., Langsrud, S., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Heir, E. (2010). Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. *BMC Veterinary Research*, 6-48.
88. Habimana, O., Nesse, L.L., Møretrø, T., Berg, K., Heir, E., Vestby, L.K., Langsrud, S. (2014). The persistence of *Salmonella* following desiccation under

- feed processing environmental conditions: a subject of relevance. *Letters in Applied Microbiology*, (59) 5, 464-470.
89. Hald T., Morris, J.G., Morris E. P. (2013). Foodborne infections and intoxications. Academic Press. *Emerging infections diseases*, 541.
 90. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, 2, 95–108.
 91. Hartman, P.A. (1997). The evolution of food microbiology. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M. P., L. R. Beuchat, and T. J. Montville(Eds.). ASM Press, Washington, DC., 3–12.
 92. Heaton, J.C., Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (3), 613–626.
 93. Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66 (3), 373-395.
 94. Heukelekian, H., Heller, A. (1940). Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology*. (40) 4, 547-558.
 95. Heyndrickx, M., Pasmans, F., Ducatelle, R., Decostere, A., Haesebrouck, F. (2005). Recent changes in *Salmonella* nomenclature: The need for clarification. *The Veterinary Journal*, 170 (3), 275-277.
 96. Hoelzer, K., Switt, A.I.M., Wiedmann, M. (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet. Res.*, 42, 34.
 97. Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., Miller, S.I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436, 1171–1175.
 98. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 322–332.
 99. Humphrey, T. (2004). *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nature review microbiology*, 2, 504-509.

100. International Organisation for Standardisation (ISO) 6579:2008: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., Geneva, Switzerland.
101. IZJZS-Institut za javno zdravlje Srbije (2014) Izvor: <http://www.batut.org.rs/download/influenca/2013ZarazneBolesti2.pdf>
102. IZJZS-Institut za javno zdravlje Srbije (2015) Izvor: <http://www.batut.org.rs/download/izvestaji/Izvestaj%20o%20zaraznim%20boles tima%202014.pdf>
103. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. (2008). Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2007. godina. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine, 2, 4, 27, 30-31.
104. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. (2009). Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2008. godina. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine, 3, 9-10, 32-34.
105. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. (2010). Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2009. godina. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine, 4, 9, 32-34.
106. IZJZV - Institut za javno zdravlje Vojvodine. (2011). Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2010. godina. Godišnji izveštaj. Novi Sad: Institut za javno zdravlje Vojvodine, 5, 6, 24, 27-28.
107. Jain, S., Chen, J. (2007). Attachment and biofilm formation by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. *Journal of Food Protection*, 70 (11), 2473-2479.
108. Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Römling, U., Belova, L.M., Melefors, Ö, (2006). Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *Rev Sci Tech off int epiz* 25(2): 541-554.
109. Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Römling, U., Belova, L. M. (2007). Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology*, (7), 70.
110. Jonas, K., Edwards, A. N., Simm, R., Romeo, T., Römling, U., Melefors, O. (2008). The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by

- directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular Microbiology*, 70 (1), 236–257.
111. Jonas, K., Edwards, A. N., Ahmad, I., Romeo, T., Römling, U., Melefors, O. (2010). Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella* Typhimurium. *Environmental Microbiology*, 12 (2), 524–540.
 112. Jones, F.T., Axtell, R.C., Rives, D.V., Scheideler, S.E., Tarver, F.R., Walker, R.L., Wineland, M. J. (1991). A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. *J. Food Prot.* 54, 502–507.
 113. Jones, F.T. (2011). A review of practical *Salmonella* control measures in animal feed. *J. Appl. Poult. Res.*, 20, 102–113.
 114. Jones, H.C., Roth, I.L., Sanders, W.M. (1969). Electron Microscopic Study of a Slime Layer. *Journal of Bacteriology*, (99) 1, 316-325.
 115. Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M., Römling, U. (2006). Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.*, 60, 602–616.
 116. Kamjunke, N., Spohn, U., Fütting, M., Wagner, G., Scharf, E., Sandrock, S., Zippel, B. (2012). Use of confocal laser scanning microscopy for biofilm investigation on paints under field conditions. *Int. Biodeter. Biodegr.* 69, 17–22.
 117. Kaplan, J.B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., Fine, D.H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology*, 185, (16) 4692-4698.
 118. Kaplan, J.B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, 3 (89), 205-218.
 119. Karaca, B., Akcelik, N., Akcelik, M. (2013). Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey. *Biologia* 68, (1), 1–10.
 120. Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B., Biggs, C.A. (2011). “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1869–1881.
 121. Kim, J.Y., Park, Y.J., Lee, S.O., Song, W., Jeong, S.H., Young, A., Yoo, Y.A., Lee, K.Y. (2004). *Case Report: Bacteremia Due to Salmonella enterica*

