

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla



Marko P. Dmitrić

**DETEKCIJA SALMONELA VRSTA I
KARAKTERIZACIJA *Salmonella* Enteritidis
i *Salmonella* Typhimurium POREKLOM IZ
LANCA HRANE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Department of Hygiene and Technology of Food of Animal

Origin



Marko P. Dmitrić

**THE DETECTION OF SALMONELLA
SPECIES AND CHARACTERISATION OF
Salmonella Enteritidis and *Salmonella*
Typhimurium FROM FOOD CHAIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

MENTORI

Dr Nedeljko Karabasil, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Dejan Vidanović, viši naučni saradnik

Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo“

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Vlado Teodorović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Ljubiša Šarić, naučni saradnik,

Institut za prehrambene tehnologije Novi Sad

Dr Lazar Ranin, redovni profesor

Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Kompletno istraživanje tokom izrade ove doktorske disertacije sprovedeno je u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta "Kraljevo". Velika je čast biti deo takvog kolektiva, ustanove koja mladom čoveku daje punu podršku za profesionalno usavršavanje. Ovom prilikom želeo bih da se zahvalim svim kolegama iz Instituta koji su mi pomogli, podržavali me i usmeravali tokom izrade doktorske disertacije.

Za ukazano poverenje, korisne savete, razumevanje i neizmernu podršku u trenucima kada mi je bila najpotrebnija, iskreno se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Neđeljku Karabasilu. Nadam se da je ova doktorska disertacija samo početak našeg zajedničkog rada i da ćemo u godinama koje dolaze biti u prilici da zajedno uradimo i mnogo više.

Posebnu zahvalnost na pomoći i znanju koje mi je nesebično preneo, dugujem drugom mentoru, dr Dejanu Vidanoviću.

Članovima komisije zahvaljujem se na korisnim komentarima i dragocnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Kolegama, prijateljima i svima koji su na bilo koji način pomogli, najiskrenije se zahvaljujem.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici - roditeljima, Mileni, Pavlu i Isidori.

DETEKCIJA SALMONELA VRSTA I KARAKTERIZACIJA *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium POREKLOM IZ LANCA HRANE

Kratak sadržaj

Izolacija i identifikacija *Salmonella* spp. ostaje nezamenjiva kao potvrдна metoda u mikrobiologiji hrane i hrane za životinje. Međutim, savremena industrija hrane, ali i javno zdravstvo zahtevaju razvoj novih, brzih metoda za detekciju *Salmonella* spp., jednog od najvažnijih patogenih mikroorganizama prenosivih hranom. Pored toga, tokom epidemioloških studija, uglavnom nije dovoljno da se izolati *Salmonella* tipiziraju do nivoa vrste i serotipa, već je neophodna i primena metoda tipizacije koje mogu napraviti razliku između epidemiološki različitih, ali genetski srodnih izolata. Veliki broj alternativnih metoda, uključujući i real-time PCR protokole, razvijen je i validovan u cilju detekcije *Salmonella* spp. Pored toga, napredak u razvoju molekularnih metoda pružio je alate visoke diskriminatorne moći koji su posebno mesto primene zauzeli pri određivanju izvora kontaminacije hrane, omogućavajući brzu i izuzetno pouzdanu tipizaciju *Salmonella* spp.

Ova doktorska disertacija obuhvata četiri osnovne celine: (1) „In house” validacija real-time PCR protokola za detekciju *invA* i *ttr* gena *Salmonella* spp. u hrani i hrani za životinje; (2) „In house“ validacija real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* u hrani; (3) Razvoj i „in house“ validacija novog real-time PCR protokola za detekciju *invA* gena *Salmonella* spp. u hrani; (4) Molekularna karakterizacija i ispitivanje antimikrobne osetljivosti *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium* izolovanih iz hrane, hrane za životinje i fecesa.

Tokom izrade ove doktorske disertacije formirana je kolekcija od 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i 60 izolata *S. Typhimurium* (po 12 poreklom ljudi, 24 poreklom iz hrane i 24 poreklom iz fecesa živine), a zatim je izvršena njihova molekularna karakterizacija i ispitivanje antimikrobne osetljivosti. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti *Salmonella* izvršeno je disk difuzionom metodom prema EUCAST protokolu, dok je za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije primenjen E test. Molekularna karakterizacija izvršena je primenom PFGE metode (Pulsed Field Gel Electrophoresis) prema „CDC

PulseNet“ protokolu. Dodatno, izvršena je i molekularna tipizacija primenom real-time PCR metode detekcijom *safA* gena *S. Enteritidis* i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium*.

Opsežna validaciona studija prilikom koje su testirani real-time PCR protokoli za detekciju *invA* i *ttr* gena *Salmonella* spp. u hrani i hrani za životinje, dala je odlične rezultate i pokazala da mogu biti upotrebljene kao adekvatna zamena standardnoj metodi. Poređenjem različitih procedura ekstrakcije DNK, niže C_q vrednosti ostvarene su primenom „Chelex ekstrakcije“, nego ekstrakcijom zasnovanoj na termalnoj lizi ćelije.

Nakon optimizacije real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium*, uspešno je izvršena detekcija pomenutih serotipova ispitivanjem 30 uzoraka pilećeg mesa i isto toliko uzoraka pilećih kožica sa vrata. Pored toga metoda je uspešno primenjena i prilikom tipizacije 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i 60 izolata *S. Typhimurium*.

Izvršeno je i dizajniranje prajmera i probe i optimizacija potpuno novog real-time PCR protokola za detekciju *invA* gena *Salmonella* spp. u hrani. Ispitivanje *inclusivity* izvršeno je upotrebom 76 različitih sojeva salmonela, pri čemu nije bilo lažno negativnih rezultata. Provera *exclusivity* ispitana je upotrebom 45 mikroorganizama koji nisu pripadnici roda *Salmonella*, pri čemu nije bilo lažno pozitivnih rezultata. Metoda je uspešno primenjena prilikom ispitivanja pet različitih veštački kontaminiranih kategorija hrane (ukupno 150 uzoraka).

Ispitivanjem genetske sličnosti 60 izolata *S. Enteritidis*, upotrebom enzima *XbaI*, utvrđeno je 20 različitih PFGE profila - genotipova. Ispitivanjem genetske sličnosti 60 izolata *S. Typhimurium*, upotrebom enzima *XbaI*, utvrđen je 21 različit PFGE profil - genotip. Unutar izolata koji pripadaju istom profilu genetska sličnost je iznosila 100% dok je sličnost između različitih genotipova iznosila od 78 do 97% za *S. Enteritidis* i od 77 do 98% za *S. Typhimurium*.

Rezultati ispitivanja 60 izolata *S. Typhimurium* disk difuzionom metodom pokazali su da je 50% izolata rezistentno na ampicilin; 46,67% na tetraciklin; 31,67% na hloramfenikol; 11,67% na trimetoprim i 3,33% na pefloksacin. Utvrđena je osetljivost svih izolata na - azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, gentamicin, meropenem, pefloksacin i tigeciklin. Rezultati ispitivanja 60 izolata *S. Enteritidis* disk difuzionom metodom pokazali su da je 10% izolata rezistentno na pefloksacin; 5% na ampicilin i 1,67% na tetraciklin. Utvrđena

je osetljivost svih izolata na - azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, hloramfenikol, gentamicin, meropenem, tigeciklin, trimetoprim.

Svi rezistentni izolati, nakon disk difuzione metode ispitani su i primenom E test traka.

Ključne reči: *Salmonella*, real-time PCR, PFGE, antimikrobna rezistencija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija mesa

UDK broj: 619:637.5:579

THE DETECTION OF SALMONELLA SPECIES AND CHARACTERISATION OF *Salmonella* Enteritidis and *S.* Typhimurium FROM FOOD CHAIN

SUMMARY

The isolation and identification of *Salmonella* spp. remains irreplaceable as a confirmatory method in the microbiology of food and feed. However, the modern food industry and public health require the development of new, rapid methods for the detection of *Salmonella* spp., one of the most important foodborne pathogens. In addition, during epidemiological studies, it is generally not sufficient to determine *Salmonella* isolates up to the species or the serotype level, but it is also necessary to apply subtyping methods that can distinguish between epidemiologically distinct, but genetically related isolates. A number of alternative methods, including real-time PCR protocols, have been developed and validated for the detection of *Salmonella* spp. In addition, the advances in the development of molecular methods have provided tools of high discriminatory power that have been particularly useful in determining food contamination sources, enabling fast and highly reliable typing of *Salmonella* spp.

This dissertation has four major sections: (1) In-house validation of the real-time PCR protocol for the detection of *invA* and *ttr* genes of *Salmonella* spp. in food and feed; (2) In-house validation of the real-time PCR protocol for the detection of *Salmonella* Enteritidis and *S.* Typhimurium in food; (3) Development and in-house validation of new real-time PCR protocol for the detection of the *invA* gene of *Salmonella* spp. in food; (4) Molecular characterization and antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* Enteritidis and *S.* Typhimurium isolated from food, feed and feces.

An extensive validation study, where real-time PCR protocols for the detection of *invA* and *ttr* of *Salmonella* spp. in food and feed were tested, gave excellent results and showed that they can be used as an adequate replacement for the standard method. By comparing different DNA extraction procedures, lower Ct values were achieved by using "Chelex extraction" rather than by extraction based on the thermal lysis of the cell.

A total of 60 isolates of *Salmonella* Enteritidis and 60 isolates of *S. Typhimurium* (12 originating from humans, 24 originating from food and 24 originating from livestock feces) were collected, followed by their molecular characterization and antimicrobial sensitivity testing. The antimicrobial sensitivity testing of *Salmonella* was performed using the disk diffusion method according to the EUCAST protocol, while the E test was used to determine the minimum inhibitory concentration.

The molecular characterization was performed using the PFGE method (Pulsed Field Gel Electrophoresis) according to the "CDC PulseNet" protocol. In addition, molecular typing was performed using the real-time PCR method by detecting *safA* gene of *S. Enteritidis* and *fliA-IS200* gene *S. Typhimurium*.

After optimizing the real-time PCR protocol for the detection of *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium*, the detection of these serotypes was successfully performed by examining 30 samples of chicken meat and the same number of samples of chicken skin from the neck. In addition, the method was successfully applied to 60 types of isolates *Salmonella* Enteritidis and 60 *S. Typhimurium* isolates.

Additionally, the primers and the probe were designed and a completely new real-time PCR protocol for the detection of the *invA* gene of *Salmonella* spp. in food was optimized. The *inclusivity* test was performed using 76 different *Salmonella* strains, with no false-negative results. The *exclusivity* check was tested using 45 non-*Salmonella* strains, with no false positive results. The method was successfully applied when examining five different artificially contaminated food categories (a total of 150 samples).

By examining the genetic similarity of 60 isolates of *S. Enteritidis*, using *XbaI* enzyme, 20 different PFGE profiles were identified - genotypes. By examining the genetic similarity of 60 *S. Typhimurium* isolates using *XbaI* enzyme, 21 different PFGE profiles were identified - genotype. Within isolates belonging to the same profile, the genetic similarity was 100% while the similarity between the different genotypes ranged from 78 to 97% for *S. Enteritidis* and from 77 to 98% for *S. Typhimurium*.

The results of the study of 60 isolates of *S. Typhimurium* disc diffusion method showed that 50% of the isolates were resistant to ampicillin; 46.67% to tetracycline; 31.67% to

chloramphenicol; 11.67% to trimethoprim and 3.33% to pefloxacin. The sensitivity of all isolates to - azithromycin, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, meropenem, pefloxacin, tigecycline was determined. The results of the study of 60 isolates of the *S. Enteritidis* disc diffusion method showed that 10% of the isolates were resistant to pefloxacin; 5% to ampicillin and 1.67% to tetracycline. The sensitivity of all isolates to - azithromycin, cefotaxime, ceftazidime, chloramphenicol, gentamicin, meropenem, tigecycline, trimethoprim was determined. All resistant isolates, after disc diffusion methods, were also tested using the E test strip.

Key words: *Salmonella*, real-time PCR, PFGE, antimicrobial resistance

Scientific field: Veterinary Medicine

Field of academic expertise: Meat Hygiene and Technology

UDK number: 619:637.5:579

SPISAK SKRAĆENICA

AMP - ampicilin

AMR - rezistencija prema antimikrobnim lekovima

ATCC - American Type Culture Collection

AZM - azitromicin

C - hloramfenikol

CAZ - ceftazidim

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CFU - Colony-forming unit

CN - gentamicin

C_q - quantification cycle

CTX - cefotaksim

DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina

EC - European Commission

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

EFSA - European Food Safety Authority

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

BVL - Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (Germany)

IAC - Internal Amplification Control

ISO - International Organization for Standardization

IZJZS - Institut za javno zdravlje Srbije

LOD - Limit of Detection

MEM - meropenem

MIC - minimalna inhibitorna koncentracija

NCTC - National Collection of Type Cultures

OJEU - Official Journal of the European Union

PCR - Polymerase Chain Reaction

PEF - pefloksacin

PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis

PT - Proficiency Testing

qPCR - Real-Time PCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)

RL - sulfametoksazol

SG - Službeni glasnik Republike Srbije

TE - tetraciklin

TFS - Thermo Fisher Scientific

TGC - tigeciklin

W- trimetoprim

WHO - World Health Organization

WGS - Whole Genome Sequence analysis

XLD - Xylose Lysine Deoxycholate agar

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Istorijat, taksonomija i nomenklatura <i>Salmonella</i> spp	3
2.2. Morfološke, biohemijske i kulturelne osobine	4
2.3. Rast i preživljavanje	5
2.4. Infektivna doza	6
2.5. Adaptiranost na domaćina	6
2.6. Epidemiologija <i>Salmonella</i>	7
2.7. Incidencija salmoneloze ljudi	9
2.8. Patogeneza	11
2.9. Klinička slika	11
2.10. Rezistencija <i>Salmonella</i> prema antimikrobnim lekovima	12
2.11. Metode za detekciju i određivanje broja <i>Salmonella</i> spp	13
2.11.1. Detekcija i izolacija <i>Salmonella</i> spp. u hrani, hrani za životinje i uzorcima iz okruženja u zoni proizvodnje hrane	13
2.11.2. Metode za određivanje broja <i>Salmonella</i>	14
2.12. Detekcija <i>Salmonella</i> spp. primenom polimeraza lančane reakcije (Polymerase Chain Reaction - PCR)	14
2.12.1. Klasičan PCR (Endpoint PCR)	15
2.12.2. Real-time PCR	15
2.13. Metode za tipizaciju <i>Salmonella</i> spp	17
2.13.1. Fenotipske metode tipizacije	18
2.13.1.1. Serotipizacija	18
2.13.1.2. Fagotipizacija	18
2.13.1.3. Rezistotipizacija (određivanje osetljivosti na antimikrobne lekove)	19
2.13.2. Genotipske metode tipizacije	19
2.14. Validacija alternativnih metoda	20
3. CILJ I ZADACI	21

4. MATERIJAL I METODE	22
4.1. Laboratorija za ispitivanje	22
4.2. Real-time PCR aparati korišćeni prilikom validacionih studija	22
4.3. Upotrebljeni referentni sojevi	23
4.4. Materijal iz „proficiency testing“	27
4.5. Veštačka kontaminacija uzoraka	28
4.5.1. Veštačka kontaminacija uzoraka hrane	28
4.5.2. Veštačka kontaminacija uzoraka hrane za životinje	29
4.6. Tip uzoraka i broj uzoraka	29
4.6.1. Hrana i uzorci iz okruženja - detekcija <i>Salmonella</i> spp	29
4.6.2. Hrana za životinje - detekcija <i>Salmonella</i> spp	30
4.6.3. Hrana i uzorci iz okruženja - detekcija <i>Salmonella</i> Enteritidis i <i>S. Typhimurium</i>	31
4.7. Formiranje kolekcije izolata <i>Salmonella</i> Enteritidis i <i>S. Typhimurium</i>	31
4.8. Izolacija <i>Salmonella</i> spp	34
4.9. Detekcija <i>Salmonella</i> spp. u fecesu živine	35
4.10. Serotipizacija	36
4.11. Ekstrakcija DNK <i>Salmonella</i> spp	36
4.12. Real-time PCR detekcija <i>Salmonella</i> spp	37
4.12.1. Protokol za detekciju <i>invA</i> gena (Protokol A)	37
4.12.2. Protokol za detekciju <i>ttr</i> gena (Protokol M)	38
4.12.3. Komercijalni real-time PCR kit	39
4.13. Real-time PCR detekcija <i>Salmonella</i> Enteritidis i <i>S. Typhimurium</i>	41
4.14. Dizajniranje prajmera i proba za detekciju <i>InvA</i> gena <i>Salmonella</i> spp. (Protokol MD)	42
4.15. Određivanje granice detekcije (LOD) i efikasnosti amplifikacije PCR protokola ..	44
4.16. Kontrola reakcije	44
4.17. Termini i statistička analiza	45
4.18. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti	46
4.18.1. Disk difuziona metoda	46
4.18.2. E test	47
4.19. Gel elektroforeza pulsirajućem polju (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)	48

5. REZULTATI	51
5.1. Real-time PCR detekcija <i>invA</i> (Protokol A) i <i>ttr</i> gena <i>Salmonella</i> spp. (Protokol M) u hrani i uzorcima iz okruženja	51
5.1.1. Ispitivanje veštački kontaminiranih uzoraka	53
5.1.2. Ispitivanje potencijalno prirodno kontaminiranih uzoraka	55
5.1.3. Real-time PCR protokol za detekciju <i>invA</i> gena (protokol A) - pojedinačni rezultati prema grupi uzoraka nakon "Chelex" ekstrakcije DNK	57
5.1.4. Real-time PCR protokol za detekciju <i>ttr</i> gena (protokol M) - pojedinačni rezultati prema grupi uzoraka nakon "Chelex" ekstrakcije DNK	59
5.1.5. Real-time PCR protokol za detekciju <i>invA</i> gena (protokol A) - pojedinačni rezultati prema grupi uzoraka nakon "PBS" ekstrakcije DNK	61
5.1.6. Real-time PCR protokol za detekciju <i>ttr</i> gena (protokol M) - pojedinačni rezultati prema grupi uzoraka nakon "PBS" ekstrakcije DNK	63
5.2. Real-time PCR detekcija <i>invA</i> (Protokol A) i <i>ttr</i> gena <i>Salmonella</i> spp. (Protokol M) u hrani za životinje	65
5.2.1. Ispitivanje veštački kontaminiranih uzoraka hrane za životinje	65
5.2.2. Ispitivanje prirodno kontaminiranih uzoraka i uzoraka nastalih mešanjem prirodno kontaminiranih sa nekonatminiranim uzorcima hrane za životinje ..	66
5.3. Razvoj, optimizacija i „in house” validacija nove real-time PCR metode (protokol MD) za detekciju <i>invA</i> gena <i>Salmonella</i> spp	68
5.3.1. Određivanje granice detekcije (LOD) i efikasnosti amplifikacije PCR protokola	68
5.3.2. Ispitivanje robustnosti (Robustness) real-time PCR metode (protokol MD)	68
5.3.3. Teoretsko ispitivanje specifičnosti ("in-silico" testiranje) real-time PCR metode (protokol MD)	69
5.3.4. Analitička specifičnosti real-time PCR metode (protokol MD)	69
5.3.5. Ispitivanje veštački kontaminiranih uzoraka	72
5.3.6. Ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pilećeg mesa - poređenje protokola A, M i MD	73
5.3.7. Učešće u ispitivanjima osposobljenosti („Proficiency Testing Scheme“) ..	75
5.4. Real-time PCR protokol za detekciju <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Typhimurium</i>	76
5.5. Karakterizacija <i>Salmonella</i> Enteritidis i <i>S. Typhimurium</i> izolovanih iz lanca hrane	82
5.5.1. Tipizacija primenom real-time PCR protokola za detekciju <i>safA</i> gena <i>S. Enteritidis</i> i <i>fliA-IS200</i> gena <i>S. Typhimurium</i>	82

5.5.2.	Genotipizacija <i>Salmonella</i> Enteritidis i <i>S. Typhimurium</i> izolovanih iz lanca hrane (Gel elektroforeza pulsirajućem polju - Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)	83
5.5.2.1.	Genotipizacija <i>Salmonella</i> Enteritidis izolovanih iz lanca hrane (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)	84
5.5.2.2.	Genotipizacija <i>Salmonella</i> Typhimurium izolovanih iz lanca hrane (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)	89
5.5.3.	Rezultati ispitivanja osetljivosti <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Typhimurium</i> na antimikrobne lekove disk-difuzionom metodom	94
5.5.3.1.	Rezultati ispitivanja osetljivosti <i>S. Enteritidis</i> na antimikrobne lekove disk-difuzionom metodom	94
5.5.3.2.	Rezultati ispitivanja osetljivosti <i>S. Typhimurium</i> na antimikrobne lekove disk-difuzionom metodom	96
5.5.3.3.	Zbirni prikaz rezultata ispitivanja osetljivosti <i>S. Typhimurium</i> disk difuzionom metodom	100
5.5.3.4.	Zbirni prikaz rezultata ispitivanja osetljivosti <i>S. Enteritidis</i> disk difuzionom metodom	101
5.5.4.	Rezultati ispitivanja osetljivosti <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Typhimurium</i> na antimikrobne lekove E testom	103
5.5.4.1.	Rezultati ispitivanja osetljivosti <i>S. Enteritidis</i> na antimikrobne lekove E testom	103
5.5.4.2.	Rezultati ispitivanja osetljivosti <i>S. Typhimurium</i> na antimikrobne lekove E testom	104
6.	DISKUSIJA	106
6.1.	Real-time PCR detekcija <i>Salmonella</i> spp. u hrani i hrani za životinje	107
6.2.	Razvoj nove metode za detekciju <i>Salmonella</i> spp. u hrani	117
6.3.	Real-time PCR detekcija <i>Salmonella</i> Enteritidis i <i>S. Typhimurium</i> u hrani	122
6.4.	Karakterizacija <i>Salmonella</i> Enteritidis i <i>S. Typhimurium</i> izolovanih iz lanca hrane	124
6.4.1.	Tipizacija primenom real-time PCR protokola za detekciju <i>safA</i> gena <i>S. Enteritidis</i> i <i>fliA-IS200</i> gena <i>S. Typhimurium</i>	126
6.4.2.	Genotipizacija <i>Salmonella</i> Enteritidis i <i>S. Typhimurium</i> primenom PFGE metode	127
6.4.3.	Ispitivanje osetljivosti <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Typhimurium</i> na antimikrobne lekove	129
7.	ZAKLJUČCI	132
8.	LITERATURA	134

1. UVOD

Salmonella spp. predstavljaju jedne od vodećih patogena prenosivih hranom. Procenjuje se da su *Salmonella* spp. odgovorne za oko 93,8 miliona slučajeva oboljenja ljudi godišnje, od čega se 80,3 miliona slučajeva dovode u vezu sa hranom (Majowicz i sar., 2010). Na osnovu izveštaja Evropske agencije za bezbednost hrane (European Food Safety Authority - EFSA), u zemljama Evropske unije tokom 2016. godine zabeleženo je ukupno 94.530 potvrđenih slučajeva salmoneloze sa incidencijom od 20,4 na 100.000 populacije (EFSA, 2017). Prema izveštaju o zaraznim bolestima koji je objavio Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanovic Batut“, u Republici Srbiji tokom 2016. godine zabeleženo je 1589 slučajeva oboljevanja od salmoneloze, sa incidencijom od 22,4 na 100.000 populacije (IZJZS, 2017). Stvarni broj je verovatno značajno veći usled pogrešno postavljene dijagnoze, odnosno nepostavljanja etiološke dijagnoze svih slučajeva gastrointestinalnih poremećaja.

Standardna metoda za detekciju *Salmonella* spp. u hrani uključuje neselektivno pred-obogaćenje, praćeno selektivnim obogaćenjem i selektivnom izolacijom na čvrstim podlogama, nakon čega sledi biohemijsko i serološko potvrđivanje suspektnih kolonija (ISO, 2017). Čitava procedura zahteva 4 - 5 dana za detekciju i potvrđivanje *Salmonella* spp., što u nekim slučajevima prevazilazi rok upotrebe ispitivanog proizvoda. Savremena industrija hrane, ali i javno zdravstvo zahtevaju razvoj novih, brzih metoda za detekciju patogenih mikroorganizama prenosivih hranom. Real-time PCR metod ispunjava taj uslov, a uz to obezbeđuje visok nivo osetljivosti i specifičnosti, odličnu efikasnost i smanjen rizik od unakrsne kontaminacije (Rodriguez-Lazaro i sar., 2014). Veliki broj alternativnih metoda, uključujući i real-time PCR protokole, razvijen je i validovan u cilju detekcije *Salmonella* spp. u hrani (Lee i sar., 2015). Validacijom i standardizacijom real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* spp. u hrani, ispunjavaju se zahtevi zakonske regulative neophodni da se alternativna metoda koristi kao ekvivalentna zamena standardnoj (SG, 2010). Pored detekcije *Salmonella* spp., real-time PCR metoda daje i mogućnost tipizacije izolovanih *Salmonella* spp., ali i njihovu detekciju direktno u uzorku (Maurischat i sar., 2015, Prendergast i sar., 2013, Bugarel i sar., 2017). Bez obzira da li se real-time PCR metoda primenjuje u cilju detekcije ili tipizacije patogenih mikroorganizama prenosivih hranom, neophodno je da bude validovana u skladu sa

nekim od međunarodno priznatih protokola (AFNOR, 2016, NordVal, 2017; ISO, 2016). Implementacija ove metode u rutinskim ispitivanjima, unaprediće sistem bezbednosti u celokupnom lancu proizvodnje hrane i hrane za životinje, obezbeđujući rezultate podudarne sa standardnom metodom, ali znatno brže. Optimizacija i "in house" validacija protokola za detekciju genoma *Salmonella* spp., sprovedena tokom izrade ove doktorske disertacije, pruža jasniji uvid u performanse ispitanih metoda i daje dovoljno podataka za njihovu eventualnu implementaciju u rutinskim ispitivanjima. Dodatno, ova teza daje i potpuno nov protokol za detekciju *Salmonella* spp. primenom real-time PCR metode.