- Serotype Montevideo Producing Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase (DHA-1). *Ann Clin & Lab Sci*, 34 (2), 214-217.
122. Kimbrough T. G., Miller S. I. (2000). "Contribution of *Salmonella* Typhimurium type iii secretion components to needle complex formation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97, 11008–11013.
 123. Kjelleberg, S., Molin, S. (2002). Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 254–258.
 124. Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., Sela, S. (2009). Intenalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (19), 6076-6086.
 125. Kumar, C. G., Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42, 9-27.
 126. Kumon, H., Tomochika, K., Matunaga, T., Ogawa, M., Ohmori, H. (1994). A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas* exopolysaccharides. *Microbiology and Immunology*, 38, 615-619.
 127. Lapidot, A., Römling, U., Yaron S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology* 109, 229–233.
 128. Lapidot, A., Yaron, S. (2009). Transfer of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *Journal of Food Protection*, 72 (3), 618–623.
 129. Lappin-Scott, H.M., Costerton, J.W. (1989). Bacterial biofilms and surface fouling. *Biofouling* 1, 323-342.
 130. Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Penadés, J.R., Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 5(58), 1322-1339.

131. Laviniki, V., Lopes, G.V., Pellegrini, D.P. (2015). Biofilm formation by *Salmonella enterica* strains isolated from feed mills. *Safepork*, 209-212.
132. Lawlor, E., Reinert, L.R.N. (2013). Outbreak of *Salmonella* Montevideo Infections Associated with a Graduation Party – Lincoln County. Izvor: (http://www.kdheks.gov/epi/download/Grad_Party_Salmonella_Report_Final.pdf).
133. Ledebøer, N.A., Jones, B.D. (2005). Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. *Journal of Bacteriology*, 187 (9), 3214-3226.
134. Ledebøer, N.A., Frye, J.G., McClelland, M., Jones, B.D. (2006). *Salmonella enteric* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infection and Immunity*, 74 (6), 3156–3169.
135. Lević, J., Sredanović, S. (2009). Prilagođavanje i sprovođenje zakonodavstva EU na nacionalnom nivou. TAIEX workshop, Novi Sad, AGR 32323.
136. Levin, R. (2010). In *Rapid Identification and Characterization of Salmonella. Foodborne Pathogens by Molecular Techniques*. 79-129.
137. Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 999-1007.
138. Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc.)*, 70, 267-274.
139. Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *National Reviews. Microbiology.*, 5, 48-56.
140. Lianou, A., Koutsoumanis, K.P. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, (160) 2, 171-178.
141. Liu, X., Ng, C., Ferenci, T. (2000). Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures. *Journal of Bacteriology*, 182(15), 4158-4164.
142. López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a000398.

143. Maciorowski, K.G., Herrera, P., Jones, F.T., Pillai, S.D., Ricke, S.C. (2006). Cultural and Immunological Detection Methods for *Salmonella* spp. in animal feeds - A Review. *Vet Res Commun* 30(2):127-137.
144. Mack, W.N., Mack, J.P., Ackerson, A.O. (1975). "Microbial film development in a trickling filter". *Journal Microbial Ecology*. 2, 3, 215–226.
145. Mah, T.F., O'Toole, G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 9, 34-39.
146. Malcova, M., Hradecka, H., Karpiskova, R., Rychlik, I. (2008). Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, 129(3–4), 360-366.
147. Malcova, M., Karasova, D., Rychlik, I. (2009). *aroA* and *aroD* mutations influence biofilm formation in *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Letters*, 291 (1), 44–49.
148. Marriott, N. G., Gravani, R. B. (2006). *Principles of Food Sanitation*, Springer, USA
149. Meerburg, B.G., Kijlstra, A. (2007). Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 2774–2781.
150. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (1992). *Biofilms: Science and Technology*. In: NATO ASI Series E, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
151. Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Krnjajić, D., Petrović, J., (2008). Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv veterinarske medicine* 1, 5-15.
152. Milanov, D., Čubrak, N., Petrović, J., Lazić, S. (2010). Mehanizmi povećane otpornosti bakterija u biofilmu na antibiotike. *Arhiv veterinarske medicine*, (3) 2, 3-11.
153. Milanov, D., Stojanović, D., Prunić, B., Čabarkapa, I., Suvajdžić, Lj. (2012). *Salmonella* from animal feed: Biofilm forming abilities and antimicrobial susceptibility. In: *Proceedings of XV International Feed Technology Symposium*, Institute of Food Technology in Novi Sad, Novi Sad, 209-216.

154. Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.*, 55, 165-199.
155. Mišić, D. (2013). Metode mikrobiološke dijagnostike - Ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike. *Elit Medica*, 1-99.
156. Molbak, K., Olsen, J., Wegener, H. (2006). *Salmonella* Infections,. In H. Reimann, D. Cliver (eds.), *Foodborne Infections and Intoxications*. Academic Press, 55-115.
157. Monnet, V., Gardan, R. (2015). Quorum-sensing regulators in Gram-positive bacteria: ‘cherchez le peptide. *Molecular Microbiology*, 97 (2), 181-184.
158. Møretrø, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K., Langsrud, S. (2009). Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 106 (3), 1005–1012.
159. Morita, T., Kitazawa, H., Iida, T., Kamata, S. (2006). Prevention of *Salmonella* cross-contamination in an oilmeal manufacturing plant. *Journal applied microbiology*. 101, 464–473.
160. Myers, R. (2009). The Role of Public Health Laboratories in Supporting Investigations of Food-borne Illness Outbreaks. Maryland DHMH Laboratories.Presentation.
161. Mynt, S.M., Johnson, Y.J., Paige, J.C., Bautista, D.A. (2007): A cross- sectional study of bacterial contamination in plant-protein feed from feed stores in Northern Virginia and Maryland. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 133, 137-148.
162. Nesse, L.L., Nordby, K., Heir, E., Bergsjoe, B., Vardund, T., Nygaard, H. (2003). Molecular analyses of *Salmonella enterica* isolates from fish feed factories and fish feed ingredients. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1075-1081.
163. Ng, W.L., Bassler, B.L.(2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annualreview genetics*. 43, 197–222.
164. Nichols, W.W., Dorrington, S.M., Slack, M.P.E., Walmsley, H.L. (1988). Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 32, 518- 523.
165. Nilsson, R.E., Ross, T., Bowman, J.P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 14–24.