Na osnovu izveštaja Evropske agencije za bezbednost hrane u zemljama Evropske unije tokom 2015. godine zabeleženo je ukupno 94.625 potvrđenih slučajeva salmoneloze ljudi, pri čemu je u 31.829 (45,7%) slučajeva kao uzročnik potvrđena *Salmonella* Enteritidis, u 10.997 (15,8%) slučajeva *S. Typhimurium* i u 5.770 (8,3%) slučajeva monofazna *S. Typhimurium* (EFSA, 2016). Tri najčešća *Salmonella* serotipa u 2016., sa procentualnim učešćem 70.3 % od ukupno potvrđenih slučajeva salmoneloze ljudi, bila su takođe *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i monofazna *S. Typhimurium* (1,4, [5],12:i:-). Shodno prikazanim podacima, rezultati ove doktorske disertacije o prisutnim genotipovima, rezistenciji na antimikrobne lekove, kao i detekciji *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* primenom real-time PCR metode, biće dragoceni, posebno zbog toga što se radi o epidemiolški važnim serotipovima koji su najčešći uzročnici oboljevanja ljudi. Karakterizacija pomenutih sojeva doprineće proceni značaja njihovog nalaza u hrani za javno zdravlje. Validacija real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* u pilećem mesu naći će svoju primenu nakon njihovog uvođenja u propise Republike Srbije, a koji su u primeni u zemljama Evropske Unije od 2011. godine (OJEU, 2011).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Istorijat, taksonomija i nomenklatura *Salmonella* spp.

Salmonella spp. pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* i prema današnjoj nomenklaturi obuhvataju preko 2600 različitih serovarijeteta (Issenhuth-Jeanjean i sar., 2014). *Salmonella* spp. su važan uzročnik oboljenja, kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini. Salmoneloze su zoonoze (Hendriksen i sar., 2004; Hoelzer i sar., 2011), ali je infekcija ljudi najčešće povezana sa konzumiranjem kontaminirane hrane (Thorns, 2000; Majowicz i sar., 2010). Većina serovarijeteta *Salmonella* spp. smatraju se patogenima za čoveka, ali razlike u virulenciji postoje u odnosu na serovarijetet i soj, a posledično se javljaju i razlike u karakteristikama i ozbiljnosti oboljenja do kojeg dovode (Sonja Radojičić, 2011; Adams i Moss, 2008).

Današnja nomenklatura obuhvata dve vrste u okviru roda *Salmonella*: *Salmonella enterica* i *S. bongori*. *Salmonella enterica* vrsta podeljena je u 6 podvrsta: *S. enterica* subsp. *enterica* (subspecies I), *S. enterica* subsp. *salamae* (subspecies II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (subspecies IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (subspecies IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (subspecies IV) and *S. enterica* subsp. *indica* (subspecies VI). Od prve publikacije Kauffmann-White šeme (Subcommittee, 1934), nomenklatura *Salmonella* pretrpela je veliki broj izmena (Su and Chiu, 2007, Evangelopoulou et al., 2010, Brenner et al., 2000, Tindall et al., 2005). Trenutno, White-Kauffmann-Le Minor šema (Grimont and Weill, 2007), uključujući dodatak 47 (Guibourdenche et al., 2010) i dodatak 48 (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014) koji obuhvataju novootkrivene serotipove u periodu od 2003-2010. godine, definiše 2659 serotipova u okviru roda *Salmonella* (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Broj serovarijeteta u okviru vrsta i podvrsta *Salmonella*
(Issenhuth-Jeanjean et al., 2014)

Vrsta / podvrsta	Broj serovarijeteta
<i>S. enterica</i>	2637
subsp. <i>enterica</i>	1586
subsp. <i>salamae</i>	522
subsp. <i>arizonae</i>	102
subsp. <i>diarizonae</i>	338
subsp. <i>houtenae</i>	76
subsp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22

Serotipizacija *Salmonella* spp. zasniva se na ispitivanju „O“ antigena (somatski antigen), „H“ antigena (flagelarni antigen) i „Vi“ antigena (kapsularni). Ova ispitivanja izvode se testom brze aglutinacije na mikroskopskoj pločici. U prvoj fazi serološke tipizacije se ispituje „O“ antigen i utvrđuje serološka grupa *Salmonella*. Zatim se u dve faze ispituje prisustvo „H“ antigena i određuje serotip (Grimont and Weill, 2007; ISO, 2014).

2.2. Morfološke, biohemijske i kulturelne osobine

Bakterije roda *Salmonella* su asporogeni, fakultativno anaerobni, Gram negativni štapići, dužine 2-5 µm i širine 0,7-1,5 µm (Ozkalp B., 2012). Sa izuzetkom *S. Gallinarum* biovar *gallinarum* / *pullorum*, ostale salmonele su pokretne zahvaljujući peritrihno raspoređenim flagelama. Optimalna temperatura za rast je 37 °C, iako je rast zabeležen u opsegu od 5-47 °C (Adams i Moss, 2008). Razlažu glukozu i druge ugljene hidrate uz stvaranje kiseline i gasa. Salmonele su oksidaza negativne i katalaza pozitivne, koriste citrat kao jedini izvor ugljenika, stvaraju hidrogen sulfid, vrše dekarboksilaciju lizina i ornitina i ne hidrolizuju ureu. Tipične kulture *Salmonella* na kosom TSI agaru (trostruki šećer/ gvožđe agar) pokazuju alkalnu (crvenu) kosu površinu i kiselo (žuto) dno sa stvaranjem gasa (mehurića) i (u oko 90% slučajeva) stvaranjem vodonik-sulfida (pocrnjenje agara) (ISO, 2017).

Pripadnici roda *Salmonella* se dobro razmnožavaju na običnim hranljivim podlogama, ali se za njihovu izolaciju iz hrane koriste selektivne i diferencijalne podloge (Gulsen Altug, 2012; Martin Busse, 1995). Standardna metoda za detekciju salmonela u hrani, podrazumeva upotrebu dve selektivne čvrste podloge za izolaciju, XLD agar i njemu komplementarnu selektivnu podlogu. Tipične kolonije *Salmonella* na XLD agaru imaju crno središte i svetlu prozirnu zonu crvenkaste boje. Varijante *Salmonella* H₂S negativne (na primer *S. Paratyphi A*) na XLD agaru imaju ružičastu boju sa tamnije ružičastim središtem, dok *Salmonella* pozitivne na laktozu na XLD agaru imaju žutu boju sa crnim središtem ili bez njega (ISO, 2017).

2.3. Rast i preživljavanje

Salmonella spp. mogu da rastu u pH rasponu od 4-9, a optimalna pH vrednost za rast iznosi 6,5-7,5. Zahtevaju visoku aktivnost (a_w) vode za svoj rast, između 0,94 i 0,99, ali mogu preživeti na $a_w < 0,2$. Za većinu serotipova može se reći da se inhibicija rasta dešava na $t < 7^\circ\text{C}$, $\text{pH} < 3,8$ ili $a_w < 0,94$ (Pui, 2001). Skladištenje hrane na temperaturi ispod 7°C sprečava umnožavanje svih serotipova sa izuzetkom *Salmonella* Heidelberg, koja ima sposobnost rasta na temperaturi do $5,3^\circ\text{C}$ (Giaccone i sar., 2012). Salmonele su termolabilne bakterije i lako se uništavaju na temperaturi pasterizacije. *S. Senftenberg* 775W (ATCC 43845) je serotip najotporniji na termalnu inaktivaciju (u mleku ima $D_{72} = 0,09$ min, u poređenju sa *S. Typhimurium* za koju je $D_{72} = 0,003$ min) (Adams i Moss, 2008; Silva i Gibbs, 2012). Otpornost prema povišenoj temperaturi zavisi od više faktora, kao što su: aktivnost vode, sastav hrane, pH vrednost i starost bakterijskih ćelija. U uslovima snižene aktivnosti vode salmonele su otpornije na termalnu inaktivaciju (prisustvo vode favorizuje termalno raskidanje peptidnih veza). Sastav hrane, posebno sadržaj masti, kao i glicerola i saharoze mogu povećati otpornost na termalnu inaktivaciju. Osetljivost na povišenu temperaturu povećava se i udaljavanjem od neutralne pH vrednosti (povećavanjem ili smanjivanjem pH) (Giaccone i sar., 2012).

2.4. Infektivna doza

Infektivna doza pri kojoj salmonele dovode do razvoja infekcije zavisi od nekoliko faktora kao što su imunološki status i uzrast domaćina, hrane kao nosioca i osobina samog soja bakterija. Generalno, smatra se da je za izazivanje oboljenja ljudi neophodno da broj salmonela dostigne 10^4 cfu/g namirnice (Giaccone i sar., 2012). Međutim, podaci iz epidemija pokazuju da veoma mali broj bakterija posle ingestije zajedno sa hranom može dovesti do razvoja bolesti (Tabela 2.2). Infektivna doza je niža ukoliko se salmonele nalaze u namirnicama sa visokim sadržajem masti (čokolada, sir) i proteina, koji štite bakterijsku ćeliju od uticaja niskog pH želudačnog soka. Kod dece su niže doze, kao i kod starijih osoba i osoba koje su pod terapijom antacidima (Blaser i Newman, 1982).

Tabela 2.2. Neki od primera hrane povezane sa niskom infektivnom dozom u epidemijama salmoneloze (Barrow i Methner, 2013)

Vrsta hrane	<i>Salmonella</i> serotip	Infektivna doza (br. bakterija / osobi)
Čokolada	<i>S. Eastbourne</i> , <i>S. Napoli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	10-100
Čedar sir	<i>S. Heidelberg</i> , <i>S. Typhimurium</i>	1-100
Kukuruzne grickalice	<i>S. Argona</i>	2-45
Hamburger	<i>S. Newport</i>	10-100
Čips	<i>S. Saintpaul</i> , <i>S. Rubislaw</i> , <i>S. Javiana</i>	4-45

2.5. Adaptiranost na domaćina

Stepen prilagođenosti domaćinu razlikuje se između serotipova *Salmonella* i određuje njihovu patogenost, odnosno kliničke manifestacije. Po tom osnovu serotipovi *Salmonella* spp. mogu se podeliti u tri grupe (Stevens i sar., 2009): **1. serotipovi koji nisu adaptirani na specifičnog domaćina** - ovoj grupi pripadaju serotipovi kao što su *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, koji generalno dovode do većine gastrointestinalnih infekcija ljudi. Oni predstavljaju patogene i za životinje, a ishod infekcije kreće se u

širokom opsegu, od teških sistemskih bolesti do asimptomatskih stanja (Hoelzer i sar., 2011); **2. serotipovi visoko prilagođeni domaćinu** - izazivaju sistemske infekcije ograničenog broja srodnih vrsta. Tako na primer, serotipovi prilagođeni čoveku, kao što su *Salmonella* Typhi i *S. Paratyphi* A, B, C, izazivaju tifoidnu i paratifoidnu groznicu ljudi. Slično, *S. Gallinarum* je specifično adaptirana na živinu (Velge i sar., 2012); **3. serotipovi prilagođeni specifičnom domaćinu, ali ponekad mogu inficirati i druge vrste** - na primer, *S. Choleraesuis*, za koju su svinje primarni domaćin, izaziva i tešku sistemsku infekciju ljudi. Isto tako, *Salmonella* Dublin je visoko patogena za ljude, iako je prilagođena govedima kod kojih izaziva sistemske infekcije i može dovesti i do abortusa (Luciana i sar., 2012; Hoelzer i sar., 2011). Međutim, podelu serotipova prema adaptiranosti na domaćina bi ipak trebalo shvatiti uslovno, jer u okviru istog serotipa mogu postojati subtipovi koji se razlikuju u pogledu prilagođenosti domaćinu. Na primer postoje sojevi *S. Typhimurium* koji se mogu smatrati prilagođenim domaćinu, kao što je slučaj sa *S. Typhimurium* DT 2 i DT 99 sojevima koji dovode do specifičnog oboljenja golubova (*avian paratyphoid disease*) (Rabsch i sar., 2002).

2.6. Epidemiologija *Salmonella*

Širom sveta *Salmonella* spp. predstavljaju jedan od najvažnijih patogenih mikroorganizama sa aspekta javnog zdravlja, a uz to dovode i do velikih ekonomskih opterećenja, u zemljama u razvoju, ali i u razvijenim zemljama (Crump i sar., 2004; Majowicz i sar., 2010). Salmonela mogu biti prisutne u okruženju, ali uobičajeno stanište za njih je gastrointestinalni sistem divljih i domaćih životinja (Winfield i Groisman, 2003). Životinje se mogu inficirati kroz kontaminaciju iz okruženja, od strane drugih životinja ili kroz kontaminiranu hranu. Pored živine, svinja, goveda, ovaca i koza (Wong i sar., 2002; Antunes i sar., 2016; Wiedemann i sar., 2014) i druge životinje, uključujući ostale ptice, školjke, gmizavce i vodozemce, mogu se inficirati i biti nosioci salmonela (Tizard, 2004; Damborg i sar., 2016; Back i sar., 2016; Heinitz i sar., 2000).

Takođe, rezervoari salmonela mogu biti i ljudi. Salmoneloze su zoonoze i mogu se prenositi sa životinja na ljude, ali i obratno (Hendriksen i sar., 2004; Hoelzer i sar., 2011). Glavni put infekcije ljudi je kroz kontaminiranu hranu, a primarni izvor je hrana životinjskog porekla, posebno živina i proizvodi od nje (Thorns, 2000). Takođe, izvor

infekcije mogu biti ljudi, životinje, voda i okruženje kontaminirano salmonelama (Bertrand i sar., 2008). Izvor *Salmonella* spp. za ljude često mogu biti i kućni ljubimci, posebno gmizavci i vodozemci, sa kojih se infekcija prenosi direktnim ili indirektnim kontaktom (Bertrand i sar., 2008; Damborg i sar., 2016).

Inficirane životinje izlučuju salmonele fecesom i tako kontaminiraju zemlju, vodu, druge životinje i ljude. Sled događaja koji dovodi do infekcije ljudi preko hrane, najčešće uključuje životinju koja je nosilac salmonela, ali ne ispoljava kliničke simptome (eng. *healthy carrier*), sa koje se prenošenje patogenog mikroorganizma na čoveka vrši tokom proizvodnje, rukovanja ili konzumiranja hrane. U lancu proizvodnje hrane, kontaminacija salmonelama može se desiti u bilo kojoj tački: na njivi, na farmi, tokom proizvodnje, prerade i rukovanja hranom i hranom za životinje (Wong i sar., 2002).

Salmonella spp. se često dovode u vezu sa **živinom**. Proizvodi od živine predstavljaju najznačajniji izvor salmoneloze, pri čemu su nedovoljno termički tretirani proizvodi i unakrsna kontaminacija označeni kao glavni rizik (Cox i sar, 2011; Rasschaert i sar., 2008). Prevalencija salmoneloze kod živine zavisi pre svega od sistema proizvodnje i primenjenih kontrolnih mera (Rašeta i sar., 2014; Pajić i sar., 2015).

Jata živine inficirana na farmi, asimptomatski nose *Salmonella* spp. u gastrointestinalnom sistemu, koje predstavljaju izvor kontaminacije trupova prilikom klanja. Tokom proizvodnje mesa živine kontaminacija salmonelama moguća je u različitim fazama, posebno prilikom čerupanja i evisceracije (Cox i sar, 2011; Rasschaert i sar., 2008).

Svinje takođe predstavljaju značajan izvor *Salmonella* spp. (Botteldoorn i sar., 2003; Karabasil i sar., 2008; Kureljusic i sar., 2017). Kolonizacija svinja salmonelama odigrava se na farmi, a izvor mogu biti kontaminirana voda i hrana, vektori i drugi izvori iz okruženja (Wong i sar., 2002). Svinje se mogu inficirati tokom transporta, takođe i u stočnom depou, koji se smatra glavnim izvorom kontaminacije *Salmonella* spp. pre klanja (Karabasil i sar., 2012 b). Nakon kolonizacije gastrointestinalnog sistema svinja, trupovi mogu biti kontaminirani prilikom klanja i obrade, a posledično kontaminirano meso može imati ulogu izvora salmoneloze (Karabasil i sar., 2012 b).

Goveda mogu biti asimptomatski inficirana *Salmonella* spp., i posledično može doći do kontaminacije govedeg mesa prilikom klanja ili obrade (Bacon i sar., 2002).

Voće i povrće takođe sve češće povezuju sa infekcijama *Salmonella* spp., jer je kontaminacija moguća na u različitim fazama proizvodnje, počevši od njive, prilikom transporta, pranja i pakovanja (Lynch i sar., 2009).

2.7. Incidencija salmoneloze ljudi

Prema izveštaju o zaraznim bolestima u Republici Srbiji koji je objavio Institut za Javno zdravlje „Dr Milan Jovanovic Batut“ u 2012. godini zabeleženo je 1550 slučajeva oboljevanja od salmoneloze, sa incidencijom 21,56/100.000 stanovnika. Registrovane su 63 epidemije salmoneloza u kojima je put prenosa bila hrana, sa ukupno 483 obolele osobe (IZJZS, 2013). U 2013. godini zabeležen je 1571 slučaj oboljevanja od salmoneloza, sa incidencijom 21,82/100.000 populacije. Prijavljene su 74 epidemije salmoneloza u kojima je put prenosa bila hrana, sa ukupno 474 obolele osobe (IZJZS, 2014). Godine 2014. zabeleženo je 1512 slučajeva oboljevanja od salmoneloza, sa incidencijom 21,1/100.000 populacije. Prijavljeno je 46 epidemija salmoneloza u kojima je put prenosa bila hrana, sa ukupno 409 obolelih osoba (IZJZS, 2015). U 2015. godini na teritoriji Republike Srbije zabeležen je najveći broj slučajeva salmoneloze u posmatranom periodu od 2012 do 2016. godine, ukupno 1712 slučajeva. Incidencija je iznosila 24,01/100.000 populacije. Prijavljeno je 45 epidemija salmoneloza u kojima je put prenosa bila hrana, sa ukupno 374 obolele osobe i 9 smrtnih ishoda (IZJZS, 2016). U 2016. godini na teritoriji Republike Srbije zabeleženo je 1589 slučajeva oboljevanja od salmoneloze, sa incidencijom 22,4/100.000 populacije. Najviša specifična stopa incidencije registrovana je u uzrasnoj grupi 0–4 godine (165,97/100.000), a najniža u uzrasnoj grupi 30-39 i 50-59 godina (7,77/100.000, odnosno 8,45/100.000). Prijavljene su 73 epidemije sa alimentarnim putem širenja infektivnog agensa, sa 636 obolelih osoba. Učešće alimentarnih epidemija u ukupnom broju prijavljenih epidemija iznosilo je 27,86% i niže je u poređenju sa 2015. godinom (36,8%). U okviru alimentarnih epidemija, najčešće su registrovane epidemije salmoneloze, ukupno 35 epidemija (47,95%) sa 194 obolele osobe (Tabela 2.3.). Tokom alimentarnih epidemija, najčešći uzročnik salmoneloze ljudi u Republici Srbiji, u periodu od 2014 do 2016., bila je *Salmonella* Enteritidis sa procentualnim učešćem - 76% (2014. god.), 80% (2015. god.) i 100% (2016. god.) (IZJZS, 2015; IZJZS, 2016; IZJZS, 2017).

Tabela 2.3. Alimentarne epidemije - salmoneloza ljudi u Republici Srbiji od 2012. do 2016. godine

	2016.	2015.	2014.	2013.	2012.
Broj potvrđenih slučajeva	194	374	409	474	483
Broj epidemija povezanih sa hranom	35	45	46	74	63

Na osnovu izveštaja Evropske agencije za bezbednost hrane (European Food Safety Authority - EFSA), u 2016. godini dve najfrekventnije zoonoze kod ljudi u Evropskoj uniji (EU) su bile kampilobakterioza i salmoneloza. EFSA je, u izveštaju objavljenom 2017. godine o stanju i trendovima zoonoza, zoonotskih agenasa i agenasa prenosivih hranom u zemljama članicama EU, navela da je tokom 2016. godine zabeleženo 94530 potvrđenih slučajeva salmoneloze kod ljudi. Broj obolelih ljudi, incidencija i broj epidemija povezanih sa hranom u zemljama Evropske Unije, u periodu od 2012. do 2016. godine prikazan je u tabeli 2.4. (EFSA, 2017).

Tabela 2.4. Salmoneloza ljudi u zemljama Evropske Unije u periodu od 2012. do 2016. godine

Salmoneloza ljudi	2016.	2015.	2014.	2013.	2012.
Broj potvrđenih slučajeva	94530	94597	92012	87753	94278
Broj potvrđenih slučajeva na 100,000 stanovnika	20,4	20,9	20,7	20,3	21,9
Broj epidemija povezanih sa hranom	1067	953	1049	1168	1533

Na osnovu izveštaja Evropske agencije za bezbednost hrane u zemljama Evropske unije tokom 2016. godine od ukupno 94530 potvrđenih slučajeva salmoneloze ljudi, u 32685 (48,5%) slučajeva kao uzročnik potvrđena *Salmonella* Enteritidis, u 9012 (13,4%)

slučajeva *S. Typhimurium* i u 5666 (8,4%) slučajeva monofazna *S. Typhimurium*. Tri najčešća *Salmonella* serotipa u 2015., sa procentualnim učešćem 69,7% od ukupno potvrđenih slučajeva salmoneloze ljudi, bila su takođe *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i monofazna *S. Typhimurium* (1,4, [5],12:i:-), a u 2014 procentualno učešće iznosilo je 69,6% (EFSA, 2017).

2.8. Patogeneza

Salmonella spp. mogu inficirati i hladnokrvne i toplokrvne domaćine i ova široka paleta potencijalnih domaćina odražava sposobnost ovog patogenog mikroorganizma da se prilagodi različitim okruženjima (Sanchez -Vargas i sar., 2011). *Salmonela* pokazuje izuzetnu karakteristiku prilikom invazije nefagocitnih ćelija domaćina, prilikom čega indukuju sopstvenu fagocitozu u cilju ulaska u ćeliju domaćina (Hansen-Vester i sar., 2002; Sanchez -Vargas i sar., 2011;). Posle ulaska *Salmonella* u ćeliju domaćina, one se nalaze u odeljku koji se naziva vakuola, a ona se sastoji od membrane ćelija domaćina. U normalnim okolnostima, prisustvo bakterijskog stranog tela aktiviralo bi imuni odgovor ćelija domaćina, što bi dovelo do spajanja vakuole sa lizozimima i sekrecije digestivnih enzima koji bi razorili bakterije u ćelija (Shu-Kee i sar., 2015). Međutim, *Salmonella* koristi efektorne proteine koji dovode do promena u vakuoli što rezultira blokiranjem spajanja sa lizozomima i omogućava intracelularno preživljavanje i umnožavanje *Salmonella* u ćelijama domaćina. Sposobnost bakterija da preživi unutar makrofaga omogućava im prenos u retikuloendotelijalnom sistemu (RES) (Monack i sar., 2004; Sanchez -Vargas i sar., 2011; Shu-Kee i sar., 2015).

2.9. Klinička slika

Na osnovu kliničkih manifestacija salmoneloze ljudi, salmonele se mogu podeliti u dve grupe, tifoidne i netifoidne. Salmoneloza ljudi obuhvata četiri kliničke manifestacije: enteričnu groznicu, gastroenteritis, bakterijemiju i druge ekstraintestinalne komplikacije i hronično kliconoštvo (Shu-Kee i sar., 2015; Darby i sar., 2008). Uzročnik tifoidne groznice je *Salmonella Typhi*, dok paratifoidnu groznicu izaziva *S. Paratyphi A, B and C*. (Connor i Schwartz 2005; Shu-Kee i sar., 2015). Ostale *Salmonella* izuzimajući *S.*

Typhi i *S. Paratyphi*, za koje su rezervoari najčešće životinje, obično dovode do razvoja gastroenteritisa, praćenog simptomima kao što su dijareja bez krvi, mučnina, povraćanje, glavobolja, abdominalni grčevi i mijalgija (Sanchez -Vargas i sar., 2011).

2.10. Rezistencija *Salmonella* prema antimikrobnim lekovima

Infekcija ljudi salmonelama najčešće rezultira blagim gastrointestinalnim poremećajem i obično ne zahteva antimikrobnu terapiju, već se primenjuje simptomatska terapija koja podrazumeva pre svega nadoknadu tečnosti i elektrolita (Darby i sar., 2008). Međutim, kod nekih pacijenata, kao što su deca ili stare osobe, imunokompromitovane osobe ili osobe sa sistemskim infekcijama, mogući su ozbiljniji slučajevi bolesti koji zahtevaju adekvatnu antimikrobnu terapiju (Angulo i sar., 2000; Hohmann, 2001). Godinama, ampicilin, trimetoprim-sulfametoksazol i hloramfenikol bili su lekovi izbora za teške infekcije salmonelama. Porast rezistencije prema ovim antimikrobnim lekovima značajno je redukovao njihovu efikasnost. Posledično, fluorohinoloni i cefalosporini proširenog spektra su postali antimikrobni lekovi izbora u terapiji invazivnih infekcija salmonelama (Winokur, 2000).

Uopšteno, mehanizmi rezistencije koje koriste druge bakterije prema antimikrobnim agensima takođe se primenjuju i na salmonele, uključujući proizvodnju enzima koji inaktiviraju antimikrobne lekove, smanjenje propustljivosti bakterijske ćelijske membrane, aktiviranje efluks pumpe i modifikacije ciljnog regiona za antimikrobni lek (Sefton, 2002). Geni odgovorni za rezistenciju salmonela prema antimikrobnim lekovima prenose se na različite načine, uključujući konjugaciju, transformaciju i transdukciju (Foley i Lynne, 2008). Prenosjenje gena rezistencije prelazi barijeru vrste, tako da se može ostvariti između *Salmonella* (Ferguson i sar., 2002), ali je transfer gena moguć i između *Salmonella* spp. i drugih bakterijskih vrsta (Walsh i sar., 2008).

Jasno je da problem antimikrobne rezistencije neće biti lako rešen, stoga su mnoge zemlje širom sveta ujedinjene u njegovom rešavanju kroz nacionalne, regionalne i globalne programe nadzora smanjene osetljivosti prema antimikrobnim lekovima (WHO, 2015).