166. Noel, J.T., Arrach, N., Alagerly, A., McClelland, M., Teplitski, M. (2010). Specific Responses of *Salmonella enterica* to Tomato Varieties and Fruit Ripeness Identified by In Vivo Expression Technology. PLoS ONE, 5 (8), e12406.
167. O'Toole, G.A., Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol., 30, 295-304.
168. O'Toole, G.A., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54, 49–79.
169. O'Toole, G. A. (2003). To build a biofilm. J. Bacteriol., 185, 687–2689.
170. Obst, U., Schwartz, T., Volkmann, H. (2006). Antibiotic resistant pathogenic bacteria and their resistance genes in bacterial biofilms. The International journal artificialorgans. 29 (4), 387-394.
171. O'Leary, D., McCabe, E.M., McCusker, M.P., Martins, M., Fanning, S., Duffy G. (2013). Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. International Journal of Food Microbiology 161, 36–43.
172. Ott, C.M., Day, D.F., Koenig, D.W., Pierson, D.L. (2001). The release of alginate lyase from growing *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. Curr Microbiology, 42, 78-81.
173. Pace, J.L., Rupp, M., Roger, G. (2006). Biofilms, infection and antimicrobial therapy, In: Mechanisms of Biofilm resistance to antibiotics, CRC Press Taylor & Francis Group, US, 9-19.
174. Papadopoulou, C., Carrique-Mas, J.J., Davies, R.H., Sayers, A.R., (2009). Retrospective analysis of *Salmonella* isolates recovered from animal feed in Great Britain. Veterinary Record, 165, 681-688.
175. Parsek, M.R., Fuqua, C. (2004). Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. J. Bacteriol., 186, 4427–4440.
176. Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends Microbiol. 13(1):27-33.

177. Parveen, S., Taabodi, M., Oscar, T., Harter-Dennis, J., White, D. (2007). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Recovered From Processed Poultry. *Journal of Food Protection*. 70: 2466-2477.
178. Parys, A.V., Boyen, F., Volf, J., Verbrugge, E., Leyman, B., Rychlik, I., Haesebrouck, F., Pasmans, F. (2010). *Salmonella* Typhimurium resides largely as an extracellular pathogen in porcine tonsils, independently of biofilm-associated genes *csgA*, *csgD* and *adrA*. *Veterinary Microbiology* 144 , 93–99.
179. Patel, J., Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 41-47.
180. Paul, W. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153, 3923–3938.
181. Percival, S.L., Malic, S., Cruz, H., D.W, W. (2011). Introduction to Biofilms, in: Percival, S.L. (Ed.). *Biofilms and Veterinary Medicine*, Springer, London, New York, 1223-1231.
182. Poulsen, V.L. (1999). Microbial biofilm in food processing, *Lebensm.-Wiss.U.-Technol*, 32, 321-326.
183. Prapas, P., Zewde, B., Tadesse, D., Hoet, A., & Gebreyes, W. (2008). Characterization of Multidrug- Resistant *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolated from Humans and Animals. *Food Borne Pathogens and Disease*. 5, 839- 851.
184. Pratt, L.A., Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.*, 30, 285-293.
185. Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., Dorel, C. (2001). Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol* 183,7213-7223.
186. Prouty, A.M., Gunn, J.S. (2003). Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, 71,(12) 7154-7158.

187. Prunić B., Milanov D., Velhner M., Pajić M., Pavlović L., Mišić D. (2016) Clonal persistence of *Salmonella enterica* serovars Montevideo, Tennessee and Infantis in feed factories. *Journal of Infection in Developing Countries*, ISSN 1972-2680, 662-666.
188. Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W. (2000). Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 3357–3363.
189. Rasmussen, M., Eden, A., Bjorck, L.SclA. (2000). A novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* , 68, 6370-6377.
190. Rice, S.A., Koh, K.S., Queck, S.Y., Labbate, M., Lam, K.W., Kjelleberg, S. (2005). Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J. Bacteriol.*, 187, 3477–3485.
191. Roberts, A.P., Mullany, P. (2010). Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Reviews of Anti-Infective Therapy*, 12, (8) 1441-1450.
192. Roberts, M.E., Stewart, P.S. (2005). Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology*, 151,75-80.
193. Rodrigues, D., Teixeira, P., Oliveira, R., Azeredo, J. (2011). *Salmonella enterica* Enteritidis biofilm formation and viability on regular and triclosan-impregnated bench cover materials. *Journal of Food Protection*, 74 (1), 32-37.
194. Römling, U., Hever, T., Tummeler, B. (1994). Bacterial Genome analysis by Pulsed Field Gel Electrophoresis techniques. In A. Chrambach, M. Dunn, B. Radola (eds.), *Advances in Electrophoresis*. VCH. 355-392.
195. Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D., Normark, S. (1998a). Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of Bacteriology*, 180 (3), 722-731.
196. Römling, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K., Normark, S. (1998b). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the agfD promoter. *Molecular Microbiology*, 28 (2), 249-264.