2.11. Metode za detekciju i određivanje broja *Salmonella* spp.

2.11.1. Detekcija i izolacija *Salmonella* spp. u hrani, hrani za životinje i uzorcima iz okruženja u zoni proizvodnje hrane

Tradicionalne metode izolacije *Salmonella* spp. uključuju neselektivno predobogaćenje definisane mase ili zapremine uzorka, praćeno fazom selektivnog obogaćenja, zatim izolacijom na čvrstim selektivnim podlogama i biohemijskim i serološkim potvrđivanjem suspektnih kolonija. Različiti pristupi izolacije *Salmonella* spp. standardizovani su od strane nekoliko ustanova kao što su „International Organization for Standardization (ISO)“, „Association of Official Analytical Chemists (AOAC)“, „Food and Drug Administration (FDA)“ i „Food Safety and Inspection Service (FSIS)“ (Lee i sar., 2014). Standardna metoda za detekciju *Salmonella* u hrani, prihvaćena i od Instituta za standardizaciju Republike Srbije je „Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* - Deo 1: Otkrivanje *Salmonella* spp. (SRPS EN ISO 6579-1:2017)“. Metoda SRPS EN ISO 6579-1: 2017 obuhvata i aneks D koji se odnosi na detekciju *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovars Typhi i Paratyphi. Detekcija *Salmonella* spp. hrani i hrani za životinje (izuzimajući aneks D) obuhvata četiri uzastopne faze:

1. **Predhodno obogaćenje u neselektivnoj tečnoj podlozi** (puferisana peptonska voda - BPW).
2. **Selektivno obogaćenje** - upotrebom selektivne tečne Rappaport - Vassiliadis podloge sa sojom (RVS bujon) ili modifikovanog polučvrstog Rappaport - Vassiliadis agara (MSRV agar) i Kauffmann tetrionat - novoniocin bujona (MKTTn).
3. **Izolacija na selektivnim čvrstim podlogama** - vrši se upotrebom ksiloza lizin dezoksiholat agara (XLD agar) i druge selektivno diferencijalne podloge po izboru (komplementarna XLD agaru).
4. **Potvrđivanje primenom biohemijskih i seroloških testova** - biohemijsko potvrđivanje vrši se zasejavanjem čiste kulture na odgovarajuće podloge biohemijskog niza (TSI agar, urea agar, podloga za dekarboksilaciju lizina) ili upotrebom komercijalnih testova prema uputstvu proizvođača. Serološka potvrda

vrši se aglutinacijom na mikroskopskoj pločici upotrebom odgovarajućih antiseruma (ISO, 2017; Kirsten, 2018).

Kompletna procedura zahteva 4 do 6 radnih dana.

2.11.2. Metode za određivanje broja *Salmonella*

Godine 2012. Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) publikovala je standard za određivanje broja salmonela (ISO, 2012), a 2014. godine i standard za detekciju, određivanje broja i serotipizaciju salmonela (ISO, 2014). Oba standarda prihvaćena su od Instituta za standardizaciju Srbije 2014. godine (SRPS CEN ISO/TS 6579-2:2014 i SRPS CEN ISO/TR 6579-3:2014). Metoda SRPS CEN ISO/TS 6579-2:2014 namenjena za određivanje broja salmonela zasnovana je na „tehnicu najverovatnijeg broja (the most probable number - MPN)“ (ISO, 2012). Broj salmonela u uzorku može biti određen i klasičnom metodom za brojanje bakterija, direktnim zasejavanjem na čvrste podloge, na primer XLD (Brichta-Harhay i sar., 2008).

2.12. Detekcija *Salmonella* spp. primenom polimeraza lančane reakcije (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Jedna od najčešće korišćenih molekularnih metoda za detekciju patogenih mikroorganizama prenosivih hranom je polimeraza lančana reakcija (PCR). Za implementaciju ove tehnike Cary B. Mullis dobio Nobelovu nagradu 1993. godine (www.nobelprize.org) i od tada je postala kamen temeljac molekularne biologije (Mullis i sar., 1986). Metoda je našla široku primenu kako u kliničkoj mikrobiologiji, tako i u mikrobiologiji namirnica.

2.12.1. Klasičan PCR (Endpoint PCR)

Polimeraza lančana reakcija (PCR) predstavlja brzu, osetljivu i specifičnu metodu za otkrivanje patogenih mikroorganizama u hrani. Zapravo, PCR predstavlja *in vitro* amplifikaciju definisane DNK sekvence (imitacija procesa DNK replikacije). Reakcija koristi dva oligonukleotida (prajmera) koji su komplementarni krajevima sekvence koja se umnožava i koji su međusobno suprotno orjentisani. Specifične sekvence nukleinske kiseline amplifikuju se tokom cikličanog procesa koji se sastoji iz tri faze (ISO, 2008; Mandal i sar 2011):

- a) denaturacija dvostrukog lanca nukleinske kiseline (DNK);
- b) aniling (eng. *annealing*) prajmera na komplementarnu ciljanu sekvencu;
- c) produžavanje prajmera pomoću termostabilne DNK polimeraze.

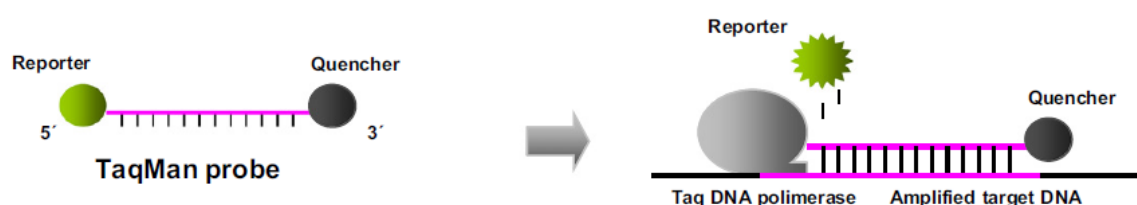
Posle denaturacije dvostrukog lanca DNK, dva oligonukleotidna prajmera aneliraju se (hibridizuju se) na ciljani DNK segment koji se amplifikuje. Prajmeri su usmereni u obrnutom pravcu jedan od drugog u odnosu na svoju orijentaciju ka ciljanjoj sekvenci. Zatim sledi proces polimerizacije, pri čemu se vrši ekstenzija prajmera komplementarnim vezivanjem baza za ciljanu sekvencu, pomoću DNK polimeraze otporne na toplotu. Ponovljeni procesi denaturacije toplotom, aneliranja prajmera i sinteze DNK rezultiraju skoro eksponencijalnom amplifikacijom DNK segmenta ograničenog prajmerima. Proizvodi PCR se otkrivaju gel-elektroforezom nakon bojenja etidijum-bromidom (Zhao i sar., 2014; ISO, 2008).

2.12.2. Real-time PCR

Real-time PCR se razlikuje od klasičnog PCR-a po tome što ne zahteva gel elektroforezu za detekciju PCR proizvoda (Higuchi i sar.,1993). Ova metoda pruža mogućnost kontinuiranog praćenja stvaranja PCR produkata tokom čitave reakcije merenjem fluorescentnog signala koji stvara specifično dvojno-obeležena proba ili interkalirajuća boja. Intezitet fluorescencije proporcionalan je količini PCR amplikona (Law i sar., 2015). Uopšteno real-time PCR metoda obuhvata sledeće faze (ISO 2015 b):

- a) amplifikacija specifične ciljne sekvence pomoću PCR u prisustvu fluorescentne probe;
- b) vezivanje fluorescentne probe tokom svakog amplifikacionog ciklusa;
- c) stvaranje fluorescentnog signala ekscitacijom tokom svakog ciklusa;
- d) praćenje fluorescentnog signala pomoću optičkog detekcionog sistema;
- e) analiza podataka.

Real-time PCR tehnologija podrazumeva upotrebu fluorescentnih molekula u cilju praćenja stvaranja produkata amplifikacije tokom svakog ciklusa PCR. Veliki broj fluorescentnih sistema je do sada razvijen, pri čemu su jedne od najčešće korišćenih, hidrolitične - *TaqMan* probe (Holland i sar., 1991; Law i sar., 2015; Navaro i sar., 2015). Proba je specifični oligonukleotid prisutan u PCR protokolu zajedno sa PCR prajmerima. *TaqMan* probe su oligonukleotidi obeleženi sa fluorescentnom “reporter” bojom na 5’ kraju i “quencher” bojom na 3’ kraju. Proba se specifično vezuje za DNK sekvencu između mesta vezivanja prajmera. Produžavanjem prajmera tokom svakog ciklusa, 5’ nukleaza aktivnost Taq polimeraze odvaja probu sa DNK lanca, dolazi do udaljavanja “reporter” i “quencher” što rezultira stvaranjem fluorescentnog signala (Slika 2.1.) (Robert i sar., 2012).



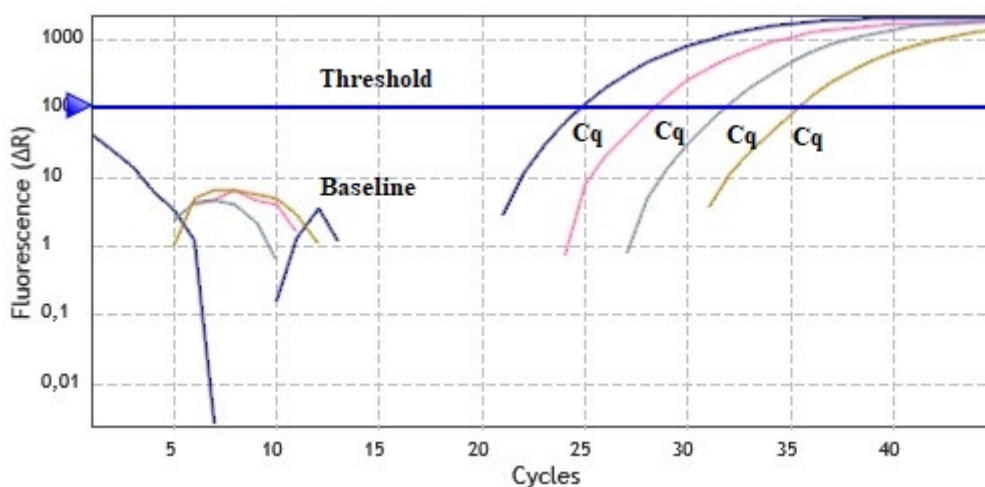
Slika 2.1. Struktura i mehanizam delovanja hidrolitične - *TaqMan* probe

(Navaro i sar., 2015)

Bazna linija (*baseline*) pri real-time PCR odnosi se na fluorescentni signal tokom inicijalnih ciklusa PCR (obično od 3. to 15.) u kojima dolazi do neznatne promene signala. Signal niskog nivoa bazne linije naziva se pozadinska fluorescencija („background“). Linija praga (*threshold*) real-time PCR reakcije je nivo signala koji označava statistički značajan porast preko izračunate bazne linije (Slika 2.2.). Uobičajeno, real-time PCR

softver automatski podešava liniju praga (desetostruka standardna devijacija vrednosti fluorescencije osnovne linije) (TFS, 2016).

Quantification cycle (C_q) je redni broj ciklusa u kojem fluorescentni signal seče liniju praga (*threshold*) i ova vrednost je obrnuto srazmerna početnoj količini ciljane sekvence (TFS, 2016). Većina real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* spp. su kvalitativni i rezultat se izražava kao pozitivan (detektovan genom) ili negativan (nije detektovan genom) (Robert i sar., 2012).



Slika 2.2. Real-time PCR: bazna linija - *baseline* i linija praga - *threshold* (Agilent AriaMx Software, Agilent Technologies, SAD)

2.13. Metode za tipizaciju *Salmonella* spp.

I pored velikog broja metoda za tipizaciju *Salmonella* spp. (Steve i sar., 2004), koje se značajno razlikuju u pogledu napora potrebnog za izvođenje, troškova, pouzdanosti i sposobnosti diskriminacije između sojeva (Hunter, 1990, Belkum i sar., 2007), trenutno ne postoji metoda koja bi bila optimalna za sve oblike istraživanja (Foxman i sar., 2005), stoga često najbolje rezultate daje kombinacija dve ili više metoda. Generalno, metode tipizacije bakterija mogu se podeliti na dve velike grupe (Foxman i sar., 2005; EFSA, 2013; Steve i sar., 2004):

2.13.1. Fenotipske metode tipizacije

Fenotipske metode tipizacije detektuju osobine ispoljene od strane mikroorganizama (na primer, serotipizacija, fagotipizacija, rezistotipizacija) (Foxman i sar., 2005):

2.13.1.1. Serotipizacija

Serotipizacija salmonela je najčešći metod koji se koristi za razlikovanje sojeva, koji su sa epidemiološkog aspekta najmanje bakterijske jedinice čiji izolati dele iste fenotipske i genotipske odlike (Steve i sar., 2004). Diskriminatorna moć serotipizacije je veoma mala u velikom broju epidemija, zato što humani netifoidni izolati uglavnom pripadaju jednom od dva serotipa, *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* (Barrow i Methner, 2013). Serotipizacija je široko prihvaćena kao metod za diferenciranje sojeva salmonela i predstavlja važnu metodu sa aspekta javnog zdravlje. Međutim, metod ima dosta ograničenja - zahteva veliki broj skupih seruma, procedura zahteva previše vremena i dobro obučene radnike, a pojedini izolati ne mogu biti tipizirani (Abatcha i sar., 2014).

2.13.1.2. Fagotipizacija

Fagotipizacija se zasniva na selektivnoj sposobnosti panela bakteriofaga da inficiraju i liziraju određene sojeve *Salmonella* spp. omogućavajući razlikovanje pojedinačnih izolata (Schmieger, 1999; Rabsch, 2007). Posebno su razvijeni sistemi fagotipizacije najčešće izolovanih serotipova, tako da mnoge zemlje izvode fagotipizaciju *S. Typhimurium* prema protokolu Anderson i sar. (1977) a fagotipizaciju *S. Enteritidis* prema protokolu Ward i sar. (1987). Fagotipizacija daje epidemiološki važne podatke, brza je, jeftina i ima visoku diskriminatornu moć (Rabsch, 2007). Međutim, osnovni nedostatak je što zahteva održavanje velikog broja aktivnih faga, pa je primena ove metode uglavnom ograničena na referentne laboratorije (Hickman-Brenner i sar., 1991).

2.13.1.3. Rezistotipizacija (određivanje osetljivosti na antimikrobne lekove)

Ispitivanjem osetljivosti na antimikrobne lekove mogu se diskriminisati sojevi salmonela ukoliko poseduju determinante rezistencije. Međutim, rezistencija može biti stečena karakteristika pod selektivnim pritiskom primene antibiotika, koja se može izgubiti nakon prestanka primene antibiotika. Pored toga, geni rezistencije mogu biti prisutni na mobilnim genetskim elementima i kao takvi mogu biti lako izmenjeni između istih ili različitih bakterijskih vrsta (Schwarz i Chaslus-Dancla, 2001). Sve ovo govori da osetljivost na antibiotike nije stabilan marker na kojem se zasniva tipizacija. Zbog toga se rezistotipizacija „sama za sebe“ ne može smatrati zadovoljavajućom primarnom metodom za diskriminaciju u okviru serovarijeteta, ali može biti veoma korisna u kombinaciji sa drugim metodama tipizacije (Threlfall i Frost, 1990).

2.13.2. Genotipske metode tipizacije

Genotipske metode tipizacije uključuju direktne analize DNK. Ove metode tipizacije tokom poslednjih dvadeset godina postepeno zamenjuju fenotipske, iako se fenotipske metode još uvek koriste u laboratorijama za rutinski nadzor i detekciju izvora epidemija. Trenutna praksa je da se koristi kombinacija različitih fenotipskih i genotipskih metoda tipizacije. Teškoće u standardizaciji i usklađivanju rezultata često stvaraju probleme pri razmeni podataka. Pojedine metode su standardizovane i usklađene do stepena koji omogućava njihovu primenu u međunarodnim okvirima (na primer, Pulsenet International) (EFSA, 2013).

Genotipske metode tipizacije salmonela mogu se podeliti na tri podgrupe (Steve i sar., 2004; EFSA, 2013):

1. **Tehnike zasnovane na digestiji primenom restrikcionihi enzima:** Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (RFLP);
2. **Tehnike zasnovane na amplifikaciji:** Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR), Arbitrary Primed PCR (AP-PCR), Repetitive Element PCR (Rep-PCR);

3. **Tehnike zasnovane na sekvencioniranju nukleotida:** Multilocus Sequence Typing (MLST), Single Locus Sequence Typing (SLST), Whole Genome Sequence (WGS) analysis.

2.14. Validacija alternativnih metoda

Propisi zemalja članica Evropske Unije ali i Republike Srbije, definišu metode koje se upotrebljavaju u mikrobiologiji hrane, ali daju i mogućnost primene alternativnih metoda. Alternativne metode moraju biti validovane u skladu sa ISO 16140 ili drugim međunarodno prihvaćenim protokolom (NordVal, 2017., AOAC, 2012, AFNOR, 2016), a njihovo potvrđivanje mora se vršiti u odnosu na standardnu metodu. Međunarodna organizacija za standardizaciju izdala je novu verziju standarda za validaciju alteranativnih metoda koja je prihvaćena i od strane Instituta za standardizaciju Srbije (ISO, 2016).

3. CILJ I ZADACI

Ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije imaju za cilj “in house” validaciju real-time PCR protokola za detekciju *invA* i *ttr* gena *Salmonella* spp. u hrani i hrani za životinje, kao i real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* u hrani, zatim molekularnu karakterizaciju *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* izolovanih iz fecesa živine, hrane, hrane za životinje i ljudi, kao i procenu značaja nalaza sojeva *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* iz lanca hrane za javno zdravlje. Očekuje se da će rezultati dobijeni tokom izrade doktorske disertacije doprineti boljem poznavanju puteva kontaminacije hrane životinjskog porekla salmonelama. Rezultati dobijeni karakterizacijom izolata *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* poreklom iz lanca hrane doprineće proceni značaja njihovog nalaza u hrani sa aspekta javnog zdravlja.

Za ostvarenje ovih ciljeva, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Uraditi “in house” validaciju real-time PCR protokola za detekciju *invA* i *ttr* gena *Salmonella* spp. u hrani i hrani za životinje;
2. Uraditi “in house” validaciju real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium u pilećem mesu i uzorcima kože vrata živine;
3. Dizajnirati prajmere i probe i optimizovati novi real-time PCR protokol za detekciju *invA* gena *Salmonella* spp.;
4. Formirati kolekciju serotipova *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium;
5. Ispitati osetljivost serotipova *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium na antimikrobne lekove i odrediti minimalne inhibitorne koncentracije;
6. Izvršiti molekularnu karakterizaciju serotipova *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Laboratorija za ispitivanje

Kompletno ispitivanje sprovedeno je u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta “Kraljevo”. Laboratorija je akreditovana u skladu sa standardom SRPS ISO/IEC 17025:2006 (Opšti zahtevi za kompetentnost laboratorija za ispitivanje i laboratorija za etaloniranje). Pored opštih standarda koji se odnose na mikrobiološka ispitivanja (Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Opšti zahtevi i uputstvo za mikrobiološka ispitivanja SRPS EN ISO 7218:2008) u rutinskim ispitivanjima implementirani su i standardi koji se odnose na rad u laboratoriji za molekularnu dijagnostiku:

1. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Polimerazna lančana reakcija (PCR) za otkrivanje patogenih mikroorganizama u hrani - Opšti zahtevi i definicije (SRPS EN ISO 22174:2008) (ISO, 2008);
2. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Polimerazna lančana reakcija (PCR) za otkrivanje patogenih mikroorganizama u hrani - Zahtevi za pripremanje uzoraka za kvalitativno otkrivanje (SRPS EN ISO 20837:2008) (ISO, 2008 a);
3. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Polimerazna lančana reakcija (PCR) za otkrivanje patogenih mikroorganizama u hrani - Zahtevi za amplifikaciju i otkrivanje za kvalitativne metode (SRPS EN ISO 20838:2008) (ISO, 2008 b);
4. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Lančana reakcija polimeraze (PCR) za detekciju i kvantifikaciju patogenih mikroorganizama u hrani - Karakteristike performansi (SRPS EN ISO 22118:2015) (ISO, 2015 a);
5. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Lančana reakcija polimeraze (PCR) u realnom vremenu za detekciju patogenih mikroorganizama u hrani - Opšti zahtevi i definicije (SRPS EN ISO 22119:2015) (ISO, 2015 b).

4.2. Real-time PCR aparati korišćeni prilikom validacionih studija

Tokom eksperimetalnog dela ispitivanja su vršena na AriaMx Real-Time PCR System i Stratagene Mx3005P PCR System (Agilent Technologies, SAD).

4.3. Upotrebljeni referentni sojevi

Tokom izvođenja eksperimentalnog dela veštačka kontaminacija uzoraka izvršena je upotrebom referentnih sojeva *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) i *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076). U delu koji se odnosio na „in house” validaciju real-time PCR protokola za detekciju *invA* i *ttr* gena *Salmonella* spp. u hrani i hrani za životinje veštačka kontaminacija izvršena je upotrebom referentne kulture *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), osim za pileće kožice sa vrata koje su kontaminirane upotrebom *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028). Tokom “in house” validacije real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* Enteritidis i *S.* Typhimurium u pilećem mesu i uzorcima kože vrata živine, za veštačku kontaminaciju upotrebljena su obe referentne kulture. Kao standard prilikom izvođenja PFGE upotrebljena je *Salmonella* Braenderup (ATCC BAA664).

Tokom provere *exclusivity* prajmera i probe upotrebljene su sledeće referentne kulture:

1. *Escherichia coli* (ATCC 25922),
2. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853),
3. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212),
4. *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953),
5. *Proteus mirabilis* (ATCC 25933),
6. *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048),
7. *Sarcina lutea* (ATCC 9341),
8. *Clostridium perfringens* (ATCC 13124),
9. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923),
10. *Escherichia coli* (NCTC 13216),
11. *Bacillus subtilis* subsp. *spizizeni* (ATCC 6633),
12. *Escherichia coli* (ATCC 8739),
13. *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932),
14. *Listeria innocua* (ATCC 33090),
15. *Rodococcus equi* (ATCC 6939),
16. *Listeria ivanovii* (ATCC 19119),
17. *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305),

18. *Citrobacter freundii* (ATCC 43864),
19. *Bacillus cereus* (ATCC 14579),
20. *Candida albicans* (ATCC 10231),
21. *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763),
22. *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404),
23. *Wallemia sebi* (ATCC 42694).

Tokom provere *exclusivity* prajmera i probe pored navedenih referentnih kultura, upotrebljen je i genom 22 laboratorijskih izolata iz kolekcije VSI Kraljevo:

1. *Staphylococcus epidermidis*,
2. *Staphylococcus intermedius*,
3. *Leptospira interrogans* serovar *pomona*,
4. *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*,
5. *Leptospira interrogans* serovar *Bataviae*,
6. *Leptospira interrogans* serovar *Bratislava*,
7. *Leptospira interrogans* serovar *Canicola*,
8. *Leptospira kirchneri* serovar *grippotyposa* type *Moskva*,
9. *Leptospira borgpeterseni* serovar *Serjoe*,
10. *Leptospira borgpeterseni* serovar *Hardjo* type *bovis*,
11. *Leptospira borgpeterseni* serovar *Perepelitsin*,
12. *Mycoplasma gallisepticum*,
13. *Mycoplasma synoviae*,
14. *Brucella suis*,
15. *Brucella abortus*,
16. *Brucella melitensis*,
17. *Coxiella burnetii*,
18. *Chlamydophila psittaci*,
19. *Chlamydophila abortus*,
20. *Citrobacter youngae* (izolat dobijen iz „proficiency testing scheme“),
21. *Staphylococcus cohnii* (izolat dobijen iz „proficiency testing scheme“),
22. *Bacillus cereus* (izolat dobijen iz „proficiency testing scheme“).

Tokom validacije novog protokola za detekciju *InvA* gena *Salmonella* spp. u hrani, *inclusivity* provera dizajniarnih prajmera i probe izvršena je upotrebom 76 serološki ili genotipski različitih izolata *Salmonella*. Pored referentnih kultura *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) i *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), ispitano je 10 izolata *Salmonella* Typhimurium i 10 izolata *Salmonella* Enteritidis koji su pripadali različitim genotipovima (izolati različitih PFGE profila). Ispitano je i 10 izolata *S. Kentucky*, od kojih je 5 izolovano od obolelih ljudi, a 5 vode poreklo od živine. Dodatno, ispitano je i 14 izolata *Salmonella* spp. čija serotipizacija nije završena u potpunosti zbog nedostatka specifičnih seruma, ali je primenom seruma kojima smo raspolagali potvrđeno da ne pripadaju serotipovima iz Tabela 4.1..

Tabela 4.1. Izolati *Salmonella* upotrebljeni tokom *inclusivity* provere prajmera i probe.

Serotip	Grupa /antigena formula	Broj ispitanih sojeva
<i>S. Enteritidis</i>	O:9 (D1)	10
<i>S. Typhimurium</i>	O:4 (B)	10
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	O:9 (D1)	1
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	O:4 (B)	1
<i>S. Kentucky</i>	O:8 (C2-C3)	10
<i>S. Montevideo</i>	O:54	1
<i>S. Choleraesuis</i>	O:7 (C1)	1
<i>S. Hadar</i>	O:8 (C2-C3)	1
<i>S. Galinarum / Pulorum</i>	O:9 (D1)	1
<i>S. Kiel</i>	O:2 (A)	1
<i>S. Nitra</i>	O:2 (A)	1
<i>S. Eastbourne</i>	O:9 (D1)	1
<i>S. Finkenwerder</i>	O:6,14 (H)	1
<i>S. Glostrup</i>	O:8 (C2-C3)	1
<i>S. Ahuza</i>	O:43 (U)	1
<i>S. Bispbjerg</i>	O:4 (B)	1
<i>S. Potsdam</i>	O:7 (C1)	1
<i>S. Wagania</i>	O:4 (B)	1
<i>S. Brandenburg</i>	O:4 (B)	1
<i>S. Bracknell</i>	O:13 (G)	1
<i>S. Senftenberg</i>	O:1,3,19 (E4)	1
<i>S. Agona</i>	O:4 (B)	1
<i>S. Braenderup</i>	O:7 (C1)	1
<i>S. Infantis</i>	O:7 (C1)	5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 50 : z ₁₀ : -	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 17 : z ₁₀ : e,n,x,z ₁₅	2
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 17 : l,v : z	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 50 : i : z	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb (6)14 : z ₁₀ : z	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 14 : l,v : z ₅₃	1
<i>Salmonella</i> spp.	-	14
Ukupno	-	76

4.4. Materijal iz „proficiency testing“

Nakon optimizacije protokola za detekciju genoma *Salmonella* real-time PCR metodom, izvršena je i provera kroz učešća u ispitivanjima osposobljenosti („Proficiency Testing Scheme“), organizovanih od međunarodno priznatih i akreditovanih ustanova za tu delatnost:

a. LGC standards (Velika Britanija)

Prilikom „ispitivanja osposobljenosti“ ispitan je jedan uzorak (25 g ovsene kaše). Podaci o ispitanom uzorku prikazani su u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. „Proficiency testing“ - utvrđivanje prisustva *Salmonella* spp. u hrani primenom real-time PCR metode

Organizator	Vrsta uzorka	Masa uzorka	Mikroorganizam	Nivo kontaminacije
LGC standards, UK	Ovsena kaša	25	<i>Salmonella</i> Bracknell	7 cfu/g

b. APHA Scientific – VETQAS (Velika Britanija)

Prilikom „ispitivanja osposobljenosti“ ispitano je pet uzoraka (Tabela 4.3.). U laboratoriju je dostavljeno 0,1 ml liofilizovanog uzorka, upakovanog u staklenu bočicu. Uzorci su sadržali različite *Salmonella* serotipove, uključujući referentne sojeve, ali i sojeve često izolovane u uzorcima poreklom od živine. Uzorci su sadržali čiste kulture *Salmonella* i/ili druge mikroorganizme.