197. Römling, U., Rohde, M. (1999). Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella* Typhimurium on the community level. *FEMS Microbiology Letters* 180, 91–102.
198. Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S., Reinköster, J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, 36 (1), 10-23.
199. Römling, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M., Tschäpe, H. (2003). Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 293 (4), 273-285.
200. Römling, U. (2005). Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 1234-1246.
201. Rosenberg, L.E., Carbone, A.L., Römling, U., Uhrich, K.E., Chikindas, M.L. (2008). Salicylic acid-based poly(anhydride esters) for control of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 593–599.
202. Ross, I., Heuzenroeder, M. (2005). Use of AFLP and PFGE to discriminate between *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT126 isolates from separate food-related outbreaks in Australia. *Epidemiol Infect.* 133, 635–644.
203. Sailer, F.C., Meberg, B.M., Young, K.D. (2003). β -Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letter*, 226, 245–249.
204. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140–1154.
205. Sauli, I., Danuser, J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Rüfenacht, J., Bissig-Choisat, B., Wenk, C., Stärk, 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. *Intional journal food ofmicrobiology.* 100, 289-310.

206. Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G., Bassler, B.L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, 41,(2), 463-476.
207. Scher, K., Römling, U., Yaron, S. (2005). Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Appl. Environ. Microbiol.* 71,1163–1168.
208. Schikora, A., Carreri, A., Charpentier, E., Hirt, H. (2008). The Dark Side of the Salad: *Salmonella* Typhimurium Overcomes the Innate Immune Response of *Arabidopsis thaliana* and Shows an Endopathogenic Lifestyle. *PloS ONE*, 3(5), e2279.
209. Schmidt, H., Hensel, M. (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clinical microbiology reviews.* 17(1),14–56.
210. Schraidt, O., Lefebvre, M.D., Brunner, M.J., Schmied, W.H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Gala'n, J.E., Marlovits, T.C. (2010). Topology and Organization of the *Salmonella* Typhimurium Type III Secretion Needle Complex Components. *PLoS Pathogens*, 6(4) e1000824.
211. Serra, D.O., Richter, A.M., Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of Bacteriology*.
212. Sheffield, C.L., Crippen, T.L. (2012). Invasion and Survival of *Salmonella* in the Environment: The Role of Biofilms, in: Kumar, Y. (Ed.), *Salmonella – A diversified superbug* InTech, Rjeka, Croatia.
213. Simm, R., Lusch, A., Kader, A., Andersson, M., Römling, U. (2007). Role of EAL containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189, 3613–3623.
214. Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (4), 573-583.
215. Smirnova, T.A., Didenko, L.V., Azizbekyan, R.R., Romanova, Y.M. (2010). Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Microbiology*, 79, 413–423.

216. Smith, J.N., Ahmer, B.M. (2003). Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *Journal of Bacteriology*, 185,(4), 1357-1366.
217. Sokolović, M., Ruk, I. (2011). Sigurnost hrane za životinje i primena HACCP-a u tvornicama hrane za životinje. *Stočarstvo*, 65 (3), 219-235.
218. Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43,793–808.
219. Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 18, 96–104.
220. Solomon, E.B., Niemira, B.A., Sapers, G.M., Annous, B.A. (2005). Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *Journal of Food Protection*, 68 (5), 906-912.
221. Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, (31) 2, 572-585.
222. Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J. (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45, 502–531.
223. Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., Švabić-Vlahović, M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20, 339-343.
224. Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., Svabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38 (5), 428-432.
225. Stewart, P.S., Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358, 135-138.
226. Stewart, P.S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 107 -113.
227. Stocker, P., Rosner, B., Werber, D., Kirchner, M., Reinecke, A., Wichmann-Schauer, H., Prager, R., Rabsch, W., Frank, C. (2011). Outbreak of *Salmonella* Montevideo associated with a dietary food supplement flagged in the Rapid

- Alert System for Food and Feed (RASFF) in Germany, 2010. *Euro Surveill*16(50), 200-240.
228. Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., and Lappin-Scott, H.M. (2001a). Detachment, surface migration, and other dynamic behavior in bacterial biofilms revealed by digital time-lapse imaging. *Methods Enzymol.* 337, 306–319.
229. Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., Costerton, J.W. (2001b). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67:5608-5613.
230. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*.56,187-209.
231. Su, L., Chiu, C. (2007). *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, 30, 3, 210–219.
232. Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3–9.
233. Swedish Zoonosis Center (2001) Trends and sources of zoonotic infections recorded in Sweden during 2000. Uppsala, Sweden: Swedish National Veterinary Institute.
234. Tack, K.J., Sabath, L.D.(1985). Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy*,31,204–210.
235. Tenover, F.C., 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 Pulse-Field Gel Electrophoresis. Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (9): 2233-2239.
236. Teplitski, M., Barak, J. D., Schneider, K. R. (2009). Human enteric pathogens in produce: Un-answered ecological questions with direct implications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20 (2), 166–171.
237. Teplitski M., Noel, J.T., Alagely, A., Danyluk, M.D. (2012). Functional genomics studies shed light on the nutrition and gene expression of non-

- typhoidal *Salmonella* and enterovirulent *E. coli* in produce. Food Research International 45, 576–586.
238. Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* biofilms. J. Bacteriol, 182:6482–6489.
239. Trachoo, N. (2003). Biofilms and the food industry. Songklanakarin J. Sci. Technol, 25, 6, 807-815.
240. Ukuku, D.O., Fett, W.F. (2006). Effects of cell surface charge and hydrophobicity on attachment of 16 *Salmonella* serovars to cantaloupe rind and decontamination with sanitizers. Journal of Food Protection, 69 (8), 1835-1843.
241. Vahl, I. J. (1995). Breaking the *Salmonella* chain at the feed mill. Feed Mix. 3, 14–17.
242. Van Acker, H., Van Dijck, P., Coenye, T. (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. Trends in Microbiology, 22 (6), 326-333.
243. Van Houdt, R., Michiels, C.W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. Journal of Applied Microbiology, 109, 1117–1131.
244. Veldman, A., Vahl, H.A., Borggreve, G.J., Fuller, D.C. (1995). A survey of the incidence of *Salmonella* species and Enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. Vet. Rec. 136, 169–172.
245. Velhner, M., Kozoderović, G., Jelesić, Z., Stojanov, I., Ratajac, R., Stojanović, D. (2010). Rezistencija bakterija na hinolone i njen ticaj na zdravlje ljudi i životinja. Veterinarski glasnik, 64:277-285.
246. Velhner, M., Kozoderović, G., Grego, E., Galić, N., Stojanov, I., Jelesić, Z., Kehrenberg, C. (2014). Clonal spread of *Salmonella enterica* Serovar Infantis in Serbia: Acquisition of mutations in the topoisomerase genes *gyrA* and *parC* leads to increased resistance to fluoroquinolones. Zoonoses and Public Health, 61:364-370.
247. Velhner, M., Kozoderović, G., Jelesić, Z. (2015). Antibiotic resistance to fluoroquinolones in *Salmonella* spp.: Recent findings in Serbia and brief overview on epidemiology, molecular typing methods and *Salmonella* control.