Tabela 4.3. Proficiency testing - utvrđivanje prisustva *Salmonella* spp.

Organizator	Oznaka uzorka	Mikroorganizam	Nivo kontaminacije
	18/1383	<i>Salmonella</i> Typhimurium (+ <i>Escherichia coli</i>)	~ 50,000 cfu/ bočici
	18/1384	<i>Citrobacter youngae</i>	Nepoznato
VETQAS, UK	18/1385	<i>Salmonella</i> Typhimurium	~ 500 cfu/ bočici
	18/1386	<i>Salmonella</i> Senftenberg	< 10 cfu/ bočici
	18/1387	<i>Salmonella</i> Agona	~ 22 cfu/ bočici

4.5. Veštačka kontaminacija uzoraka

4.5.1. Veštačka kontaminacija uzoraka hrane

Za veštačku kontaminaciju uzoraka upotrebljeni su referentni sojevi, *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) i *S. Typhimurium* (ATCC 14028). Referentni sojevi zasejani su na ploče hranljivog agara (M 561, HiMedia, India) i inkubirani na 37 °C tokom 24 sata. Nakon perioda inkubacije jedna kolonija preneti je u epruvetu sa 10 ml hranljivog bujona (CM 0001, Oxoid, UK), koja je nakon vorteksovanja inkubirana na 37 °C tokom 24 sata. Nakon perioda inkubacije napravljena je serija decimalnih razređenja u peptonskom slanom rastvoru. Broj vijabilnih ćelija određen je nanošenjem 0,1 ml odgovarajućeg razređenja na selektivnu čvrstu podlogu (XLD agar, CM 0469, Oxoid) u 6 replikata. Tokom 24 sata inkubacije inokulisanih podloga, serija razređenja čuvana je na temperaturi 2-5 °C, čime je simuliran “stres faktor” kojem su salmonele izložene tokom skladištenja namirnica u “hadnom lancu”. Koristeći suspenziju poznate koncentracije bakterijskih ćelija, izvršena je veštačka kontaminacija uzoraka, a nivo kontaminacije iznosio je 1-10 i 10-100 cfu/25 g uzorka. Neinkulisani uzorci upotrebljeni su kao negativne kontrole. Istovremeno je još jednom preneto po 0.1 ml odgovarajućeg razređenja na po 4 ploče XLD agar, radi potvrde broja vijabilnih ćelija. Pre veštačke

kontaminacije, isključeno je prisustvo *Salmonella* spp. u uzorcima, testiranjem standardnom SRPS EN ISO 6579-1:2017 i real-time PCR metodom. Zatim je 25 g veštački kontaminiranog uzorka pomešano sa 225 ml puferizovane peptonske vode (BPW, Oxoid, UK), homogenizovano i inkubirano u skladu sa SRPS EN ISO 6579-1:2017.

4.5.2. Veštačka kontaminacija uzoraka hrane za životinje

Veštačka kontaminacija uzoraka hrane za životinje izvršena je upotrebom referentnog soja *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), na istovetan način kao i uzorci hrane. Dodatno, izvršena je i kontaminacija mešanjem 9 uzoraka potpune krmne smeše za živinu u kojima je predhodno detektovana *Salmonella* spp. sa uzorcima u kojima *Salmonella* spp. nije detektovana, u odnosu 50:50 (Oznaka uzoraka: 1/2, 2/2, 3/2, 4/2, 5/2, 6/2, 7/2, 8/2, 9/2) i 30:70 (Oznaka uzoraka: 1/3, 2/3, 3/3, 4/3, 5/3, 6/3, 7/3, 8/3, 9/3). Zatim je 25 g uzorka kontaminiranog mešanjem upotrebjeno pri ispitivanjima u skladu sa SRPS EN ISO 6579-1:2017 i testiranim alternativnim metodama.

4.6. Tip uzoraka i broj uzoraka

4.6.1. Hrana i uzorci iz okruženja - detekcija *Salmonella* spp.

Ukupno 616 uzoraka, podeljenih u 5 kategorija (Tabela 4.4.), ispitano je na prisustvo *Salmonella* spp. real-time PCR metodom za detekciju *invA* i *ttr* gena, uz paralelno ispitivanje standardnom metodom SRPS EN ISO 6579-1:2017. Takođe, 150 veštački kontaminiranih uzoraka ispitano je upotrebom komercijalno dostupnog real-time PCR kita (IQ check® *Salmonella* II, Bio-Rad, USA). Pozitivni uzorci (prirodno kontaminirani) su dobijeni nakon rutinskih ispitivanja u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta „Kraljevo“. Broj prirodno kontaminiranih uzoraka ne odražava realno učešće (prevalenciju) nalaza *Salmonella* spp. u hrani na području rada Veterinarskog specijalističkog instituta „Kraljevo“, s obzirom da je deo “potencijalno prirodno kontaminiranih” uzoraka dobijen nakon redovnog ispitivanja, a zatim je ponovljeno testiranje pomenutim metodama.

Tabela 4.4. Tip i broj uzoraka - hrana i uzorci iz okruženja (Detekcija *Salmonella* spp.)

Kategorija hrane	Potencijalno prirodno kontaminirani	Veštački kontaminirani
Meso i proizvodi od mesa	191	30
Meso živine	95	30
Voće i povrće	60	30
Mleko i mlečni proizvodi	60	30
Uzorci iz okruženja	60	30
Ukupno	466	150

4.6.2. Hrana za životinje - detekcija *Salmonella* spp.

Ukupno 100 uzoraka hrane za životinje, ispitano je na prisustvo *Salmonella* spp. real-time PCR metodom za detekciju *invA* i *ttr* gena, uz paralelno ispitivanje standardnom metodom SRPS EN ISO 6579-1:2017 (Tabela 4.5.).

Tabela 4.5. Tip i broj uzoraka – hrana za životinje (Detekcija *Salmonella* spp.)

Kategorija hrane za životinje	Potencijalno prirodno kontaminirani	Veštački kontaminirani
Potpuna krmna smeša za živinu	12*	30 + 18**
Potpuna krmna smeša za svinje	20	0
Sojina sačma	20	0
Ukupno	52	48

* U toku redovnog ispitivanja u 9 uzoraka je detektovana *Salmonella* spp. primenom SRPS EN ISO 6579-1:2017, a zatim je izvršeno ponovljeno ispitivanje alternativnim i standardnom metodom.

** Veštački kontaminirani mešanjem uzoraka u kojima je predhodno detektovana *Salmonella* spp. i uzoraka u kojima *Salmonella* spp. nije detektovana.

4.6.3. Hrana i uzorci iz okruženja - detekcija *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium*

Ukupno 120 veštački kontaminiranih uzoraka, podeljenih u 2 kategorije, ispitano je na prisustvo *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* real-time PCR metodom, uz paralelno ispitivanje standardnom metodom SRPS EN ISO 6579-1:2017. (Tabela 4.6.).

Tabela 4.6. Tip i broj uzoraka - hrana i uzorci iz okruženja
(Detekcija *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*)

Tip uzorka	Veštački kontaminirani	
	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Piletina	30	30
Pileće kožice sa vrata	30	30
Ukupno	60	60

4.7. Formiranje kolekcije izolata *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium*

Izrada ove doktorske disertacije obuhvatila je formiranje kolekcije salmonela, za molekularnu karakterizaciju i ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i 60 izolata *S. Typhimurium*. Od 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i isto toliko izolata *S. Typhimurium* 24 je izolovano iz hrane i hrane za životinje, 24 iz fecesa živine i 12 iz kliničkog materijala obolelih ljudi. U istraživanje su uključeni laboratorijski izolati salmonela detektovanih u Veterinarskom specijalističkom institutu „Kraljevo“ (66 izolata), Institutu za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ (24 izolata), Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom sadu (FINS) (20 izolata) i Veterinarskom specijalističkom institutu „Jagodina“ (10 izolata) (Tabele 4.7. i 4.8.). Izolati *Salmonella* Enteritidis identifikovani su u periodu od 2015. do 2017. godine. Izolati *Salmonella* Typhimurium identifikovani su u periodu od 2012. do 2016. godine. Za razliku od izolata *Salmonella* Enteritidis koje su identifikovane u vremenskom razdoblju od 3 godine (2015. do 2017.), formiranje kolekcija izolata *Salmonella*

Typhimurium obuhvatilo je nešto duži vremenski period, jer je učestalost nalaza ovog serotipa znatno manja u poređenju sa *S. Enteritidis*.

Tabela 4.7. Poreklo izolata *Salmonella* Enteritidis

Oznaka izolata	Poreklo	Izolaciju izvršio
1 - 12.	Oboleli ljudi	IZJZS "Dr M. J. Batut"
13.	Pileće kožice	
14.	Pileća jetra	
15.	Bris trupa goveda	
16.	Pileća jetra	
17.	Pileće MSM	
18.	Pileće MSM	VSI Kraljevo
19.	Pileće kožice	
20.	Pileće kožice	
21.	Pileće kožice	
22.	PKS	
23.	PKS	
24.	PKS	
25.	Trup koke nosilje	
26.	Trup koke nosilje	
27.	Pileće meso	
28.	Sveža kobasica	VSI Jagodina
29.	Pileće MSM	
30.	Pileće MSM	
31.	Pileće MSM	
32.	Jetra i slezina živine	
33.	Jetra i slezina živine	
34.	Pileće meso	FINS
35.	Usitnjeno pileće meso	
36.	Pileće MSM	
37 - 60.	Feces živine	VSI Kraljevo

Legenda: MSM – mašinski separisano meso, PKS – potpuna krmna smeše za ishranu životinja

Tabela 4.8. Poreklo izolata *Salmonella* Typhimurium

Oznaka izolata	Poreklo izolata	Izolaciju izvršio
61 - 72.	Oboleli ljudi	IZJZS "Dr M. J. Batut "
73.	Pljeskavica	
74.	Ćevapičići	VSI Jagodina
75.	Usitnjeno neoblikovano meso	
76.	PKS	
77.	PKS	VSI Kraljevo
78.	PKS	
79.	PKS	
80.	Usitnjeno svinjsko meso	
81.	Usitnjeno svinjsko meso	
82.	Usitnjeno svinjsko meso	
83.	Usitnjeno svinjsko meso	
84.	Linija klanja	
85.	Linija klanja	
86.	Linija klanja	
87.	Linija klanja	FINS
88.	Linija klanja	
89.	Usitnjeno mešano meso	
90.	Usitnjeno mešano meso	
91.	Usitnjeno mešano meso	
92.	Usitnjeno mešano meso	
93.	Usitnjeno mešano meso	
94.	Usitnjeno svinjsko meso	
95.	Usitnjeno svinjsko meso	VSI Kraljevo
96.	Usitnjeno svinjsko meso	
97 - 120.	Feces živine	VSI Kraljevo

Legenda: PKS – potpuna krmna smeša za ishranu životinja

4.8. Izolacija *Salmonella* spp.

Detekcija *Salmonella* spp. u hrani, hrani za životinje i fecesu živine tokom studije poređenja metoda izvršena je u skladu sa metodom “Mikrobiologija lanca hrane - Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* - Deo 1: Otkrivanje *Salmonella* spp. (SRPS EN ISO 6579-1:2017)”.

Detekcija *Salmonella* spp. u hrani i hrani za životinje obuhvatila je sledeće faze:

1. **Predhodno obogaćenje u neselektivnoj tečnoj podlozi** - za pravljenje predobogaćenja upotrebljena je puferisana peptonska voda (BPW, Oxoid, UK) predhodno zagrejana je do sobne temperature. Pripremanje uzorka za ispitivanje podrazumevno pravljenje razblaženja 1:10, pri čemu 25 g/ml uzorka pomešano sa 225 ml BPW podloge. Inkubacija je izvršena na temperaturi od 34 do 38 °C tokom 18 h.
2. **Obogaćenje u selektivnoj tečnoj podlozi** - izvršena je inokulacija 0,1 ml kulture iz BPW u epruvetu sa 10 ml Rappaport - Vassiliadis podloge sa sojom (RVS bujon, Himedia, India) i 1 ml u 10 ml Muller - Kauffmann tetrionat - novoniocin bujona (MKTTn, Himedia, India). Inokulisani RVS bujon inkubiran je 24 h ± 3 h na 41.5°C ± 1°C, a MKTTn 24 h ± 3 h na 37°C ± 1°C.
3. **Izolacija i identifikacija** - sterilnom ezom od 10 µL, kulturom iz RVSb inokulisane su selektivne čvrste podloge: ksiloza lizin dezoksiholat agar (XLD agar, Himedia, India) i *Salmonella* - *Shigella* Agar (SS, Oxoid, UK). Na isti način inokulisana je i kultura iz MKTTn. Selektivne čvrste podloge (XLD i SS agar) inkubirane su na 37°C ± 1°C tokom 24 h ± 3 h. Nakon perioda inkubacije suspektne *Salmonella* spp. kolonije su zasejane na hranljivi agar (Himedia, India) i inkubirane na temperaturi od 34-38 °C tokom 24 h ± 3 h.
4. **Potvrđivanje primenom biohemijskih i seroloških testova** - za potvrđivanje je upotrebljena čista kultura umnožena na hranljivom agaru (Oxoid, UK).
 - Biohemijsko potvrđivanje izvršeno je zasejavanjem na odgovarajuće podloge biohemijskog niza (TSI agar, urea agar, podloga za dekarboksilaciju lizina). Tumačenje biohemijskih testova izvršeno je prema tabeli 1 standarda SRPS EN ISO 6579-1:2017.

- Serološko potvrđivanje izvršeno je aglutinacijom na mikroskopskoj pločici upotrebom polivalentnog antiseruma (Biorad, USA). Predhodno je izvršeno ispitivanje na prisustvo samoaglutinirajućih sojeva (ISO, 2014).

4.9. Detekcija *Salmonella* spp. u fecesu živine

Otkrivanje *Salmonella* spp. u fecesu životinja i u uzorcima iz životne sredine u primarnoj fazi proizvodnje takođe obuhvata četiri faze. Posle predhodnog obogaćenja u neselektivnoj tečnoj podlozi (puferisana peptonska voda, BPW), sledi obogaćenje na selektivnoj polučvrstoj podlozi (Modifikovani polučvrsti Rappaport - Vassiliadis agar, MRVS), a zatim selektivna izolacija i identifikacija (XLD i druga selektivna podloga po izboru) i potvrđivanje izolovanih kolonija (biohemijskim i serološkim testovima):

1. **Neselektivno predhodno obogaćenje** - pre upotrebe puferisana peptonska voda (BPW, Oxoid, UK) temperirana je na sobnoj temperaturi. Dodato je 225 ml BPW podloge u 25 g fecesa. Inkubacija je izvršena na temperaturi od 34 do 38 °C tokom $18h \pm 2h$.
2. **Selektivno obogaćenje** - izvršeno je korišćenjem modifikovanog polučvrstog Rappaport - Vassiliadis agara (MSRV, Oxoid, UK). Ploče MSRV su temperirane do sobne temperature, a zatim inokulisane sa 3 kapi kulture inkubirane u BPW, ukupne zapremine 0,1 ml. Kapi su nanete na površinu podloge zasebno, na jednakom rastojanju. Inokulisane MSRV ploče inkubirane su na $41,5 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ tokom $24h \pm 3h$. Tokom inkubacije ploče nisu okrenute. Na pločama suspektim na prisustvo *Salmonella* spp. uočena je sivobela, zamućena zona koja se širila od mesta inokulisane kapi. Ploče negativne posle 24h inkubacije, dodatno su inkubirane tokom $24h \pm 3h$.
3. **Selektivna izolacija** - za selektivnu izolaciju upotrebljeni su ksiloza lizin dezoksiholatnim agar (XLD, Himedia, India) i *Salmonella* - *Shigella* Agar (SS, Oxoid, UK). Pozitivne MSRV ploče presejane su ubadanjem eze od 1 μL uz granicu najudaljenije tačke migracije zamućene zone sa rastom u odnosu na tačku inokulacije. Inokulacija na površinu XLD i SS agara izvršena je na način da se dobiju dobro izolovane kolonije. Ploče su inkubirane na $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ tokom $24h \pm 3h$. Tipične kolonije *Salmonella* izrasle na XLD agaru imaju crno središte i svetlu prozirnu zonu crvenkaste boje. Varijante *Salmonella* koje su H₂S negativne (npr. *S. Paratyphi* A)

na XLD agaru su ružičaste sa tamnije ružičastim središtem. *Salmonella* koje su pozitivne na laktozu na XLD su žute sa crnim centrom ili bez njega.

4. **Potvrđivanje** - potvrđivanje suspektnih kolonija izolovanih na XLD i SS agaru izvršeno je biohemijskim metodama i serološkim testiranjem uz predhodno zasejavanje na hranljivi agar (Oxoid, UK) (ISO, 2014).

4.10. Serotipizacija

Serotipizacija *Salmonella* spp. izvršena je u skladu sa standardom "Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i tipizaciju *Salmonella* - Deo 3: Uputstvo za tipizaciju *Salmonella* spp. (SRPS CEN ISO/TR 6579-3:2014), zasnovanom na White–Kauffmann–Le Minor šemi (Grimont and Weill, 2007, ISO, 2014). Korišćeni su polivalentni antiserum (Biorad, SAD) i monovalentni serumi (Statens Serum Institute, Danska).

4.11. Ekstrakcija DNK *Salmonella* spp.

Pripremanje uzorka za ispitivanje podrazumevalo je mešanje 25 g/ml uzorka sa 225 ml puferisane peptonske vode (BPW, Oxoid, UK). Inkubacija je izvršena na temperaturi od 34 do 38 °C tokom 18h (ISO, 2017). Posle perioda pred-obogaćenja u BPW primenjene su tri procedure ekstrakcije DNK:

1. **“Kuvanje uzorka (PBS)“:** posle perioda pred-obogaćenja, 1 ml inicijalne suspenzije prenet je u tubicu zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka) i centrifugovan na 14.000 g tokom 5 minuta. Supernatant je odbačen, a „pelet“ ispran 1 ml slanog fosfatnog pufera (PBS). Tubica je centrifugovana na 14.000 g tokom 5 minuta. Supernatant je ponovo odbačen i „pelet“ je resuspendovan u 200 µL sterilne PCR vode. Zatim je izvršen termički tretman tokom 30 minuta na 95 °C, posle čega su naglo ohlađene (2-3 minuta na - 20 °C) i ponovo centrifugovane na 14.000 g tokom 5 minuta.
2. **Ekstrakcija DNK pomocu komercijalnog preparata „Insta™ Gene matrix“, BioRad (Chelex):** Jedan ml inicijalne suspenzije prenet je u tubicu zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka) i centrifugovan na 14.000 g tokom 10 minuta. Supernatant je odbačen a „pelet“ je resuspendovan u 200 µL „Insta™ Gene

matrix-a“, vorteksovan i inkubiran 30 minuta na 56 °C. Nakon toga tubica je vorteksovana na maksimalnoj brzini tokom 10 sekundi, a zatim inkubirana 8 minuta na 100°C. Tubice su naglo ohlađene (2-3 minuta na - 20 C°) i ponovo centrifugovane na 14.000 g tokom 5 minuta. Supernatant je prenet u čistu tubicu i korišćen kao “template” za PCR.

- 3. Ekstrakcija prema protokolu iQ-Check Salmonella II kit-a, BioRad (Standard I):** Jedan ml inicijalne suspenzije prenet je u tubicu zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka) i centrifugovan na 12.000 g tokom 5 minuta. Supernatant je odbačen, a „pelet“ resuspendovan u 200 µL reagensa za liziranje, vorteksovan na maksimalnoj brzini, a zatim inkubiran tokom 15 minuta na temperaturi od 95-100 °C. Nakon inkubacije, ponovo je izvršeno vorteksovanje na maksimalnoj brzini, a zatim i centrifugovanje na 12.000 g tokom 5 minuta.

Pripremljeni uzorci skladišteni su na temperaturi od -20 C° do trenutka ispitivanja.

4.12. Real-time PCR detekcija *Salmonella* spp.

4.12.1. Protokol za detekciju *invA* gena (Protokol A)

Detekcija *Salmonella* spp. primenom real-time PCR metode izvršena je prema protokolu koji je predhodno validovan i prihvaćen u Nemačkoj kao zvanična metoda za detekciju *Salmonella* spp. u hrani (Anderson et al., 2011), uz određene modifikacije. Umesto interne amplifikacione kontrole (IAC), IPC-ntb2 probe, kao IAC upotrebljen je DNA Extraction Control mix 610 (Bioline, Velika Britanija). Takođe, umesto 5 µL ekstrahovane DNK u PCR reakciji upotrebljeno je 2 µL. Lančana reakcija polimeraze (PCR) izvršena je u konačnoj zapremini od 25 µL, koja je sadržala 2 x Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies, SAD), 500 nM svakog prajmera, 200 nM probe (Tabela 4.9.) i 2 µl DNK. *Salmonella* proba (Sal-*invA*-SO-WH probe) obeležena je na 5' kraju „reporter“ bojom 6-carboxyfluorescein (FAM) i „TAMRA Quencher-om“ na 3' kraju. Interna amplifikaciona kontrola, kao i prajmeri i proba za IAC dodati su u reakciju prema uputstvu proizvođača. Amplifikacioni uslovi podrazumevali su “hot start“ tokom 3 minuta na 95 °C, iza koga je sledilo 45 ciklusa: 15 s na 95°C, 30 s na 60°C. Nivo

fluorescencije analiziran je pomoću softvera real-time PCR urađaja (Agilent AriaMx Software v1.1, Agilent Technologies, SAD) (Dmitric i sar., 2018).

Tabela 4.9. Prajmeri (Rahn i sar., 1992) i proba (Anderson i sar., 2011) upotrebljeni za detekciju *InvA* gena *Salmonella* spp.

Prajmer/ proba	Sekvenca (5'–3')	Veličina amplikona
Sal-139 (forward)	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA	
Sal-141 (reverse)	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	285 bp
Sal- <i>invA</i> -SO-WH proba	CTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACA	

Interpretacija rezultata - u slučaju kada je test dao $C_q \leq 39$ nezavisno od IAC C_q , rezultat je interpretiran kao pozitivan. U slučaju kada je test dao C_q vrednost ≥ 39 sa IAC $C_q \leq 33$, rezultat je interpretiran kao negativan. U slučaju kada je test dao C_q vrednost ≥ 39 sa IAC $C_q \geq 33$, prisutna je inhibicija PCR.

4.12.2. Protokol za detekciju *ttr* gena (Protokol M)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) izvršena je u konačnoj zapremini od 25 μ L, koja je sadržala 2 x Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 400 nM *ttr-4* i *ttr-6*, 250 nM *Salmonella* probe (*ttr-5*) (Malorny i sar., 2004) i 2 μ l DNK. Amplifikacioni uslovi podrazumevali su "hot start" tokom 3 minuta na 95 °C, iza koga je sledilo 45 ciklusa: 15 s na 95°C i 30 s na 65°C. Nivo fluorescencije analiziran je pomoću softvera real-time PCR urađaja (Agilent AriaMx Software v1.1, Agilent Technologies, SAD). Dizajniranje sekvenci za *Salmonella* specifične prajmere (*ttr-6* i *ttr-4*) i *Salmonella* probu (*ttr-5*) zasnovano je na sekvenci genskog lokusa *ttrBCA*. Prajmer *ttr-6* lociran je u okviru *ttrC* gena, dok su prajmer *ttr-4* i *Salmonella* proba (*ttr-5*) locirane u okviru *ttrA* gena. *Salmonella* proba obeležena je na 5' kraju „reporter“ bojom 6-carboxyfluorescein (FAM) i „Dark Quencher-om“ na 3' kraju (BHQ-1). Proba za internu amplifikacionu kontrolu (IAC proba) obeležena je na 5' kraju „reporter“ bojom ROX i „Dark Quencher-

om“ na 3' kraju (BHQ-1). Vestački kreirana IAC uključena je u svaku reakciju (Malorny i sar., 2004). Za kontrolnu DNK vrši se aniling prajmera istovetnih kao za *Salmonella* spp., *ttr-6* i *ttr-4* i hibridizacija IAC probe (Tabela 4.10.). Prajmeri i *TaqMan* probe, kao i IAC sekvenca naručeni su od strane „Metabion“ (Nemačka).

Tabela 4.10. Prajmeri i proba upotrebljeni za detekciju *ttr* gena *Salmonella* spp. (Malorny i sar., 2004)

Naziv	Sekvenca (5'–3')
<i>ttr-6</i> (forward)	CTCACCAGGAGATTACAACATGG
<i>ttr-4</i> (reverse)	AGCTCAGACCAAAGTGACCATC
Target proba (<i>ttr-5</i>)	CACCGACGGCGAGACCGACTTT
IAC sekvenca	GACTCACCAGGAGATTACAACATGGCTCTTGCTGTGCA TCATCGCAGAACATCAAAGCGTTCGCGTCGCCGTGTGG GATGGTCACTTTTGGTCTGAGCTAC
Proba za IAC	CACACGGCGACGCGAACGCTTT

Interpretacija rezultata - u slučaju kada je test dao $C_q \leq 39$ nezavisno od IAC C_q , rezultat je interpretiran kao pozitivan. U slučaju kada je test dao C_q vrednost ≥ 39 sa IAC $C_q \leq 33$, rezultat je interpretiran kao negativan. U slučaju kada je test dao C_q vrednost ≥ 39 sa IAC $C_q \geq 33$, prisutna je inhibicija PCR.