First International Symposium of Veterinary Medicine 'One Health - New Challenges' (ISVM2015) 468-472

248. Vestby, L., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E., Nesse, L.L. (2009a). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. BMC veterinary research, 5, 20–25.
249. Vestby, L.K., Moretro, T., Ballance, S., Langsrud, S., Nesse, L.L. (2009b). Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. BMC Veterinary Research, 5, 43.
250. Vidanović, D., Sabo, Z., Kilibarda, N., Živadinović, M., Žarković, A., Matović, K. (2008). Rezistencija na antibiotike i genotipske karakteristike *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Mbandaka. Vet. glasnik 62 (5-6) 351 – 358.
251. Walters, M., Sperandio, V. (2006). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. International Journal of Medical Microbiology, 296, 125-131.
252. Wang, H., Shi, H., Li, Y., Shi, Z., Zhang, X., Baek, C.-H., Mothershead, T., Curtiss, R. (2013a). A Colanic Acid Operon Deletion Mutation Enhances Induction of Early Antibody Responses by Live Attenuated *Salmonella* Vaccine Strains. Infection and Immunity, (81) 9, 3148-3162.
253. Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., Zhou, G. (2013b). In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. International Journal of Food Microbiology, (167) 3, 293-302.
254. Wang, H., Ye, K., Wei, X., Cao, J., Xu, X., Zhou, G. (2013c). Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. Food Control, 33, 378-384.
255. Wang, Q., Frye, J.G., McClelland, M., Harshey, R.M. (2004). Gene expression patterns during swarming in *Salmonella* Typhimurium: Genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. Molecular Microbiology, 52(1), 169–187.
256. Waterman, S.R., Holden, D.W. (2003) Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. Cellular Microbiology, 5 (8), 501–511.

257. Waters, C.M., Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 21, 319-46.
258. Watnick, P., Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm. *Mol. Microbiol.* 34, 586-595.
259. Watnick, P., Kolter, R., (2000). Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 182, 10, 2675-2679.
260. Webb, J.S. (2008). Differentiation and Dispersal in Biofilms. Book section. Izvor: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.461.1709&rep=rep1&type=pdf>
261. White, A.P., Gibson, D.L., Collinson, S.K., Banser, P.A., Kay, W.W. (2003). Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Bacteriology*, 185, (18), 5398-5407.
262. White, A. P., Gibson, D. L., Kim, W., Kay, W. W., Surette, M. G. (2006). Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *J. Bacteriol.*, 188, 3219–3227.
263. White, A.P., Surette, M.G. (2006). Comparative Genetics of the rdar Morphotype in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 24 (188), 8395-8406.
264. White, A. P., Weljie, A. M., Apel, D., Zhang, P., Shaykhutdinov, R., Vogel, H. J. (2010). A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. *PLoS ONE*, 5(7), e11814.
265. Whyte, P., McGill, K., Collins, J.D. (2003). A survey of the prevalence of *Salmonella* and other enteric pathogens in a commercial poultry feed mill. *J. Food Saf.* 23,13–24.
266. World health organization (WHO) (2007). Food safety and foodborne illness. Fact sheet N°237 Reviewed March 2007. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>
267. World Health Organization (WHO) (2015). Global Foodborne Infections Network, year data viewed. Top 15 *Salmonella* serotype list, Top 15 list from a country parameters, Serbia, Institute of Public Health of Serbia.
268. Xu, T. (2007). *Salmonella* Host Specificity and Role of Macrophages in Vivo. University of California, San Diego and San Diego State University, San Diego.

269. Zhang, T.C., Bishop, P.L. (1996). Evaluation of substrate and pH effects in a nitrifying biofilm. *Wat Environ Res*, 68,1107–1115.
270. Zobel, C.E. (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*. 46, 39–56.
271. Zobell, C.E., Allen, E.C. (1935). The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology*, (29) 3, 239-251.
272. Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 6 (39), 1452-1463.
273. Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., Römling, U. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.*, 71, 4151–4158.
274. Zou, W., Lin, W.J., Foley, S.L., Chen, C.H., Nayak, R., and Chen, J.J. (2010). Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles for Identification of *Salmonella* serotypes. *Journal Clinical Microbiology*,48, 3122-3126.

BIOGRAFIJA

Bojana Prunić je rođena 12.02.1983. godine u Beogradu, opština Savski venac, Republika Srbija. Srednju školu, gimnaziju "Svetozar Marković" je završila u Novom Sadu, sa odličnim uspehom. Diplomirala je na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, 2008. godine, gde je i upisala master studije 2009. godine. Master rad pod naslovom "Etiologija, klinička slika i mere preventive mikotoksikoza goveda" odbranila je 10.07.2009. godine. Doktorske akademske studije je upisala 2009. godine na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, i 2011. godine položio sve ispite predviđene planom i programom studija sa prosečnom ocenom 10,0. Međutim, zbog nemogućnosti izbora mentora na Departmanu veterinarske medicine, prelazi na Fakultet veterinarske medicine u Beogradu. Doktorant je odlukom dekana Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu, 08.10.2013. godine odobren prelazak na doktorske akademske studije Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Prelaskom sa Poljoprivrednog fakulteta priznato je 85 ESPB i omogućen upis u drugu godinu studija (III semestar). Senat Univerziteta u Beogradu 28.10.2014. je doneo odluku o podobnosti teme, kandidata i mentora, i dao saglasnost za izradu doktorske disertacije. Godine 2015. položeni su svi ispiti predviđeni planom i programom studija sa prosečnom ocenom 10,0.

Od septembra 2009. godine zaposlena je u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu, gde je odradila pripravnički staž, a državni ispit položila u junu 2011. godine. Zaposlena je na odeljenju za Mikrobiološko ispitivanje hrane za životinje. U zvanje istraživač saradnik izabrana je u oktobru 2011. godine.

Učestvovala je u realizaciji dva naučno-istraživačka projekta:

- projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: "Kontrola biohazardnih agenasa na farmama i primena biotehnoloških postupaka s ciljem da se redukuju rizici u sistemu proizvodnje bezbedne hrane i obezbedi neškodljivo uklanjanje animalnog otpada", broj projekta: TR 20133; rukovodilac projekta dr Branka Vidić (od septembra 2009. do 2011.godine);

- projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: "Praćenje zdravstvenog stanja divljači i uvođenje novih biotehnoloških postupaka u detekciji zaraznih i zoonoznih-analiza rizika za zdravlje ljudi, domaćih i divljih

životinja i kontaminaciju životne sredine", broj projekta: TR31084, rukovodilac projekta dr Tamaš Petrović (od januara 2011.). Kao autor ili koautor do sada je objavila 27 naučnih i stručnih radova u časopisima i na naučnim skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Бојана Прунић

број уписа 16/21

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„ИСПИТИВАЊЕ МОГУЋНОСТИ ФОРМИРАЊА БИОФИЛМА У УСЛОВИМА *IN VITRO* КОД РАЗЛИЧИТИХ СЕРОВАРИЈЕТАТА *SALMONELLA* ВРСТА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ УЗОРАКА ХРАНЕ ЗА ЖИВОТИЊЕ“

- 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, 10.05.2017.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Бојана Прунић

Број уписа: 16/21

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: „ИСПИТИВАЊЕ МОГУЋНОСТИ ФОРМИРАЊА БИОФИЛМА У УСЛОВИМА *IN VITRO* КОД РАЗЛИЧИТИХ СЕРОВАРИЈЕТА *SALMONELLA* ВРСТА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ УЗОРАКА ХРАНЕ ЗА ЖИВОТИЊЕ“

Ментор 1. др Душан Мишић

Ментор 2. др Дубравка Миланов

Потписани

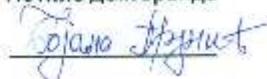


изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

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, 10.05.2017.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„ИСПИТИВАЊЕ МОГУЋНОСТИ ФОРМИРАЊА БИОФИЛМА У УСЛОВИМА *IN VITRO* КОД РАЗЛИЧИТИХ СЕРОВАРИЈЕТА *SALMONELLA* ВРСТА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ УЗОРАКА ХРАНЕ ЗА ЖИВОТИЊЕ“

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, 10.05.2017.