4.12.3. Komercijalni real-time PCR kit

Komercijalni, IQ check® *Salmonella* II kit (BioRad, USA) kit zasniava se na amplifikaciji *Salmonella* spp. specifičnog gena i detekciji real time PCR-om. Kit sadrži sve neophodne reagense: oligonukleotide (prajmere i probu) specifične za *Salmonella* spp., internu amplifikacionu kontrolu i probu specifičnu za nju, DNK polimerazu, nukleotide, DNK pozitivnu i DNK negativnu kontrolu. Prema uputstvu proizvođača, lančana reakcija polimeraze (PCR) izvršena je u konačnoj zapremini od 50 μ L, koja je

sadržala 40 µL amplifikacionog miksa, 5 µL probe i 5 µL template i isto toliko pozitivne i negativne kontrole u odgovarajućim bazenčićima (Lauer et al., 2009).

Interpretacija rezultata - rezultati su interpretirani u skladu sa uputstvom proizvođača komercijalnog kita. Pre interpretacije rezultata pozitivna i negativna kontrola moraju zadovoljiti uslove prikazane u Tabela 4.11., u suprotnom ispitivanje mora biti ponovljeno.

Tabela 4.11. IQ check® *Salmonella* II kit – interpretacija kontrola

	Detekcija <i>Salmonella</i> (FAM)	Interna kontrola
Negativna kontrola	Bez C_q	$28 \leq C_q \leq 40$
Pozitivna kontrola	$26 \leq C_q \leq 36$	Nije značajna

Salmonella pozitivni uzorci moraju za FAM imati $C_q \geq 10$. Ukoliko je C_q vrednost manja od 10, uzorak se može proglasiti pozitivnim ukoliko je amplifikaciona kriva tipična (sa ravnom baznom linijom nakon koje sledi nagli porast nivoa fluorescencije, a zatim sledi linija zasićenja).

Ukoliko se ispitivanje završi bez ostvarene C_q ili amplifikaciona kriva nije tipična, analizira se interna kontrola:

- Uzorak se smatra negativnim ukoliko nema ostvarene C_q vrednosti za FAM, interna kontrola ima $C_q \geq 28$.
- Ukoliko nema ostvarene C_q vrednosti ni za internu kontrolu, prisutna je inhibicija PCR. Uzorak (DNK) se mora razrediti destilovanom vodom u odnosu 1:10, a zatim se ispitivanje ponavlja.

Nakon analiziranja vrednosti ostvarenih kontrola, vrši se interpretacija rezultata prema podacima prikazanim u Tabela 4.12.

Tabela 4.12. IQ check® *Salmonella* II kit – interpretacija rezultata

Detekcija <i>Salmonella</i> (FAM)	Interna kontrola	Interpretacija
$C_q \geq 10$	Nije značajna	Pozitivan
Bez C_q	$C_q \geq 28$	Negativan
Bez C_q	Bez C_q	Inhibicija

4.13. Real-time PCR detekcija *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium*

Detekcija genoma *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* primenom real-time PCR metode izvršena je koristeći prajmere i probe za detekciju *safA* (*S. Enteritidis*) i *fliA-IS200* gena (*S. Typhimurium*) (Maurischat i sar., 2015). *Salmonella* Enteritidis specifična proba obeležena je na 5' kraju „reporter“ bojom 6-carboxyfluorescein (FAM) i „Dark Quencher-om“ na 3' kraju (BHQ-1). *Salmonella* Typhimurium specifična proba obeležena je na 5' kraju „reporter“ Hexachloro-Fluorescein (HEX) i „Dark Quencher-om“ na 3' kraju (BHQ-1) (Tabela 4.13). Lančana reakcija polimeraze (PCR) izvršena je u konačnoj zapremini od 25 µL, koja je sadržala 2 x Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies, SAD), 400 nM svakog prajmera, po 250 nM svake probe. Dva µl ekstrahovane DNK upotrebljeno je kao template. Amplifikacioni uslovi podrazumevali su „hot start“ tokom 3 minuta na 95 °C, iza koga je sledilo 45 ciklusa: 15 s na 95°C i 30 s na 61°C. Umesto interne amplifikacione kontrole (IAC, pUC18/19), kao IAC upotrebljen je DNA Extraction Control mix 610 (Bioline, Velika Britanija). Interna amplifikaciona kontrola, kao i prajmeri i proba za IAC dodati su u reakciju prema uputstvu proizvođača Nivo fluorescencije analiziran je pomoću softvera real-time PCR uređaja (Agilent AriaMx Software v1.1, Agilent Technologies, SAD). Prajmeri i *TaqMan* probe naručeni su od strane „Metabion“ (Nemačka).

Tabela 4.13. Prajmeri i proba upotrebljeni za detekciju genoma *Salmonella* Enteritidis (*safA*) i *S. Typhimurium* (*fliA-IS200*) (Maurischat i sar., 2015)

Prajmer/ proba	Sekvenca (5'–3')	Veličina amplikona
<i>safA</i> (forward)	GGTTGCTAACACGACACTG	
<i>safA</i> (reverse)	TGGGGCATTGGTATCAAAG	166 bp
<i>safA</i> proba	CTCCTCCCATTCCACATTTGCG	
<i>fliA-IS200</i> (forward)	CATTACACCTTCAGCGGTAT	
<i>fliA-IS200</i> (reverse)	CTGGTAAGAGAGCCTTATAGG	254 bp
<i>fliA-IS200</i> proba	CGGCATGATTATCCGTTTCTACAGAGG	

Interpretacija rezultata - u slučaju kada je test dao $C_q \leq 39$ nezavisno od IAC C_q , rezultat je interpretiran kao pozitivan. U slučaju kada je test dao C_q vrednost ≥ 39 sa IAC $C_q \leq 33$, rezultat je interpretiran kao negativan. U slučaju kada je test dao C_q vrednost ≥ 39 sa IAC $C_q \geq 33$, prisutna je inhibicija PCR.

4.14. Dizajniranje prajmera i proba za detekciju *InvA* gena *Salmonella* spp. (Protokol MD)

Dizajniranje prajmera i *TaqMan* probe zasnovano je na publikovanoj DNK sekvenci *InvA* gena *Salmonella* spp. Koristeći „Primer 3 software“ (Rozen i Skaletsky, 2000). izvršeno je dizajniranje prajmera i probe za amplifikaciju sekvence *invA* gena *Salmonella* spp. dužine 179 bp. Koristeći „Basic Local Alignment Search Tool - BLAST“ (Altschul i sar., 1990), prajmeri i proba su ispitani u NCBI bazi nukleotida da bi se osigurala specifičnost u odnosu na ostale publikovane sekvence ciljnog gena i odsustvo homologije sa sekvencama drugih mikroorganizama. Sekvence oligonukleotida prikazane su u tabeli 4.14.

Tabela 4.14. Detekcija *InvA* gena *Salmonella* spp. – sekvence dizajniranih prajmera i probe

Target	Prajmer/ proba	Sekvenca (5'-3')	Veličina amplikona
	<i>InvA</i> MD2.1 (forward)	G TTCCTTTGACGGTGCGATG	
<i>InvA</i> gen	<i>InvA</i> MD2 (reverse)	GATCTGGGCGACAAGACCAT	179 bp
	<i>InvA</i> MD2 (proba)	TCGGTGGGGATGACYCGCCA	

Lančana reakcija polimeraze (PCR) izvršena je u konačnoj zapremini od 25 µL, koja je sadržala 2 x Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies, SAD), po 500 nM svakog prajmera, 200 nM *Salmonella* probe i 2 µL DNK. *Salmonella* proba (Proba - *InvA* MD2) obeležena je na 5' kraju „reporter“ bojom 6-carboxyfluorescein (FAM) i „Dark Quencher-om“ na 3' kraju (Tabela 4.14.). Kao interna amplifikaciona kontrola (IAC), upotrebljen je DNA Extraction Control mix 610 (Bioline, Velika Britanija). Interna amplifikaciona kontrola, kao i prajmeri i proba za IAC dodati su u reakciju prema uputstvu proizvođača. Amplifikacioni uslovi podrazumevali su “hot start” tokom 3 minuta na 95 °C, iza koga je sledilo 45 ciklusa: 15 s na 95°C, 30 s na 60°C. Nivo fluorescencije analiziran je pomoću softvera real-time PCR urađaja (Agilent AriaMx Software v1.1, Agilent Technologies, SAD) Prajmeri i *TaqMan* probe naručeni su od strane „Metabion“ (Nemačka).

Interpretacija rezultata - u slučaju kada je test dao $C_q \leq 39$ nezavisno od IAC C_q , rezultat je interpretiran kao pozitivan. U slučaju kada je test dao C_q vrednost ≥ 39 sa IAC $C_q \leq 33$, rezultat je interpretiran kao negativan. U slučaju kada je test dao C_q vrednost ≥ 39 sa IAC $C_q \geq 33$, prisutna je inhibicija PCR.

4.15. Određivanje granice detekcije (LOD) i efikasnosti amplifikacije PCR protokola

Granica detekcije određena je ispitivanjem serije decimalnih razređenja genomske DNK *Salmonella* (10^0 - 10^6 kopija/qPCR). Ispitivanja su ponovljena 20 puta za svaki stepen razređenja. Stepen razređenja sa najmanjim brojem kopija po reakciji koji je dao 19 pozitivnih rezultata smatra se limitom detekcije metode za nivo poverenja od 95% (LOD_{95%}) (BVL, 2016). Efikasnost amplifikacije izračunata je pomoću softvera PCR uređaja prema formuli $e = 10^{-1/s} - 1$ (gde je "s" – „slope“ standardne krive dobijene ispitivanjem serije razređenja genomske DNK *Salmonella*).

4.16. Kontrola reakcije

Kontrole potrebne za otkrivanje patogenih mikroorganizama prisutnih u hrani primenom PCR obuhvataju (ISO, 2008):

1. **Negativna kontrola procesa** – ciljani uzorak matriksa hrane bez patogenog mikroorganizama, koji prolazi kroz sve faze analitičkog procesa (pripremanje uzorka, obogaćenje, ekstrakcija DNK, amplifikacija)
2. **Pozitivna kontrola procesa** – uzorak kome je dodat ciljani mikroorganizam, koji se tertira na isti način kao uzorci za ispitivanje.
3. **Negativna kontrola ekstrakcije (slepa proba ekstrakcije)** – kontrola koja se vrši kroz sve faze postupka ekstrakcije DNK bez prisustva uzorka za ispitivanje.
4. **Unutrašnja kontrola amplifikacije** – DNK dodata svakoj reakciji u definisanoj količini ili broju kopija, koja služi kao unutrašnja kontrola amplifikacije.
5. **Spoljašnja kontrola amplifikacije** – kontrolna DNK dodata alikvotu ekstrahovane nukleinske kiseline u definisanoj količini ili broju kopija, koja služi kao kontrola amplifikacije u odvojenoj reakciji.
6. **Pozitivna PCR kontrola** – reakcija koja sadrži ciljanu DNK u definisanoj količini ili broju kopija.
7. **Negativna PCR kontrola** – reakcija koja se izvodi sa vodom bez DNK i bez bilo kakvih PCR inhibitora.

Pozitivna PCR kontrola (u kojoj je prisutna ciljane sekvenca) i negativna PCR kontrola (u kojoj nije prisutna ciljane sekvenca) uključene su u svaki ciklus rada sjklera (za svaku seriju uzoraka). Unutrašnja kontrola amplifikacije mora biti uključena u svaku PCR reakciju (Hoorfar i sar., 2003; ISO, 2008).

U laboratoriji za molekularna ispitivanja učestalost upotrebe dodatnih kontrola - negativne i pozitivne kontrole procesa mora se odrediti kao deo programa obezbeđenja kvaliteta laboratorije. Njihova upotreba je obavezna uvek kada pozitivna PCR ili negativna PCR kontrola ne daju očekivane rezultate. Negativna kontrola ekstrakcije nije neophodna kada se izvodi negativna kontrola procesa. Tokom eksperimentalnog dela, prilikom izvođenja ispitivanja svake serije uzoraka uključene su i pozitivna i negativna kontrola procesa (ISO, 2008).

4.17. Termini i statistička analiza

Poređenje C_q vrednosti prirodno i veštački kontaminiranih uzoraka izvršeno je u Microsoft Office 2010 primenom t-testa. U okviru studije poređenja alternativnih metoda sa referentnom metodom određeni su: osetljivost alteranativne i referentne metode, relativna istinitost (eng. *relative trueness*), FPR (eng. *false positive ratio*) u skladu sa ISO 16140-2:2016:

- Alternativna metoda pozitivna (A+) / alternativna metoda negativna (A -)
- Referentna metoda pozitivna (R+) / referentna metoda negativna (R-)
- Pozitivno Slaganje (PA) – broj pozitivnih rezultata sa obe metode
- Pozitivna Devijacija (PD) – real time PCR pozitivan, standardnom metodom negativan
- Negativna Devijacija (ND) - real time PCR negativan, standardnom metodom pozitivan
- Negativno Slaganje (NA) - broj negativnih rezultata sa obe metode
- Ukupan broj uzoraka (N) ($N = NA + PA + PD + ND$)

$$SE_{alt} = (PA+PD) / (PA+ND+PD) \times 100\%$$

$$SE_{ref} = (PA+ND) / (PA+ND+PD) \times 100\%$$

$$RT = (PA+NA) / N \times 100\%$$

$$\text{FPR} = \text{FP}/\text{NA} \times 100\%$$

U skladu sa EN ISO 16140-1:2016, osetljivost alternativne metode (SE_{alt}) je sposobnost alternativne metode da detektuje analit. Osetljivost referentne metode (SE_{ref}) je sposobnost referentne metode da detektuje analit. Relativna tačnost (RT) je stepen slaganja između rezultata ostvarenih referentnom metodom i rezultata ostvarenih alternativnom metodom na identičnim uzorcima. Lažno pozitivan odnos (FPR) je količnik između lažno pozitivnih rezultata i negativnog slaganja izražen u procentima.

4.18. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti

4.18.1. Disk difuziona metoda

Disk difuziona metoda predstavlja jedan od najstarijih, ali i jedan od najčešće korišćenih metoda za ispitivanje antimikrobne osetljivosti. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti izvršeno je prema EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) protokolu (Matuschek i sar., 2014). Ukratko, nekoliko kolonija salmonela umnoženih na hranljivom agaru (Oxoid, UK) (tokom 16-24 h na temperaturi od 37 °C), preneto je pomoću brisa u fiziološki rastvor (0,9% NaCl). Suspenzija bakterija podešena je do koncentracije koja je odgovarala 0,5 McFarland-a. Pripremljena suspenzija korišćena je u roku od 15 minuta. Nanošenje inokuluma na površinu Mueller-Hinton agara (MH agar, Oxoid, UK) izvršeno je pomoću brisa „brazdanjem“ u tri pravca, okrećući pri tome ploče za 60 stepeni kako bi inokulum bio nanet ravomerno. Predhodno je višak tečnosti izbačen iz brisa rotiranjem uz unutrašnji gornji zid epruvete, da bi se sprečilo prekomerno nanošenje inokuluma na površinu MH agara. Diskovi sa antibioticima naneti su u roku od 15 minuta od inokulacije ploča. Ukupno šest diskova sa antibioticima raspoređeno na jednoj Petrijevoj ploči prečnika 90 mm. Diskovi su naneti pomoću pincete u aseptičnim uslovima. Pripremljene ploče su okrenute na gore i inkubirane na $35 \pm 1^\circ\text{C}$ tokom 16-20 h. Nakon inkubacije, očitavanje je izvršeno merenjem zone inhibicije jasno vidljive golim okom sa udaljenosti od 30 cm. Merenje je izvršeno upotrebom kljunastog pomičnog merila. Izmerene zone inhibicije su interpretirane u skladu sa „EUCAST“ preporukama (EUCAST, 2018a). Za izvođenje disk difuzione

metode upotrebljeni su diskovi proizvođača „Oxoid“ (Velika Britanija): ampicilin (AMP10), azitromicin (AZM15), cefotaksim (CTX5), hloramfenikol (C30), gentamicin (CN10), pefloksacin (PEF5), sulfametoksazol (RL100), tetraciklin (TE30), tigecycline (TGC15), trimetoprim (W5), meropenem (MEM10) i ceftazidim (CAZ10) proizvođača „Bioanalyse“ (Turska). Rutinska kontrola kvaliteta izvršena je u skladu sa preporukama koje je dao EUCAST (EUCAST, 2018b).

4.18.2. E test

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) određena je primenom E-testa. Metoda se zasniva na primeni E-test traka na koje je nanesen antibiotik u različitim koncentracijama izraženim u $\mu\text{g/mL}$ (mikrogrami po mililitru). Na istoj strani trake gde se nalazi izražena koncentracija antibiotika, nalazi se i kod antimikrobnog agensa. Kao referentna podloga upotrebljen je Mueller-Hinton agar (MH agar, Oxoid, UK). Pre otvaranja test trake su temperirane na sobnoj temperaturi. Inokulum je pripremljen na istovetan način kao i za disk difuzionu metodu. Ukratko, 4-5 dobro izolovanih kolonija salmonela umnoženih na hranljivom agaru (Oxoid, UK) (tokom 16-24 h na temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), preneto je pomoću brisa u 5 ml fiziološkog rastvora (0,9% NaCl). Suspenzija bakterija podešena je do koncentracije koja je odgovarala 0,5 McFarland-a. Pripremljena suspenzija korišćena je u roku od 15 minuta. Nanošenje inokuluma na površinu Mueller-Hinton agara (MH agar, Oxoid, UK) izvršeno je pomoću brisa „brazdanjem“ u tri pravca. Predhodno je višak tečnosti izbačen iz brisa rotiranjem uz unutrašnji gornji zid epruvete, da bi se sprečilo prekomerno nanošenje inokuluma na površinu MH agara. Trake sa antibioticima nanete su u roku od 15 minuta od inokulacije ploča. Trake su nanete pomoću pincete u aseptičnim uslovima, pri čemu je skala koja označava koncentraciju antibiotika okrenuta na gore, a kod koji označava vrstu antibiotika okrenut je ka obodu Petri ploče. Trake su postavljene na način da celom dužinom nalegnu na površinu podloge, bez prisustva mehurića vazduha. Nakon postavljanja, trake nisu više pomerane. Pripremljene ploče su okrenute na gore i inkubirane na $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ tokom 16-20 h. Nakon inkubacije, oko E test trake javljala se zona inhibicije elipsoidnog oblika. Mesto gde su ivice elipse dodirivale test traku, očitana je kao vrednost MIC. Očitane vrednosti inhibicije interpretirane su u

skladu sa „EUCAST“ preporukama (EUCAST, 2018a). Kontrola kvaliteta izvršena prema uputstvu proizvođača E test traka (Liofilchem, 2017).

Za izvođenje E - testa upotrebljene su sledeće test trake proizvođača “Liofilchem” (Italija): Ampicilin (AMP 0.016-256 µg/mL), hloramfenikol (C 0.016-256 µg/mL), ciprofloksacin (CIP 0.002-32 µg/mL), tetraciklin (TE 0.016-256 µg/mL), trimetoprim (TM 0.002-32 µg/mL).

4.19. Gel elektroforeza pulsirajućem polju (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)

Gel elektroforeza pulsirajućem polju (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE) izvršena je prema “PulseNet USA Standardized PFGE Protocol” (CDC, 2017; Ribot i sar., 2006). Ukratko, izolati salmonela su zasejani na tripton soja agar (TSA, Oxoid, UK) i inkubirani na 37 °C tokom 18-24h. Nakon inkubacije izrasle kolonije salmonela prenete su sterilnim brisom u Cell Suspension Buffer (CSB; 100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8.0). Koncentracija bakterijskih ćelija u suspenziji podešena je razblaživanjem upotrebom CSB ili dodavanjem bakterijskih ćelija. Apsorbansa pripremljenih suspenzija očitana je na spektrofotometru (UV - 1800 SHIMADZU, Japan) na talasnoj dužini 610 nm i iznosila je 1.3-1.4. Od pripremljene suspenzije, 400 µl preneto je u plastične tubice (Eppendorf, Germany), a zatim je u svaku tubicu dodato po 20 µl proteinaze K (20 mg/ml, Thermo Scientific, SAD). Predhodno pripremljena 1% Sea Kem Gold agaroz (Lonza, SAD), čuvana je u vodenom kupatilu na temperaturi od 55-60 °C. U „ependorf” tubicu sa 400 µl bakterijske suspenzije dodato je 400 µl 1% Sea Kem Gold agaroz, pri čemu su komponente izmešane pipetiranjem gore-dole nekoliko puta. Odmah zatim, mešavina je prenetu u plastične kalupe (Disposable Plug Mold, Bio Rad Laboratories, USA) u kojima je agaroz očvrsla držanjem na ambijentalnoj temperaturi tokom 15 minuta. Tako pripremljeni “plagovi” metalnom spatulom istisnuti su u tubice u kojima se nalazio pufer za liziranje (Cell Lysis Buffer - CLB; 50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl). Liziranje je izvršeno u „thermo shaker-u“ (Bio San, Letonija) na 55 C° tokom 2 sata, uz konstantno mešanje. Ovaj korak ima za cilj da pod uticajem proteinaze K i pufera za liziranje dođe do razaranja ćelijskog zida bakterija, bez kidanja lanca DNK, kako bi on u celosti bio izložen dejstvu restriktivnih enzima. Nakon liziranja, izvršeno je ispiranje

plagova, dva puta u predhodno temperiranoj (54-55 C°) ultra čistoj vodi (HPLC) i četiri puta u TE puferu (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0), takođe predhodno temperiranom (54-55 C°). Cilj ovog koraka bio je da se dobije što čistiji genom salmonela, uklanjanjem nepoželjnih produkata liziranja i ostataka proteinaze.

Pre digestije restriktivnim enzimima, izvršen je inkubacioni korak upotrebom restriktivnog pufera (10x Tango buffer with BSA, Thermo Scientific, SAD) razblaženog ultračistom vodom (HPLC) u odnosu 1:10. U ependorf tubice zapremine 1.5 ml dodato je 200 µl na ovaj način razblaženog pufera. Pomoću spatule izvršeno je prenošenje plagova na sterilne Petrijeve ploče. Plagovi su zatim isečeni upotrebom nožića skalpela, pri čemu je širina isečenih plagova iznosila 2.5 mm. Nakon toga preneti su u tubice u kojima se nalazio razblaženi restrikcioni pufer. Na identičan način, pripremljeni su i plagovi *Salmonella* ser. Braenderup, koja je upotrebljena kao standard. Uzorci i kontrolni plagovi inkubirani su na ambijentalnoj temperaturi 10-15 minuta, a zatim je pufer odstranjen pipetom, vodeći računa da isečci plagova ne budu oštećeni ili odbačeni zajedno sa nastavkom za mikrotitar pipetu.

Restrikcioni master miks pripremljen je u skladu sa Tabela 4.15. U svaku tubicu dodato je po 200 µl restrikcionog enzimskog miksa koji je u potpunosti prekrpio isečke plagova. Enzimska restrikcija trajala je 2 sata na temperaturi od 37 °C.

Tabela 4.15. Restrikcioni master miks

REAGENS	µl/PLUG
Ultra čista voda (HPLC)	175 µl
10X restrikcioni pufer sa BSA* (Thermo Scientific, SAD)	20 µl
<i>Xba</i> I (10U/ µl , Thermo Scientific, SAD)	5 µl
Ukupna zapremina	200 µl

**Bovine Serum Albumin*

Nakon enzimske digestije, plagovi su podvrgnuti elektroforezi u 1% SeaKem Gold agarozu uz upotrebu CHEF DR-III sistema (Bio-Rad, USA). Elektroforeza je trajala 18 sati, a zadati parametri bili su sledeći: početno vreme 2.2 sekunde, završno vreme 63.8 sekundi, napon 6 V, temperatura pufera 14°C. Za pravljenje gela i „running buffer“ upotrebljen je TBE pufer (0.5X Tris Boric acid EDTA; Tris 0.04M, Boric acid 0.04M,

EDTA, disodium 0.001M). Nakon elektroforeze, gel je obojen etidijum bromidom (Bio-Rad, USA). Slikanje gela izvršeno je GelDoc XR sistemom (Bio-Rad, USA), primarna analiza gela GelDoc softverom, dok je dendogram koji pokazuje stepen genetičke sličnosti izolata urađen pomoću FPQuest softvera (Bio-Rad, USA).

5. REZULTATI

5.1. Real-time PCR detekcija *invA* (Protokol A) i *ttr* gena *Salmonella* spp. (Protokol M) u hrani i uzorcima iz okruženja

Ukupno 616 uzoraka (466 potencijalno prirodno kontaminiranih i 150 veštački kontaminiranih), podeljenih u 5 kategorija (meso i proizvodi od mesa, meso živine, voće i povrće, mleko i mlečni proizvodi i uzorci iz okruženja), ispitano je na prisustvo *Salmonella* spp. real-time PCR metodom za detekciju *invA* (Protokol A) i *ttr* gena (Protokol M). Paralelno sa alternativnim metodama izvršeno je i ispitivanje uzoraka standardnom metodom (SRPS EN ISO 6579-1:2017). U kategoriji “potencijalno prirodno kontaminiranih uzoraka”, deo uzoraka bio je nepoznatog *Salmonella* spp. statusa pre ispitivanja alternativnim i standardnom metodom, a na drugom delu uzoraka izvršeno je ponovno ispitivanje istim metodama, nakon detekcije *Salmonella* spp. standardnom metodom, tokom redovnog ispitivanja u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta “Kraljevo”. U početnoj fazi eksperimenta testirani su uzorci nepoznatog *Salmonella* spp. statusa s ciljem da se utvrdi da li će širok spektar matriksa hrane imati negativan uticaj na amplifikaciju (prisustvo inhibitora PCR), a u sledećoj fazi vršena je veštačka inokulcija uzoraka i ponovljeno ispitivanje pozitivnih uzoraka hrane.

Ispitivanjem 616 uzoraka primenom standardne SRPS EN ISO 6579-1:2017 metode, *Salmonella* spp. detektovane su u 197 uzoraka. Sa druge strane, primenom real-time PCR za detekciju *invA* gena (protokola A) i *ttr* gena *Salmonella* spp. (Protokol M), utvrđeno je prisustvo genoma *Salmonella* spp. u 202, odnosno 203 uzorka (Tabela 5.1.). Primenom alternativnih metoda lažno negativni rezultati nisu utvrđeni. Svi uzorci koji su pokazali „pozitivnu devijaciju“ (negativan rezultat primenom referentne metode, a pozitivan primenom alternativne metode), bili su takođe pozitivni nakon ispitivanja primenom validovanog, komercijalnog IQ check® *Salmonella* II kit (Bio-Rad, USA) (potvrđivanje alternativne metode).

Relativna osetljivost i lažno pozitivan količnik alternativne metode, iznosili su 100% i 0.0%. Relativna tačnost bila je u opsegu od 98.7% do 99.2%, u zavisnosti od procedure ekstrakcije DNK i primenjenog real-time PCR protokola. Osetljivost alternativne metode

(SE_{alt}), osetljivost referentne metode (SE_{ref}), relativna tačnost (RT) i lažno pozitivan količnik alternativne metode (FPR) nakon različitih procedura ekstrakcije DNK (Chelex i PBS) zbirno su prikazani u Tabela 5.1. Najniže C_q vrednosti ostvarene su primenom real-time PCR protokola za detekciju *ttr* gena *Salmonella* spp. (Protokol M), nakon „Chelex“ DNK ekstrakcije. Ostvarene C_q vrednosti su prikazane u cilju upoređivanja različitih protokola ekstrakcije DNK i primenjenih real-time PCR protokola, ali se ne mogu koristiti za kvantitativnu interpretaciju zbog faze predobogaćenja uzoraka pre primene real-time PCR metode. Ostvarene C_q vrednosti i zbirni prikaz rezultata dati su u tabelama 5.1-5.5.

Tabela 5.1. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih nakon ispitivanja svih uzoraka hrane i uzoraka iz okruženja u zoni proizvodnje ili rukovanja hranom.

Metoda	DNK ekstrakcija	Br. uzoraka	A	R		SE_{alt}	SE_{ref}	RT	FPR
				R+	R-				
Protokol A	Chelex	616	A+	PA = 197	PD = 5	100 %	97.5 %	99.2 %	0.0 %
			A -	ND = 0	NA = 414				
	PBS	400*	A+	PA = 138	PD = 4	100 %	97.2 %	99.0 %	0.0 %
			A -	ND = 0	NA = 257				
Protokol M	Chelex	616	A+	PA = 197	PD = 6	100 %	97.0 %	99.0 %	0.0 %
			A -	ND = 0	NA = 413				
	PBS	400*	A+	PA = 138	PD = 5	100 %	95.8 %	98.7 %	0.0 %
			A -	ND = 0	NA = 256				

Skraćenice: Alternativna metoda (A): pozitivna (A+) / negativna (A -); Referentna metoda (R): pozitivna (R+) / negativna (R-); Pozitivno Slaganje (PA); Pozitivna Devijacija (PD); Negativna Devijacija (ND); Negativno Slaganje (NA); Osetljivost alternativne metode (SE_{alt}); Osetljivost referentne metode (SE_{ref}); Relativna tačnost (RT), Lažno pozitivan količnik alternativne metode (FPR);

* U jenom uzorku detektovano je prisustvo inhibitora.

5.1.1. Ispitivanje veštački kontaminiranih uzoraka

Ukupno 150 veštački kontaminiranih uzoraka (Tabela 5.2.), po 30 uzoraka čevapa, malina, pasterizovanog mleka, pilećeg mesa i kožica sa vrata živine, ispitano je na prisustvo *Salmonella* spp. real-time PCR metodom za detekciju *invA* (Protokol A) i *ttr* gena (Protokol M), nakon 2 načina ekstrakcije DNK (Chelex i PBS). Dodatno, veštački kontaminirani uzorci su ispitani i upotrebom komercijalno dostupnog real-time PCR kita (IQ check® *Salmonella* II, Bio-Rad, USA), pri čemu je ekstrakcija DNK izvršena prema uputstvu proizvođača kita (Standard I).

Za veštačku kontaminaciju uzoraka čevapa, malina, pasterizovanog mleka i pilećeg mesa upotrebljen je referentni soj *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), a uzorci kožica sa vrata živine kontaminirani su *S. Typhimurium* (ATCC 14028). Koristeći suspenziju poznate koncentracije bakterijskih ćelija, izvršena je veštačka kontaminacija uzoraka, a nivo kontaminacije iznosio je 1-10 i 10-100 cfu/25 g uzorka. Neinkulirani uzorci upotrebljeni su kao negativne kontrole. Pre veštačke kontaminacije, isključeno je prisustvo *Salmonella* spp. u uzorcima, testiranjem standardnom SRPS EN ISO 6579-1:2017 i real-time PCR metodom.

Rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pokazali su da su svi primenjeni real-time PCR protokoli osetljivi i mogu detektovati 1-10 cfu u 25 g pilećeg mesa, čevapa, malina, pasterizovanog mleka i kožica sa vrata živine. Prisustvo inhibitora PCR, koje nije bilo moguće ukloniti ponovnim testiranjem, detektovano je u jednom uzorku veštački kontaminiranih malina.

Kvalitativno izraženi rezultati nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka primenom standardne (SRPS EN ISO 6579-1:2017) i tri real-time PCR metode za detekciju *Salmonella* spp. u hrani (IQ check® *Salmonella* II kit, Bio-Rad, USA, protokol A, protokol M), nakon različitih načina ekstrakcije DNK (Chelex, PBS, Standard I) prikazani su u tabeli 5.2. Ostvarene C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka primenom dve real-time PCR metode za detekciju *Salmonella* spp. u hrani (Protokol A, Protokol M), nakon različitih načina ekstrakcije DNK (Chelex, PBS) prikazane su u tabeli 5.3.

Tabela 5.2. Zbirni prikaz rezultata nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka

Tip uzorka	Nivo kontaminacije CFU/25 g	Broj pozitivnih uzoraka/broj uzoraka					
		ISO 6579	Real time PCR				IQ check
			Protokol A		Protokol M		
			Chelex	PBS	Chelex	PBS	
Ćevapi	10-100	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1-10	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Maline	10-100	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1-10	19/20	19/20	18/20	20/20	18/20	20/20
	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Mleko	10-100	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1-10	19/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Pileće meso	10-100	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1-10	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Kožice sa vrata živine	10-100	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1-10	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Tabela 5.3. Zbirni prikaz ostvarenih C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka

Tip uzorka	Nivo kontaminacije CFU/25 g	Real-time PCR			
		Protokol A		Protokol M	
		Chelex	PBS	Chelex	PBS
Ćevapi	10-100	19,07	21,56	17,64	19,19
	1-10	21,15	23,19	19,66	21,83
	0	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q
Maline	10-100	21,31	21,73	18,54	19,67
	1-10	25,42	25,99	21,91	23,31
	0	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q
Mleko	10-100	15,95	17,28	14,07	15,39
	1-10	16,06	17,98	14,44	16,22
	0	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q
Pileće meso	10-100	18,99	22,76	17,19	20,59
	1-10	20,96	23,79	18,68	21,51
	0	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q
Pileće kožice sa vrata	10-100	17,86	22,25	15,21	19,26
	1-10	19,14	22,39	17,07	20,18
	0	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q	Bez C _q

5.1.2. Ispitivanje potencijalno prirodno kontaminiranih uzoraka

Ostvarene C_q vrednosti nakon ispitivanja prirodno kontaminiranih uzoraka koristeći dva protokola ekstrakcije DNK (Chelex, PBS) i dva real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* spp. u hrani (protokol A, protokol M) prikazane su u tabeli 5.4

Tabela 5.4. Ostvarene C_q vrednosti nakon ispitivanja prirodno kontaminiranih uzoraka

Oznaka uzorka	ISO 6579	Protokol A		Protokol M	
		CHELEX	PBS	CHELEX	PBS
1	Pozitivan	19,51	22,37	17,87	20,41
2	Pozitivan	18,9	21,76	17,17	19,93
3	Pozitivan	22,27	24,75	20,28	22,77
4	Pozitivan	21,56	22,46	19,5	20,24
5	Pozitivan	21,71	22,36	19,78	20,71
6	Pozitivan	22,75	24,26	20,79	22,93
7	Pozitivan	21,04	24,57	19,16	22,67
8	Pozitivan	20,45	21,55	19	19,9
9	Pozitivan	20,73	21,86	18,92	20,28
10	Pozitivan	21,72	23,45	19,8	21,73
11	Pozitivan	21,05	23,06	18,86	20,88
12	Negativan	31,87	33,06	29,42	31,06
13	Pozitivan	34,58	35,92	32,44	33,6
14	Pozitivan	32,34	32,78	29,85	30,75
15	Negativan	38,11	Bez C_q	35,37	37,69
16	Pozitivan	26,56	26,27	24,33	24,39
17	Negativan	33,82	32,84	32,05	30,85
18	Pozitivan	27,97	28,32	26,07	27,03
19	Pozitivan	33,17	36,22	31,03	33,83
20	Negativan	36,93	36,67	30,31	31,48
Prosečna C_q vrednost		25,73	27,08	23,51	25,02

Pri izračunavanju prosečne C_q vrednosti izostavljen je uzorak broj 15, koji je pokazao negativan rezultat ispitivanjem standardne (SRPS EN ISO 6579-1:2017), dok su protokol A (nakon „Chelex“ ekstrakcije) i protokol M (nakon „Chelex“ i „PBS“ ekstrakcije) pokazali pozitivnu devijaciju. Jedino je primenom protokol A nakon „PBS“ ekstrakcije, ostvareno negativno slaganje, pri čemu nije detektovana fluorescencija (No C_q), pa uzorak nije uzet u kalkulaciju.

Ostvarene C_q vrednosti nakon ispitivanja prirodno kontaminiranih uzoraka koristeći „chelex“ ekstrakciju i dva real time PCR protokola za detekciju *Salmonella* spp. u hrani (protokol A, protokol M) prikazani su u tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Ostvarene C_q vrednosti nakon ispitivanja prirodno kontaminiranih uzoraka nakon „Chelex“ ekstrakcije

Oznaka uzorka	ISO 6579	Protokol A	Protokol M	Oznaka uzorka	ISO 6579	Protokol A	Protokol M
1	Pozitivan	19,51	17,87	40	Pozitivan	22,86	21,04
2	Pozitivan	18,9	17,17	41	Pozitivan	27,74	25,88
3	Pozitivan	22,27	20,28	42	Pozitivan	18,3	16,83
4	Pozitivan	21,56	19,5	43	Pozitivan	20,44	18,7
5	Pozitivan	21,71	19,78	44	Pozitivan	23,55	21,97
6	Pozitivan	22,75	20,79	45	Pozitivan	23,64	21,56
7	Pozitivan	21,04	19,16	46	Pozitivan	20,31	19,21
8	Pozitivan	20,45	19	47	Pozitivan	24,94	19,16
9	Pozitivan	20,73	18,92	48	Pozitivan	23,19	21,47
10	Pozitivan	21,72	19,8	49	Pozitivan	22,53	20,63
11	Pozitivan	21,05	18,86	50	Pozitivan	23,21	21,31
12	Negativan	31,87	29,42	51	Pozitivan	23,47	21,64
13	Pozitivan	34,58	32,44	52	Pozitivan	21,2	20,1
14	Pozitivan	32,34	29,85	53	Pozitivan	22,9	21,12
15	Negativan	38,11	35,37	54	Pozitivan	26,32	24,68
16	Pozitivan	26,56	24,33	55	Pozitivan	26,02	24,3
17	Negativan	33,82	32,05	56	Pozitivan	21,23	19,57
18	Pozitivan	27,97	26,07	57	Pozitivan	25	23,49
19	Pozitivan	33,17	31,03	58	Pozitivan	26,82	25,01
20	Negativan	36,93	30,31	59	Pozitivan	23,79	21,9
21	Pozitivan	34,7	32,21	60	Pozitivan	23,94	22,46
22	Pozitivan	17,47	15,52	61	Pozitivan	19,11	17,53
23	Pozitivan	20,32	18,67	62	Pozitivan	18,15	16,88
24	Pozitivan	22,96	21,31	63	Pozitivan	16,22	14,75
25	Pozitivan	20,5	18,97	64	Pozitivan	24,47	22,5
26	Pozitivan	24,35	22,51	65	Pozitivan	30,78	28,94
27	Pozitivan	20,01	18,42	66	Pozitivan	24,89	23,95
28	Pozitivan	22,92	19,46	67	Pozitivan	23,01	21,56
29	Pozitivan	20,04	18,46	68	Pozitivan	34,33	32,45
30	Pozitivan	24,16	22,17	69	Pozitivan	25,81	24,69
31	Pozitivan	20,62	18,89	70	Pozitivan	23,31	22,13
32	Pozitivan	24,98	23	71	Pozitivan	19,26	18,18
33	Pozitivan	27,13	25,22	72	Pozitivan	20,43	19,38
34	Pozitivan	22,59	20,84	73	Pozitivan	21,21	19,81
35	Pozitivan	22,42	20,7	74	Pozitivan	20,1	18,92
36	Pozitivan	27,16	25,24	75	Pozitivan	26,9	25,46
37	Pozitivan	21,26	20,01	76	Pozitivan	28,13	27,06
38	Pozitivan	24,49	23,24	77	Pozitivan	35,76	34,21
39	Pozitivan	25,33	23,97	78	Pozitivan	32,49	30,76
Prosečna C_q vrednost						24,44	22,59

5.1.3. Real-time PCR protokol za detekciju *invA* gena (protokol A) - pojedinačni rezultati prema grupi uzoraka nakon “Chelex” ekstrakcije DNK

Tokom studije poređenja metoda ispitano je ukupno 616 uzoraka (466 potencijalno prirodno kontaminiranih i 150 veštački kontaminiranih), podeljenih u 5 kategorija koje su obuhvatile: meso i proizvode od mesa (221 uzorak), meso živine (125 uzoraka), voće i povrće (90 uzoraka), mleko i mlečne proizvode (90 uzoraka) i uzorke iz okruženja - kožice sa vrata živine, briseve trupova goveda i svinja i briseve radnih površina u zoni proizvodnje i rukovanja hranom (90 uzoraka).

Detekcija genoma *Salmonella* spp. izvršena je primenom real-time PCR metode za detekciju *invA* gena (Protokol A), nakon “Chelex” ekstrakcije DNK. Paralelno sa alternativnom metodom izvršeno je ispitivanje uzoraka standardnom metodom (SRPS EN ISO 6579-1:2017). Ostvareni rezultati prikazani su u tabelama 5.6., 5.7., 5.8., 5.9 i 5.10.

Tabela 5.6. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Meso i proizvodi od mesa (221 uzorak)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 62	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 3
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 156

Tabela 5.7. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Meso živine (125 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 55	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 1
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 69

Tabela 5.8. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Voće i povrće (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 24	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 0
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 66

Tabela 5.9. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Mleko i mlečni proizvodi (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 24	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 1
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 65

Tabela 5.10. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Uzorci iz okruženja (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 32	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 0
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 58

5.1.4. Real-time PCR protokol za detekciju *ttr* gena (protokol M) - pojedinačni rezultati prema grupi uzoraka nakon “Chelex” ekstrakcije DNK

Tokom studije poređenja metoda ispitano je ukupno 616 uzoraka (466 potencijalno prirodno kontaminiranih i 150 veštački kontaminiranih), podeljenih u 5 kategorija koje su obuhvatile: meso i proizvode od mesa (221 uzorak), meso živine (125 uzoraka), voće i povrće (90 uzoraka), mleko i mlečne proizvode (90 uzoraka) i uzorke iz okruženja - kožice sa vrata živine, briseve trupova goveda i svinja i briseve radnih površina u zoni proizvodnje i rukovanja hranom (90 uzoraka).

Detekcija genoma *Salmonella* spp. izvršena je primenom real-time PCR metode za detekciju *ttr* gena (Protokol M), nakon “Chelex” ekstrakcije DNK. Paralelno sa alternativnom metodom izvršeno je ispitivanje uzoraka standardnom metodom (SRPS EN ISO 6579-1:2017). Ostvareni rezultati prikazani su u tabelama 5.11., 5.12., 5.13., 5.14., 5.15..

Tabela 5.11. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom
Meso i proizvodi od mesa (221 uzorak)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 62	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 3
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 156

Tabela 5.12. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Meso živine (125 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 55	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 1
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 69

Tabela 5.13. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Voće i povrće (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 24	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 1
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 65

Tabela 5.14. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Mleko i mlečni proizvodi (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 24	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 1
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 65

Tabela 5.15. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Uzorci iz okruženja (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 32	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 0
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 58

5.1.5. Real-time PCR protokol za detekciju *invA* gena (protokol A) - pojedinačni rezultati prema grupi uzoraka nakon “PBS” ekstrakcije DNK

Tokom studije poređenja metoda ukupno 400 uzoraka (250 potencijalno prirodno kontaminiranih i 150 veštački kontaminiranih) ispitano je primenom real-time PCR metode za detekciju *invA* gena (Protokol A), nakon “PBS” ekstrakcije DNK. Paralelno sa alternativnom metodom izvršeno je i ispitivanje uzoraka standardnom metodom (SRPS EN ISO 6579-1:2017).

Ispitivanjem je obuhvaćeno 5 kategorija: meso i proizvodi od mesa (90 uzoraka), meso živine (90 uzoraka), voće i povrće (70 uzoraka), mleko i mlečni proizvodi (70 uzoraka) i uzorci iz okruženja - kožice sa vrata živine, brisevi trupova goveda i svinja i brisevi radnih površina u zoni proizvodnje i rukovanja hranom (80 uzoraka).

Ostvareni rezultati prikazani su u tabelama 5.16., 5.17., 5.18., 5.19. i 5.20.

Tabela 5.16. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom
Meso i proizvodi od mesa (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 37	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 3
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 50

Tabela 5.17. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Meso živine (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 29	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 0
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 61

Tabela 5.18. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Voće i povrće (70 uzoraka) *

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 23	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 0
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 46

*Prisustvo inhibitora PCR detektovano je u jednom uzorku veštački kontaminiranih malina

Tabela 5.19. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Mleko i mlečni proizvodi (70 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 24	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 1
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 45

Tabela 5.20. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Uzorci iz okruženja (80 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 25	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 0
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 55

5.1.6. Real-time PCR protokol za detekciju *ttr* gena (protokol M) - pojedinačni rezultati prema grupi uzoraka nakon “PBS” ekstrakcije DNK

Tokom studije poređenja metoda ukupno 400 uzoraka (250 potencijalno prirodno kontaminiranih i 150 veštački kontaminiranih) ispitano je primenom real-time PCR metode za detekciju *ttr* gena (Protokol M), nakon “PBS” ekstrakcije DNK. Paralelno sa alternativnom metodom izvršeno je i ispitivanje uzoraka standardnom metodom (SRPS EN ISO 6579-1:2017).

Ispitivanjem je obuhvaćeno 5 kategorija uzoraka: meso i proizvodi od mesa (90 uzoraka), meso živine (90 uzoraka), voće i povrće (70 uzoraka), mleko i mlečni proizvodi (70 uzoraka) i uzorci iz okruženja - kožice sa vrata živine, brisevi trupova goveda i svinja i brisevi radnih površina u zoni proizvodnje i rukovanja hranom (80 uzoraka).

Ostvareni rezultati prikazani su u tabelama 5.21., 5.22., 5.23., 5.24. i 5.25.

Tabela 5.21. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Meso i proizvodi od mesa (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 37	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 3
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 50

Tabela 5.22. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Meso živine (90 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 29	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 1
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 60

Tabela 5.23. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Voće i povrće (70 uzoraka) *

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 23	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 0
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 46

*Prisustvo inhibitora PCR detektovano je u jednom uzorku veštački kontaminiranih malina

Tabela 5.24. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Mleko i mlečni proizvodi (70 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 24	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 1
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 45

Tabela 5.25. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih referentnom i alternativnom metodom;
Uzorci iz okruženja (80 uzoraka)

REZULTAT	Referentni metod pozitivan (R+)	Referentni metod negativan (R-)
Alternativni metod pozitivan (A+)	Pozitivno slaganje (A+,R+) PA = 25	Pozitivna devijacija (A+,R-) PD = 0
Alternativni metod Negativan (A-)	Negativna devijacija (A-,R+) ND = 0	Negativno slaganje (A-, R-) NA = 55

5.2. Real-time PCR detekcija *invA* (Protokol A) i *ttr* gena *Salmonella* spp. (Protokol M) u hrani za životinje

Ukupno 100 uzoraka hrane za životinje ispitano je na prisustvo *Salmonella* spp. real-time PCR metodom za detekciju *invA* (Protokol A) i *ttr* gena (Protokol M) nakon “Chelex” ekstrakcije DNK. Paralelno sa alternativnim metodama izvršeno je i ispitivanje uzoraka standardnom metodom (SRPS EN ISO 6579-1:2017). Primenom standardne i alternativnih metoda *Salmonella* spp. detektovane su u 52 uzoraka. Ostvarene C_q vrednosti i zbirni prikaz rezultata dati su u tabelama 5.26, 5.27., 5.28 i 5.29.

Tabela 5.26. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih nakon ispitivanja svih uzoraka hrane za životinje

Metoda	Br. uzoraka	A	R		SE _{alt}	SE _{ref}	RT	FPR
			R+	R-				
Protokol A	100	A+	PA = 52	PD = 0	100 %	100 %	100 %	0.0 %
		A -	ND = 0	NA = 48				
Protokol M	100	A+	PA = 52	PD = 0	100 %	100 %	100 %	0.0 %
		A -	ND = 0	NA = 48				

Skraćenice: Alternativna metoda (A): pozitivna (A+) / negativna (A -); Referentna metoda (R): pozitivna (R+) / negativna (R-); Pozitivno Slaganje (PA); Pozitivna Devijacija (PD); Negativna Devijacija (ND); Negativno Slaganje (NA); Osetljivost alternativne metode (SE_{alt}); Osetljivost referentne metode (SE_{ref}); Relativna tačnost (RT), Lažno pozitivan količnik alternativne metode (FPR).

5.2.1. Ispitivanje veštački kontaminiranih uzoraka hrane za životinje

Za veštačku kontaminaciju 30 uzoraka potpune krmne smeše za ishranu živine upotrebljen je referentni soj *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), a nivo kontaminacije iznosio je 1-10 i 10-100 cfu/25 g uzorka. Neinkulisani uzorci upotrebljeni su kao negativne kontrole. Pre veštačke kontaminacije, isključeno je prisustvo *Salmonella* spp. u uzorcima, testiranjem standardnom SRPS EN ISO 6579-1:2017 i real-time PCR metodom.

Uzorci su ispitani real-time PCR metodama za detekciju *invA* (Protokol A) i *ttr* gena (Protokol M) nakon „Chelex“ ekstrakcije DNK. Rezultati ispitivanja veštački

kontaminiranih uzoraka pokazali su da su primenjeni real-time PCR protokoli osetljivi i mogu detektovati 1-10 cfu u 25 g potpune krmne smeše za ishranu živine. Prisustvo inhibitora PCR nije detektovano ni u jednom uzorku.

Kvalitativan prikaz rezultata i ostvarene C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka hrane za životinje primenom standardne (SRPS EN ISO 6579-1:2017) i dve real-time PCR metode za detekciju *Salmonella* spp. (protokol A, protokol M) nalazi se u tabelama 5.27. i 5.28.

Tabela 5.27. Zbirni prikaz rezultata nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka hrane za životinje

Tip uzorka	Nivo kontaminacije CFU/25 g	Metoda		
		ISO 6579	Protokol A	Protokol M
PKS za živinu	10-100	5/5	5/5	5/5
	1-10	20/20	20/20	20/20
	0	0/5	0/5	0/5

Tabela 5.28. Zbirni prikaz ostvarenih C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka hrane za životinje

Tip uzorka	Nivo kontaminacije CFU/25 g	Metoda	
		Protokol A	Protokol M
PKS za živinu	10-100	17,86	15,21
	1-10	19,14	17,07
	0	Bez C_q	Bez C_q

5.2.2. Ispitivanje prirodno kontaminiranih uzoraka i uzoraka nastalih mešanjem prirodno kontaminiranih sa nekonatminiranim uzorcima hrane za životinje

Primenom dva real time PCR protokola za detekciju *Salmonella* spp. u hrani (protokol A, protokol M) nakon „chelex“ ekstrakcije izvršeno je ispitivanje 9 prirodno kontaminiranih uzoraka potpune krmne smeše za živinu (Oznaka uzoraka: od 1 do 9). Dodatno, izvršeno je i ispitivanje 18 uzoraka kontaminiranih mešanjem 9 uzoraka potpune krmne smeše za živinu u kojima je predhodno detektovana *Salmonella* spp., sa uzorcima u kojima

Salmonella spp. nije detektovana, u odnosu 50:50 (Oznaka uzoraka: 1/2, 2/2, 3/2, 4/2, 5/2, 6/2, 7/2, 8/2, 9/2) i 30:70 (Oznaka uzoraka: 1/3, 2/3, 3/3, 4/3, 5/3, 6/3, 7/3, 8/3, 9/3). Zbirni prikaz ostvarenih C_q vrednosti nakon ispitivanja uzoraka hrane za životinje primenom dve real-time PCR metode za detekciju *Salmonella* spp. (protokol A, protokol M) nakon „Chelex“ DNK ekstrakcije nalazi se u tabeli 5.29.

Tabela 5.29. Prikaz C_q vrednosti - prirodno kontaminirani i nekontaminirani pomešani sa kontaminiranim uzorcima

Redni broj uzorka	ISO 6579	Protokol A	Protokol M
1	+	30,12	27,52
2	+	24,58	21,96
3	+	27,86	24,45
4	+	31,75	29,28
5	+	18,29	17,15
6	+	29,17	28,29
7	+	23,52	22,06
8	+	28,97	27,02
9	+	27,74	26,3
1/2	+	30,28	28,54
2/2	+	25,32	24,13
3/2	+	27,35	25,85
4/2	+	28,77	27,45
5/2	+	27,37	26,04
6/2	+	27,31	25,45
7/2	+	24,25	23,5
8/2	+	22,6	21,13
9/2	+	27,59	26,69
1/3	+	36,77	34,49
2/3	+	27,32	25,75
3/3	+	33,42	31,04
4/3	+	30,57	28,59
5/3	+	27,94	27,02
6/3	+	34,81	32,68
7/3	+	25,42	23,87
8/3	+	31,02	28,81
9/3	+	23,06	22,76
Prosečna C_q vrednost		27,90	26,22

5.3. Razvoj, optimizacija i „in house” validacija nove real-time PCR metode (protokol MD) za detekciju *invA* gena *Salmonella* spp.

5.3.1. Određivanje granice detekcije (LOD) i efikasnosti amplifikacije PCR protokola

Određivanje granice detekcije (LOD) i efikasnosti reakcije izvršeno je primenom dva modela PCR uređaja (AriaMx Real-Time PCR, Stratagene Mx3005P PCR).

Granica detekcije određena je ispitivanjem serije decimalnih razređenja genomske DNK *S. Enteritidis* (ATCC 13076) (10^0 - 10^6 kopija/qPCR). Ispitivanja su ponovljena 20 puta za svaki stepen razređenja. Stepen razređenja sa najmanjim brojem kopija po reakciji koji je dao 19 pozitivnih rezultata smatra se limitom detekcije metode za nivo poverenja od 95% (LOD_{95%}). Na ovaj način određen limit detekcije real-time PCR metode (protokol MD) iznosi 10 kopija/PCR.

Efikasnost amplifikacije izračunata je pomoću softvera PCR uređaja prema formuli $e = 10^{-1/s} - 1$ (gde je „s“ – „slope“ standardne krive). Prosečna efikasnost PCR izračunata iz „slope“ standardne krive dobijene ispitivanjem serije razređenja genomske DNK *S. Enteritidis*, iznosila je 96,86%. Prosečna vrednost koeficijenta korelacije (R^2) iznosila je 0,998, a „slope“ 3,4.

5.3.2. Ispitivanje robustnosti (*Robustness*) real-time PCR metode (protokol MD)

Robustnost metode proverena je testiranjem 50 kopija DNK *S. Enteritidis* / reakciji, prema modifikacijama standardne procedure prikazanim u Tabeli 5.30. Metoda je uspešno primenjena prilikom ispitivanja uzorka u tri ponavljanja za svaku modifikaciju.

Tabela 5.30. Modifikacije standardne procedure

Faktor	Procedura	Modifikovana procedura 1	Modifikovana procedura 2	Modifikovana procedura 3	Modifikovana procedura 4
PCR uređaj	AriaMx Real-Time	Stratagene Mx3005P	AriaMx Real-Time	AriaMx Real-Time	Stratagene Mx3005P
Master miks	Agilent Technologies ¹	Applied Biosystems ²	Agilent Technologies ¹	Applied Biosystems ²	Agilent Technologies ¹
Zapremina PCR miksa (25 µl)	23 + 2 µl DNK	20 + 5 µl DNK	20 + 5 µl DNK	23 + 2 µl DNK	20 + 2 µl DNK

¹ Brilliant III Ultra-Fast qPCR Master Mix (Agilent Technologies, SAD)

² Path-ID™ qPCR Master Mix, Applied Biosystems.

5.3.3. Teoretsko ispitivanje specifičnosti (“*in-silico*” testiranje) real-time PCR metode (protokol MD)

Koristeći „Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)“, ispitivanjem prajmera i probe u NCBI bazi nukleotida potvrđena je specifičnost u odnosu na ostale publikovane sekvence ciljnog gena i odsustvo homologije sa sekvencama drugih mikroorganizama.

5.3.4. Analitička specifičnosti real-time PCR metode (protokol MD)

Analitička specifičnosti dizajniranih prajmera i probe izvršena je ispitivanjem DNK 76 izolata *Salmonella* spp. (*inclusivity*) i DNK 45 izolata pripadnika drugih rodova (*exclusivity*) uključujući i pripadnike familije *Enterobacteriaceae*, kao što su *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* i *Citrobacter youngae*.

Metoda je uspešno detektovala sve izolate *Salmonella* spp., sa druge strane nije registrovana amplifikacija DNK izolata koji nisu pripadnici roda *Salmonella*. Rezultati *inclusivity* i *exclusivity* studije prikazani su u tabelama 5.31. i 5.32.

Tabela 5.31. Ispitivanje *inclusivity* real-time PCR metode - protokol MD

Serotip	Grupa/antigena formula	Broj ispitanih sojeva	Rezultat	
			Broj pozitivnih	Broj negativnih
<i>Salmonella</i> Enteritidis	O:9 (D1)	10	10	0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	O:4 (B)	10	10	0
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	O:9 (D1)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	O:4 (B)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Kentucky	O:8 (C2-C3)	10	10	0
<i>Salmonella</i> Montevideo	O:54	1	1	0
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	O:7 (C1)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Hadar	O:8 (C2-C3)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Galinarum / Pulorum	O:9 (D1)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Kiel	O:2 (A)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Nitra	O:2 (A)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Eastbourne	O:9 (D1)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Finkenwerder	O:6,14 (H)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Glostrup	O:8 (C2-C3)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Ahuza	O:43 (U)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Bispebjerg	O:4 (B)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Potsdam	O:7 (C1)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Wagania	O:4 (B)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Brandenburg	O:4 (B)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Bracknell	O:13 (G)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Senftenberg	O:1,3,19 (E4)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Agona	O:4 (B)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Braenderup	O:7 (C1)	1	1	0
<i>Salmonella</i> Infantis	O:7 (C1)	5	5	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 50 : z ₁₀ : -	1	1	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 17 : z ₁₀ : e,n,x,z ₁₅	2	2	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 17 : l,v : z	1	1	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 50 : i : z	1	1	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb (6)14 : z ₁₀ : z	1	1	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizone</i>	IIIb 14 : l,v : z ₅₃	1	1	0
<i>Salmonella</i> spp.	-	14	14	0
UKUPNO	-	76	76	0

Tabela 5.32. Ispitivanje *exclusivity* real-time PCR metode - protokol MD

Mikroorganizam	Rezultat	Mikroorganizam	Rezultat
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Bez C _q	<i>Leptospira interrogans ser. pomona</i>	Bez C _q
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Bez C _q	<i>L. interrogans ser. icterohaemorrhagiae</i>	Bez C _q
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	Bez C _q	<i>L. interrogans ser. Bataviae</i>	Bez C _q
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (ATCC 7953)	Bez C _q	<i>L. interrogans ser. Bratislava</i>	Bez C _q
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	Bez C _q	<i>L. interrogans ser. Canicola</i>	Bez C _q
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	Bez C _q	<i>L. kirchneri ser. grippotyposa type Moskva</i>	Bez C _q
<i>Sarcina lutea</i> (ATCC 9341)	Bez C _q	<i>L. borgpeterseni ser. Serjoe</i>	Bez C _q
<i>Clostridium perfringens</i> (ATCC 13124)	Bez C _q	<i>L. borgpeterseni ser. Hardjo type bovis</i>	Bez C _q
<i>Escherichia coli</i> (NCTC 13216)	Bez C _q	<i>L. borgpeterseni ser. Perepelitsin</i>	Bez C _q
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	Bez C _q	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bez C _q
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932)	Bez C _q	<i>Staphylococcus intermedius</i>	Bez C _q
<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)	Bez C _q	<i>Bacillus cereus</i>	Bez C _q
<i>Rodococcus equi</i> (ATCC 6939)	Bez C _q	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Bez C _q
<i>Listeria ivanovii</i> (ATCC 19119)	Bez C _q	<i>Mycoplasma synoviae</i>	Bez C _q
<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 43864)	Bez C _q	<i>Brucella suis</i>	Bez C _q
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	Bez C _q	<i>Brucella abortus</i>	Bez C _q
<i>B. subtilis subsp. spizizeni</i> (ATCC 6633)	Bez C _q	<i>Brucella melitensis</i>	Bez C _q
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	Bez C _q	<i>Coxiella burnetii</i>	Bez C _q
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)	Bez C _q	<i>Chlamydophila psittaci</i>	Bez C _q
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404)	Bez C _q	<i>Chlamydophila abortus</i>	Bez C _q
<i>Wallemia sebi</i> (ATCC 42694)	Bez C _q	<i>Citrobacter youngae</i>	Bez C _q
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Bez C _q	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Bez C _q
<i>S. saprophyticus</i> (ATCC 15305)	Bez C _q	-	-

5.3.5. Ispitivanje veštački kontaminiranih uzoraka

Nakon optimizacije real-time PCR metode (Protokol MD) izvršeno je ispitivanje 150 veštački kontaminiranih uzoraka uz paralelno ispitivanje primenom standardne metode (SRPS EN ISO 6579-1:2017). Ekstrakcija DNK izvršena je primenom „Chelex“ protokola.

Veštačka kontaminacija uzoraka ćevapa, malina, pasterizovanog mleka i pilećeg mesa izvršena je upotrebom referentnog soja *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), a uzorci kožica sa vrata živine kontaminirani su *S. Typhimurium* (ATCC 14028). Nivo kontaminacije iznosio je 1-10 (20 uzoraka) i 10-100 cfu/25 g uzorka (5 uzoraka). Neinkulisani uzorci upotrebljeni su kao negativne kontrole (5 uzoraka). Pre veštačke kontaminacije, isključeno je prisustvo *Salmonella* spp. u uzorcima, testiranjem standardnom SRPS EN ISO 6579-1:2017 i real-time PCR metodom.

Rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pokazali su da je primenjena real-time PCR metoda (Protokol MD) osetljiva i može detektovati 1-10 cfu u 25 g pilećeg mesa, ćevapa, malina, pasterizovanog mleka i kožica sa vrata živine.

Kvalitativno izraženi rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka primenom standardne (SRPS EN ISO 6579-1:2017) i real-time PCR metode za detekciju *Salmonella* spp. u hrani (protokol MD) nakon „Chelex“ ekstrakcije DNK prikazani su u tabeli 5.33.

Tabela 5.33. Ispitivanje veštački kontaminiranih uzoraka primenom real-time PCR metode (Protokol MD)

Tip uzorka	Nivo kontaminacije CFU/25 g	Broj pozitivnih/ broj ispitanih uzoraka	
		SRPS EN ISO 6579-1:2017	Protokol MD
Ćevapi	10-100	5/5	5/5
	1-10	20/20	20/20
	0	0/5	0/5
Maline	10-100	5/5	5/5
	1-10	19/20	19/20 ¹
	0	0/5	0/5
Mleko	10-100	5/5	5/5
	1-10	19/20	20/20 ²
	0	0/5	0/5
Pileće meso	10-100	5/5	5/5
	1-10	20/20	20/20
	0	0/5	0/5
Pileće kožice sa vrata	10-100	5/5	5/5
	1-10	20/20	20/20
	0	0/5	0/5

¹ Uzorak malina negativan posle ispitivanja standardnom metodom ostvario je C_q vrednost 40,80 (negativno slaganje).

² Uzorak mleka negativan posle ispitivanja standardnom metodom ostvario je C_q vrednost 37,48 (pozitivna devijacija).

5.3.6. Ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pilećeg mesa - poredenje protokola A, M i MD

Trideset veštački kontaminiranih uzoraka ispitano je primenom tri real-time PCR metode (Protokol A, protokol M i protokol MD) za detekciju *Salmonella* spp.. Ekstrakcija DNK izvršena je primenom „Chelex“ protokola.

Veštačka kontaminacija uzoraka pilećeg mesa izvršena je upotrebom referentnog soja *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076). Nivo kontaminacije iznosio je 1-10 (20 uzoraka) i 10-100 cfu/25 g uzorka (5 uzoraka). Neinkulisani uzorci upotrebljeni su kao negativne kontrole (5 uzoraka).

Rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pokazali su da je primenjena real-time PCR metoda (Protokol MD) osetljiva i može detektovati 1-10 cfu u 25 g pilećeg mesa. Najniže C_q vrednosti ostvarene su primenom MD protokola.

Kvalitativno izraženi rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka primenom tri real-time PCR metode (Protokol A, protokol M i protokol MD) nakon „Chelex“ ekstrakcije DNK i prikaz ostvarenih C_q vrednosti nalaze se u tabeli 5.34.

Tabela 5.34. Kvalitativan prikaz rezultata nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pilećeg mesa

Tip uzorka	Nivo kontaminacije CFU/25 g	Metoda (broj pozitivnih / broj ispitanih)			
		ISO 6579	Protokol M	Protokol A	Protokol MD
Pileće meso	10-100	5/5	5/5	5/5	5/5
	1-10	20/20	20/20	20/20	20/20
	0	0/5	0/5	0/5	0/5

Tabela 5.35. Prikaz ostvarenih C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pilećeg mesa - poređenje protokola A, M i MD

Oznaka	Nivo kontaminacije cfu/25 g	Protokol M	Protokol A	Protokol MD
1 E ₁₀	1-10	19,76	21,72	18,61
2 E ₁₀		18,89	21,13	18,22
3 E ₁₀		18,49	20,85	17,81
4 E ₁₀		18,61	20,85	17,77
5 E ₁₀		18,40	20,90	17,75
6 E ₁₀		18,93	21,56	18,35
7 E ₁₀		18,91	21,00	18,27
8 E ₁₀		19,87	22,25	18,99
9 E ₁₀		19,04	21,05	18,02
10 E ₁₀		19,33	21,76	18,53
11 E ₁₀		18,28	20,33	17,50
12 E ₁₀		14,72	16,98	13,74
13 E ₁₀		18,47	20,83	17,61
14 E ₁₀		17,43	19,38	16,41
15 E ₁₀		18,12	20,28	17,38
16 E ₁₀		18,90	21,46	18,08
17 E ₁₀		17,33	19,00	16,36
18 E ₁₀		21,20	24,25	20,77
19 E ₁₀		19,41	21,73	18,80
20 E ₁₀		19,52	21,97	18,67
1 E ₁₀₀	10-100	17,38	19,21	16,34
2 E ₁₀₀		16,72	18,50	15,64
3 E ₁₀₀		17,52	19,48	16,93
4 E ₁₀₀		16,60	18,34	16,44
5 E ₁₀₀		17,74	19,43	17,49
Prosečna C_q vrednost	1-10	18,68	20,96	17,88
	1-100	17,19	18,99	16,57

Utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0.05$) za prosečne C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka za nivo kontaminacije 1-10 cfu/25 g između protokola M i A i protokola A i MD, dok razlika između protokola M i MD nije utvrđena ($p > 0.05$). Prosečne C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka za nivo kontaminacije 10-100 cfu/25 g između protokola M i A i protokola A i MD bile su različite ($p < 0.05$), dok razlika između protokola M i MD nije utvrđena ($p > 0.05$) (Tabela 5.35.).

5.3.7. Učešće u ispitivanjima osposobljenosti („Proficiency Testing Scheme“)

Nakon optimizacije protokola za detekciju genoma *Salmonella* real-time PCR metodom, izvršena je i provera kroz učešća u ispitivanjima osposobljenosti („Proficiency Testing Scheme“), organizovanih od međunarodno priznatih i akreditovanih ustanova za tu delatnost:

a. LGC standards (Velika Britanija)

Prilikom „ispitivanja osposobljenosti“ ispitan je jedan uzorak (25 g ovsene kaše).

Podaci o ispitanom uzorku i ostvareni rezultati prikazani su u tabeli 5.36.

Tabela 5.36. „Proficiency testing“ - utvrđivanje prisustva *Salmonella* spp. u hrani primenom tri real-time PCR metode

Vrsta uzorka	Serotip	Nivo kontaminacije	Rezultat		
			Protokol A	Protokol M	Protokol MD
Ovsena kaša	<i>Salmonella</i> Bracknell	7 cfu/g	Detektovan genom	Detektovan genom	Detektovan genom

b. APHA Scientific – VETQAS (Velika Britanija)

Prilikom „ispitivanja osposobljenosti“ ispitano je pet uzoraka. U laboratoriju je dostavljeno 0,1 ml liofilizovanog uzorka, upakovanog u staklenu bočicu. Uzorci su sadržali različite *Salmonella* serotipove, uključujući referentne sojeve, ali i sojeve često izolovane u uzorcima poreklom od živine. Uzorci su sadržali čiste kulture *Salmonella* i/ili

druge mikroorganizme. Podaci o ispitanim uzorcima i ostvareni rezultati prikazani su u tabeli 5.37.

Tabela 5.37. „Proficiency testing“ - utvrđivanje prisustva *Salmonella* spp. - Protokol MD

Tip uzorka (oznaka)	Mikroorganizam	Nivo kontaminacije (cfu/ bočici)	Protokol MD (genom detektovan: DA / NE)
Liofilizovan (18/1383)	<i>S. Typhimurium (+E. coli)</i>	~ 50,000	DA ($C_q = 20,95$)
Liofilizovan (18/1384)	<i>Citrobacter youngae</i>	Nepoznato	NE (Bez C_q)
Liofilizovan (18/1385)	<i>S. Typhimurium</i>	~ 500	DA ($C_q = 18,96$)
Liofilizovan (18/1386)	<i>S. Senftenberg</i>	< 10	DA ($C_q = 36,42$)
Liofilizovan (18/1387)	<i>S. Agona</i>	~ 22 cfu	DA ($C_q = 18,33$)

5.4. Real-time PCR protokol za detekciju *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*

Veštačka kontaminacija 30 uzoraka pilećeg mesa i 30 kožica sa vrata živine izvršena je upotrebom referentnog soja *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) i *S. Typhimurium* (ATCC 14028). Kontaminacija je izvršena odvojeno, prema tipu uzorka i upotrebljenom serotipu (Tabela 5.38.).

Ukupno 120 veštački kontaminiranih uzoraka ispitano je primenom multiplex real-time PCR protokola za detekciju *safA* gena *S. Enteritidis* i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium*, pri čemu su kao template u jednoj reakciji istovremeno bili prisutni DNK oba serotipa i DNK interne amplifikacione kontrole (IAC). Primenjene su dve procedure ekstrakcije – “Chelex” i “PBS”. Paralelno je izvršeno i ispitivanje standardnom metodom SRPS EN ISO 6579-1:2017.

Rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pokazali su da je primenjena real-time PCR metoda za detekciju *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* osetljiva i može detektovati ciljani serotip u 25 g piletine i pilećih kožica pri nivou kontaminacije 1-10 cfu. Istovetni rezultati ostvareni su nakon obe procedure ekstrakcije (Tabela 5.38.)¹.

Tabela 5.38. Kvalitativan prikaz rezultata nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka

Tip uzorka	Serotip	Nivo kontaminacije CFU/25 g	Metoda (broj pozitivnih / broj ispitanih)	
			ISO 6579	Real-time PCR ¹
Pileće meso	<i>S. Enteritidis</i>	10-100	5/5	5/5
		1-10	20/20	20/20
		0	0/5	0/5
Kožice sa vrata živine	<i>S. Enteritidis</i>	10-100	5/5	5/5
		1-10	20/20	20/20
		0	0/5	0/5
Pileće meso	<i>S. Typhimurium</i>	10-100	5/5	5/5
		1-10	20/20	20/20
		0	0/5	0/5
Kožice sa vrata živine	<i>S. Typhimurium</i>	10-100	5/5	5/5
		1-10	20/20	20/20
		0	0/5	0/5

Ostvarene C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pilećeg mesa i kožica sa vrata živine primenom real-time PCR metode za detekciju *Salmonella* Enteritidis (*safA*) i *Salmonella* Typhimurium (*fliA*), nakon različitih načina ekstrakcije DNK (Chelex, PBS) prikazane su u Tabelama 5.39., 5.40., 5.41. i 5.42. Prosečna C_q vrednost svih uzoraka ostvarena nakon „Chelex“ ekstrakcije (21,29) u poređenju sa „PBS“ ekstrakcijom (22,97) bila je niža za 1,68.

Tabela 5.39. Prikaz ostvarenih C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka **pilećeg mesa** primenom real-time PCR metode za detekciju *Salmonella* **Enteritidis** (*safA*), nakon različitih načina ekstrakcije DNK (Chelex, PBS).

Nivo kontaminacije cfu/25 g	ISO 6579	<i>Saf A</i> Chelex	<i>Saf A</i> PBS
1-10	+	25,06	23,48
	+	23,53	23,81
	+	21,56	23,89
	+	21,23	22,78
	+	21,21	26,01
	+	21,74	26,48
	+	21,85	23,63
	+	23,48	23,57
	+	27,03	25,53
	+	24,79	23,66
	+	20,82	23,69
	+	17,29	21,01
	+	21,06	27,35
	+	19,92	25,01
	+	20,54	23,08
	+	22,16	24,26
	+	24,33	22,77
	+	26,95	25,78
+	22,12	25,09	
+	22,23	25,31	
	Prosečna C_q	22,45	24,31
10-100	+	21,05	22,16
	+	19,54	22,24
	+	20,29	23,87
	+	19,11	24,19
	+	20,25	22,87
		Prosečna C_q	20,05

Tabela 5.40. Prikaz ostvarenih C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka **pilećeg mesa** primenom real-time PCR metode za detekciju *Salmonella* **Typhimurium** (*fliA-IS200*), nakon različitih načina ekstrakcije DNK (Chelex, PBS)

Nivo kontaminacije cfu/25 g	ISO 6579	<i>FliA-IS200</i> Chelex	<i>FliA-IS200</i> PBS
1-10	+	20,38	22,85
	+	20,26	22,99
	+	20,39	22,84
	+	21,66	23,24
	+	19,01	21,21
	+	19,47	21,48
	+	19,71	22,04
	+	22,19	23,81
	+	20,29	21,12
	+	22,10	24,44
	+	19,98	21,04
	+	19,66	22,52
	+	19,10	21,50
	+	19,43	22,98
	+	22,41	25,15
	+	22,47	25,07
	+	21,45	23,75
+	21,67	24,11	
+	20,06	23,92	
+	21,68	23,59	
	Prosečna C_q	20,67	22,98
10-100	+	18,81	22,35
	+	20,94	25,56
	+	19,00	24,06
	+	19,68	21,30
	+	18,53	22,07
	Prosečna C_q	19,39	23,07

Tabela 5.41. Prikaz ostvarenih C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka **pilećih kožica** primenom real-time PCR metode za detekciju *Salmonella Enteritidis* (*safA*), nakon različitih načina ekstrakcije DNK (Chelex, PBS)

Nivo kontaminacije cfu/25 g	ISO 6579	<i>SafA</i> Chelex	<i>SafA</i> PBS
1-10	+	23,87	24,1
	+	23,26	23,95
	+	23,23	23,47
	+	22,38	22,65
	+	22,93	23,42
	+	21,97	22,04
	+	22,74	23,36
	+	25,38	26,13
	+	23,72	23,84
	+	24,20	24,85
	+	22,38	22,87
	+	22,61	23,40
	+	20,51	21,02
	+	24,95	25,33
	+	23,73	23,40
	+	23,97	23,77
	+	23,86	23,70
	+	25,49	26,96
+	24,75	24,80	
+	23,26	24,73	
	Prosečna C_q	23,46	23,89
10-100	+	19,39	20,55
	+	21,43	24,71
	+	22,54	24,01
	+	22,58	23,96
	+	21,99	22,50
		Prosečna C_q	21,59

Tabela 5.42. Prikaz ostvarenih C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pilećih kožica primenom real-time PCR metode za detekciju *Salmonella Typhimurium* (*fliA-IS200*), nakon različitih načina ekstrakcije DNK (Chelex, PBS)

Nivo kontaminacije cfu/25 g	ISO 6579	<i>FliA-IS200</i> Chelex	<i>FliA-IS200</i> PBS
1-10	+	20,59	21,29
	+	21,27	22,05
	+	21,50	23,51
	+	21,04	23,00
	+	18,39	22,14
	+	25,27	23,24
	+	21,53	22,47
	+	20,75	22,56
	+	21,23	22,99
	+	20,76	21,91
	+	19,40	20,65
	+	19,78	19,81
	+	20,66	21,52
	+	19,17	21,13
	+	19,21	20,44
	+	19,11	19,79
	+	18,35	21,31
+	19,83	22,41	
+	18,83	21,46	
+	20,71	21,47	
	Prosečna C_q	20,37	21,76
10-100	+	17,78	18,48
	+	17,62	19,36
	+	15,57	16,63
	+	17,11	19,45
	+	17,22	18,39
	Prosečna C_q	17,06	18,46

5.5. Karakterizacija *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* izolovanih iz lanca hrane

Tokom izrade ove doktorske disertacije izvršena je karakterizacija 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i 60 izolata *S. Typhimurium* koja je obuhvatila:

1. Molekularnu karakterizaciju:
 - a. Real-time PCR detekcija *safA* gena *S. Enteritidis*
 - b. Real-time PCR detekcija *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium*
 - c. Gel elektroforezu pulsirajućem polju (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)
2. Ispitivanje osetljivosti prema antimikrobnim lekovima (Disk - difuziona metoda);
3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (E test).

Od 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i isto toliko izolata *S. Typhimurium* 24 je izolovano iz hrane i hrane za životinje, 24 iz fecesa živine i 12 iz kliničkog materijala obolelih ljudi.

5.5.1. Tipizacija primenom real-time PCR protokola za detekciju *safA* gena *S. Enteritidis* i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium*

Tipizacija 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i 60 izolata *S. Typhimurium* izvršena je primenom duplex real-time PCR protokola za detekciju *safA* gena *S. Enteritidis* i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium*, pri čemu je kao template u jednoj reakciji dodata samo DNK serotipa čija je tipizacija vršena. Ostvareni rezultati prikazani su u tabelama 5.43 i 5.44.

Tabela 5.43. Real-time PCR tipizacija 60 izolata *S. Enteritidis*

Broj izolata	Poreklo izolata	Serotipizacija	Real-time PCR tipizacija (Ispitano/pozitivno)	
			<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
12	Humani	<i>S. Enteritidis</i>	Pozitivan (12/12)	Negativan (12/12)
24	Feces živine	<i>S. Enteritidis</i>	Pozitivan (24/24)	Negativan (24/24)
24	Hrana i hrana za životinje	<i>S. Enteritidis</i>	Pozitivan (24/24)	Negativan (24/24)

Tabela 5.44. Real-time PCR tipizacija 60 izolata *S. Typhimurium*

Broj izolata	Poreklo izolata	Serotipizacija	Real-time PCR tipizacija (Ispitano/pozitivno)	
			<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>
12	Humani	<i>S. Typhimurium</i>	Pozitivan (12/12)	Negativan (12/12)
24	Feces živine	<i>S. Typhimurium</i>	Pozitivan (24/24)	Negativan (24/24)
24	Hrana i hrana za životinje	<i>S. Typhimurium</i>	Pozitivan (24/24)	Negativan (24/24)

5.5.2. Genotipizacija *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* izolovanih iz lanca hrane (Gel elektroforeza pulsirajućem polju - Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)

Genotipizacijom je obuhvaćeno 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i 60 izolata *S. Typhimurium*. Od 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i isto toliko izolata *S. Typhimurium* 24 je izolovano iz hrane i hrane za životinje, 24 iz fecesa živine i 12 iz kliničkog materijala obolelih ljudi.

Analizom podataka pomoću FPQest softvera dobijeni su PFGE profili (genotipovi). Profilima su dodeljene oznake koje se sastoje od prvog slova vrste bakterije, tri slova serotipa, dva slova korišćenog restriktivnog enzima i četvorocifrenog broja počev od

0001 (Na primer: “STYPXB0001” - genotip 1 *S. Typhimurium* dobijen primenom restriktivnog enzima *XbaI* ili “SENTXB0002” - genotip 2 *S. Enteritidis* dobijen primenom restriktivnog enzima *XbaI*).

5.5.2.1. Genotipizacija *Salmonella* Enteritidis izolovanih iz lanca hrane (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)

Ispitivanjem genetske sličnosti 60 izolata *S. Enteritidis*, 12 poreklom od ljudi, 24 poreklom iz hrane i 24 poreklom iz fecesa živine, upotrebom enzima *XbaI*, utvrđeno je 20 različitih PFGE profila - genotipova. Unutar izolata koji pripadaju istom profilu genetska sličnost je iznosila 100% dok je sličnost između različitih genotipova iznosila od 78% do 97%.

Najbrojnija geno grupa ili genotip, sa 100% identičnim PFGE profilom, je grupa označena kao SENTXB0001 sa ukupno 22 izolata (1, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 26, 29, 31, 41, 43) od kojih je 7 izolata bilo poreklom od ljudi, 13 izolata poreklom iz hrane i hrane za životinje, a dva izolata poreklom iz fecesa živine. Dodatna diskriminacija ovih genotipova vršena je prema osetljivosti na antimikrobne lekove pa se unutar ovog genotipa dodatno mogu razlikovati izolat 17, koji ima antimikrobni profil AMP, TE; zatim izolat 31 koji ima antimikrobni profil AMP i izolat 4 sa antimikrobnim profilom PEF.

U drugi po veličini genotip, SENTXB0002, svrstano je 8 izolata (11, 24, 37, 42, 44, 52, 53, 55), jedan poreklom od ljudi, jedan poreklom iz hrane za životinje i šest poreklom iz fecesa živine. Dodatnom diskriminacijom ovog genotipa pomoću profila antimikrobne rezistencije, od ostalih izolata se mogu razlikovati izolat 53 koji ima antimikrobni profil PEF i izolat 55 koji ima antimikrobni profil AMP, PEF, dok ostali izolati nisu pokazali antimikrobnu rezistenciju prema korišćenim antibioticima.

U genotip SENTXB0003 svrstana su 4 izolata (28, 32, 51, 54), dva poreklom iz hrane i dva poreklom iz fecesa živine. Dodatnom diskriminacijom ovog genotipa prema osetljivosti na antimikrobne lekove mogu se razlikovati izolati 32 i 54, koji pokazuju rezistenciju prema PEF, dok izolati 28 i 51 nisu rezistentni prema ovom antibiotiku.

U genotip SENTXB0004 svrstana su 3 izolata, 2 poreklom iz hrane i hrane za životinje (22, 34) i jedan poreklom iz fecesa živine (40). Dodatna diskriminacija ovog genotipa

prema osjetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB0005 svrstana su 3 izolata (45, 48, 56), poreklom iz fecesa živine. Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osjetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB0006 svrstana su 3 izolata (46, 47, 57), poreklom iz fecesa živine. Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osjetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB0007 svrstana su 2 izolata (20, 30), poreklom iz hrane. Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osjetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB0008 svrstana su 2 izolata (50,59), poreklom iz fecesa živine. Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osjetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB0009 svrstana su dva izolata, jedan poreklom od ljudi (7) i jedan poreklom iz hrane (33). Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osjetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB00010 svrstan je jedan izolat (2), poreklom od ljudi. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB00011 svrstan je jedan izolat (6), poreklom od ljudi. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB00012 svrstan je jedan izolat (8), poreklom od ljudi. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB00013 svrstan je jedan izolat (49), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB00014 svrstan je jedan izolat (58), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB0015 svrstan je jedan izolat (60), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB0016 svrstan je jedan izolat (36), poreklom iz hrane. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB0017 svrstan je jedan izolat (38), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip SENTXB0018 svrstan je jedan izolat (39), poreklom iz fecesa živine.

U genotip SENTXB0019 svrstan je jedan izolat (27), poreklom iz hrane. Ovaj izolat ima antimikrobni profil PEF.

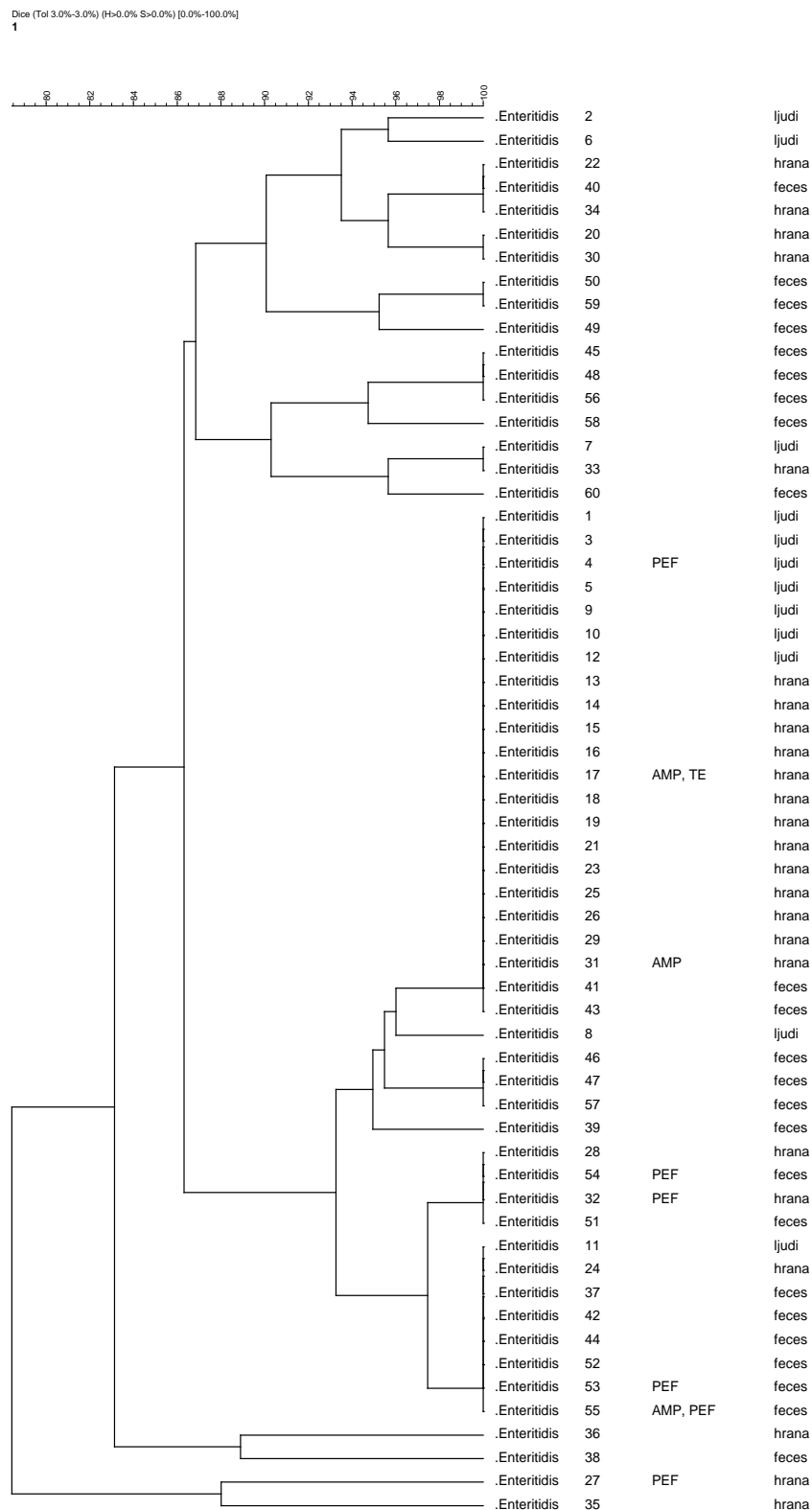
U genotip SENTXB0020 svrstan je jedan izolat (35), poreklom iz hrane. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

Zajednički PFGE profili *S. Enteritidis* za izolate poreklom iz fecesa živine, hrane i hrane za životinje i obolelih ljudi, broj PFGE profila i procentualno izražena pripadnost izolata odgovarajućem PFGE profilu (ukupno i prema poreklu) prikazani su u Tabela 5.45.

Tabela 5.45. PFGE profili *S. Enteritidis* zajednički za izolate poreklom iz fecesa živine, hrane i hrane za životinje i obolelih ljudi

PFGE profil	Oznaka izolata (%)	Poreklo izolata – oznaka (%) ¹		
		Feces živine (n=24)	Hrana i hrana za životinje (n=24)	Oboleli ljudi (n=12)
SENTXB0001	1, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 26, 29, 31, 41, 43 (36,67)	41, 43 (8,33)	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 26, 29, 31 (54,17)	1, 3, 4, 5, 9, 10, 12 (58,33)
SENTXB0002	11, 24, 37, 42, 44, 52, 53, 55 (13,33)	37, 42, 44, 52, 53, 55 (25)	24 (4,17)	11 (8,33)
SENTXB0003	28, 32, 51, 54 (6,67)	51, 54 (8,33)	28, 32 (8,33)	0
SENTXB0004	22, 34, 40 (5)	40 (4,17)	22, 34 (8,33)	0
SENTXB0005	45, 48, 56 (5)	45, 48, 56 (12,5)	0	0
SENTXB0006	46, 47, 57 (5)	46, 47, 57 (12,5)	0	0
SENTXB0007	20, 30 (3,33)	0	20, 30 (8,33)	0
SENTXB0008	50, 59 (3,33)	50, 59 (8,33)	0	0
SENTXB0009	7, 33 (3,33)	0	33 (4,17)	7 (8,33)
SENTXB0010	2 (1,67)	0	0	2 (8,33)
SENTXB0011	6 (1,67)	0	0	6 (8,33)
SENTXB0012	8 (1,67)	0	0	8 (8,33)
SENTXB0013	49 (1,67)	49 (4,17)	0	0
SENTXB0014	58 (1,67)	58 (4,17)	0	0
SENTXB0015	60 (1,67)	60 (4,17)	0	0
SENTXB0016	36 (1,67)	0	36 (4,17)	0
SENTXB0017	38 (1,67)	38 (4,17)	0	0
SENTXB0018	39 (1,67)	39 (4,17)	0	0
SENTXB0019	27 (1,67)	0	27 (4,17)	0
SENTXB0020	35 (1,67)	0	35 (4,17)	0
Broj PFGE profila	20	12	9	6

¹ Procenat predstavlja odnos između broja izolata koji pripadaju odgovarajućem PFGE profilu i ukupnog broja ispitanih izolata (prema poreklu). Na primer, 13 izolata iz hrane i hrane za životinje od ukupno 24 ispitana pripada SENTXB0001 PFGE profilu, što iznosi 54,17%.



Slika 5.1. Dendrogram elektroforetske sheme dobijen enzimom *Xba*I – genom 60 izolata *S. Enteritidis* iz FPQuest programa koji pokazuje koeficijent sličnosti između ispitivanih izolata, uz prikaz izolata rezistentnih na antimikrobne lekove iz primenjene palete - ampicilin (AMP), pefloksacin (PEF), tetraciklin (TE).

5.5.2.2. Genotipizacija *Salmonella* Typhimurium izolovanih iz lanca hrane (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)

Ispitivanjem genetske sličnosti 60 izolata *S. Typhimurium*, 12 poreklom od ljudi, 24 poreklom iz hrane i 24 poreklom iz fecesa živine, upotrebom enzima *XbaI*, utvrđen je 21 različita PFGE profila - genotipa. Unutar izolata koji pripadaju istom profilu genetska sličnost je iznosila 100% dok je sličnost između različitih genotipova iznosila od 77% do 98%.

Najbrojnija geno grupa ili genotip, sa 100% identičnim PFGE profilom, je grupa označena kao STYPXB0001 sa ukupno 21 izolata (73, 74, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 100, 104, 107, 117) od kojih je 17 izolata bilo poreklom iz hrane a 4 izolata poreklom iz fecesa živine. Dodatna diskriminacija ovih genotipova vršena je prema osetljivosti na antimikrobne lekove pa se unutar ovog genotipa dodatno mogu razlikovati tri grupe izolata: izolati 73, 74, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 92 i 93 koji imaju antimikrobni profil AMP, C, TE; izolat 104 koji ima antimikrobni profil AMP, TE; izolat 107 koji ima antimikrobni profil AMP, TE, W i izolati 94, 100 i 117 koji nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U drugi po veličini genotip, STYPXB0002, svrstano je 9 izolata (65, 66, 67, 70, 72, 76, 106, 119, 120), pet poreklom od ljudi, jedan poreklom iz hrane za životinje i tri poreklom iz fecesa živine. Dodatna diskriminacija ovih genotipova vršena je prema osetljivosti na antimikrobne lekove pa se unutar ovog genotipa dodatno mogu razlikovati izolati četiri grupe izolata: izolati 65, 66, 67, 70, 72 koji imaju antimikrobni profil AMP,TE,W; izolat 76 sa antimikrobnim profilom AMP, TE; izolat 120 sa antimikrobnim profilom AMP i izolati 106 i 119 koji nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0003 svrstano je 5 izolata, jedan poreklom iz hrane za životinje (77) i 4 poreklom iz fecesa živine (98, 99, 101, 110). Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0004 svrstana su 3 izolata (102, 112, 118), svi poreklom iz fecesa živine. Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0005 svrstana su 2 izolata (78,79), poreklom iz hrane za životinje. Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0006 svrstana su 2 izolata (111, 113), poreklom iz fecesa živine. Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0007 svrstana su 2 izolata (105, 115), poreklom iz fecesa živine. Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0008 svrstana su 2 izolata (62, 68), poreklom od ljudi. Dodatna diskriminacija ovog genotipa prema osetljivosti na antimikrobne lekove nije bila moguća jer izolati nisu rezistentni ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0009 svrstana su 2 izolata (95, 96), poreklom iz hrane. Dodatnom diskriminacijom ovog genotipa prema osetljivosti na antimikrobne lekove utvrđeno je da su oba izolata rezistentna na TE.

U genotip STYPXB0010 svrstan je jedan izolat (64), poreklom od ljudi. Ovaj izolat ima antimikrobni profil AMP, C, PEF, TE.

U genotip STYPXB0011 svrstan je jedan izolat (109), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0012 svrstan je jedan izolat (69), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0013 svrstan je jedan izolat (87), poreklom iz hrane. Ovaj izolat ima antimikrobni profil AMP, C, TE.

U genotip STYPXB0014 svrstan je jedan izolat (63), poreklom od ljudi. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0015 svrstan je jedan izolat (108), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0016 svrstan je jedan izolat (114), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0017 svrstan je jedan izolat (116), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat ima antimikrobni profil AMP.

U genotip STYPXB0018 svrstan je jedan izolat (61), poreklom od ljudi. Ovaj izolat ima antimikrobni profil AMP,TE.

U genotip STYPXB0019 svrstan je jedan izolat (71), poreklom od ljudi. Ovaj izolat ima antimikrobni profil AMP, C, PEF, TE, W.

U genotip STYPXB0020 svrstan je jedan izolat (97), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

U genotip STYPXB0021 svrstan je jedan izolat (103), poreklom iz fecesa živine. Ovaj izolat nije rezistentan ni prema jednom od ispitanih antibiotika.

Zajednički PFGE profili *S. Typhimurium* za izolate poreklom iz fecesa živine, hrane i hrane za životinje i obolelih ljudi, broj PFGE profila i procentualno izražena pripadnost izolata odgovarajućem PFGE profilu (ukupno i prema poreklu) prikazani su u Tabela 5.46.

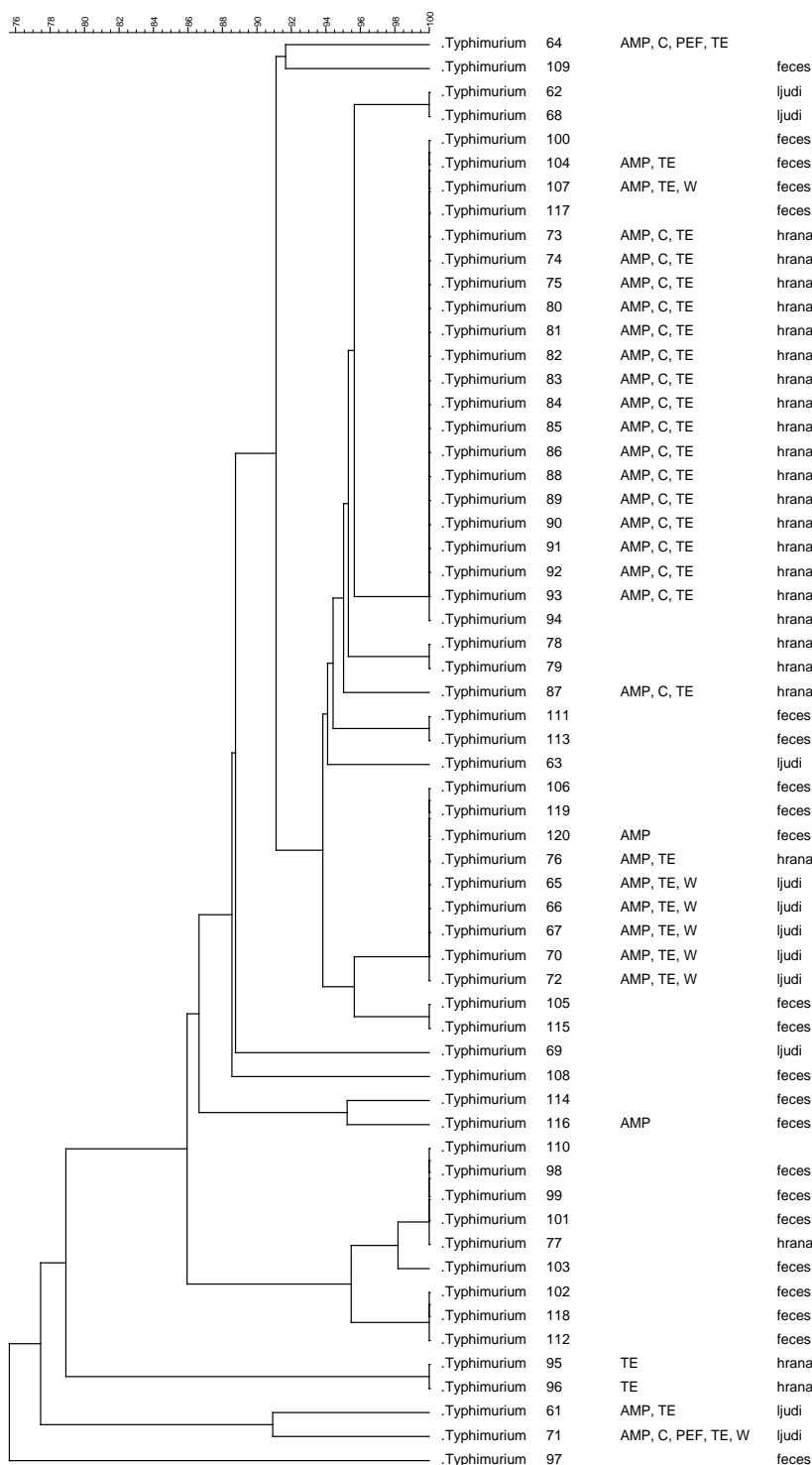
Tabela 5.46. PFGE profili *S.Typhimurium* zajednički za izolate poreklom iz fecesa živine, hrane i hrane za životinje i obolelih ljudi

PFGE profil	Oznaka izolata (%)	Poreklo izolata – oznaka (%) ¹		
		Feces živine (n=24)	Hrana i hrana za životinje (n=24)	Oboleli ljudi (n=12)
STYPXB0001	73, 74, 75, 80, 81, 82, 83, 84,	104, 107, 100, 117	73, 74, 75, 80, 81, 82, 83, 84,	0
	85, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 100, 117 (35)	(16,67)	85, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 (70,83)	
STYPXB0002	65, 66, 67, 70, 72, 76, 106, 119, 120 (15)	106, 119, 120 (12,5)	76 (4,17)	65, 66, 67, 70, 72 (41,67)
STYPXB0003	77, 98, 99, 101, 110 (8,33)	98, 99, 101, 110 (16,67)	77 (4,17)	0
STYPXB0004	102, 112, 118 (5)	102, 112, 118 (12,5)	0	0
STYPXB0005	78, 79 (3,33)	0	78, 79 (8,33)	0
STYPXB0006	111, 113 (3,33)	111, 113 (8,33)	0	0
STYPXB0007	105, 115 (3,33)	105, 115 (8,33)	0	0
STYPXB0008	62, 68 (3,33)	0	0	62, 68 (16,67)
STYPXB0009	95, 96 (3,33)	0	95, 96 (8,33)	0
STYPXB0010	64 (1,67)	0	0	64 (8,33)
STYPXB0011	109 (1,67)	109 (4,17)	0	0
STYPXB0012	69 (1,67)	0	0	69 (8,33)
STYPXB0013	87 (1,67)	0	87 (4,17)	0
STYPXB0014	63 (1,67)	0	0	63 (8,33)
STYPXB0015	108 (1,67)	108 (4,17)	0	0
STYPXB0016	114 (1,67)	114 (4,17)	0	0
STYPXB0017	116 (1,67)	116 (4,17)	0	0
STYPXB0018	61 (1,67)	0	0	61 (8,33)
STYPXB0019	71 (1,67)	0	0	71 (8,33)
STYPXB0020	97 (1,67)	97 (4,17)	0	0
STYPXB0021	103 (1,67)	103 (4,17)	0	0
Broj PFGE profila	21	12	5	7

¹ Procenat predstavlja odnos između broja izolata koji pripadaju odgovarajućem PFGE profilu i ukupnog broja ispitanih izolata (prema poreklu). Na primer, 17 izolata iz hrane i hrane za životinje od ukupno 24 ispitana pripada STYPXB0001 PFGE profilu, što iznosi 70,83%.

Dice (Tol 3.0%-3.0%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]

1



Slika 5.2. Dendrogram elektroforetske sheme dobijen enzimom *XbaI* – genom 60 izolata *S. Typhimurium* iz FPQuest programa koji pokazuje koeficijent sličnosti između ispitivanih izolata, uz prikaz izolata rezistentnih na antimikrobne lekove iz primenjene palete - ampicilin (AMP), hloramfenikol (C), pefloksacin (PEF), tetraciklin (TE), trimetoprim (W).

5.5.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove disk-difuzionom metodom

5.5.3.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* na antimikrobne lekove disk-difuzionom metodom

Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* na antimikrobne lekove dobijeni disk difuzionom metodom prikazani su u Tabeli 5.47., 5.48. i 5.49.

Tabela 5.47. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* izolovanih iz kliničkog materijala poreklom od obolelih ljudi

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Rezistentni izolati	
		Broj (oznaka)	(%)
Ampicilin (AMP10)	12	-	0
Azitromicin (AZM15)	12	-	0
Cefotaksim (CTX5)	12	-	0
Ceftazidim (CAZ10)	12	-	0
Hloramfenikol (C30)	12	-	0
Gentamicin (CN10)	12	-	0
Meropenem (MEM10)	12	-	0
Pefloksacin (PEF5)	12	1 (4)	8,3
Sulfametoksazol (RL100)	12	ND	-
Tetraciklin (TE30)	12	-	0
Tigecycline (TGC15)	12	-	0
Trimetoprim (W5)	12	-	0

ND – nije definisan kriterijum procene AMR

Svi ispitani izolati bili su osetljivi na ampicilin, azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, hloramfenikol, gentamicin, meropenem, tetraciklin, tigecycline, trimetoprim. Utvrđena je rezistencija jednog izolata na pefloksacin, a ostalih 11 izolata pokazali su osetljivost i prema ovom antimikrobnom leku.

Tabela 5.48. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* izolovanih iz hrane i hrane za životinje

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Rezistentni izolati	
		Broj (oznaka)	(%)
Ampicilin (AMP10)	24	2 (17, 31)	8,3
Azitromicin (AZM15)	24	-	0
Cefotaksim (CTX5)	24	-	0
Ceftazidim (CAZ10)	24	-	0
Hloramfenikol (C30)	24	-	0
Gentamicin (CN10)	24	-	0
Meropenem (MEM10)	24	-	0
Pefloksacin (PEF5)	24	2 (27, 32)	8,3
Sulfametoksazol (RL100)	24	ND	ND
Tetraciklin (TE30)	24	1 (17)	4,2
Tigecycline (TGC15)	24	-	0
Trimetoprim (W5)	24	-	0

ND – nije definisan kriterijum procene AMR

Svi ispitani izolati bili su osetljivi na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, hloramfenikol, gentamicin, meropenem, tigecycline i trimetoprim. Utvrđena je rezistencija dva izolata na pefloksacin, dva izolata na amoksicilin i jednog izolata na tetraciklin. Preostali izolati bili su osetljivi na ampicilin (22 izolata), pefloksacin (22 izolata) i tetraciklin (23 izolata).

Tabela 5.49. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* izolovanih iz fecesa živine

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Rezistentni izolati	
		Broj (oznaka)	(%)
Ampicilin (AMP10)	24	1 (55)	4,2
Azitromicin (AZM15)	24	-	0
Cefotaksim (CTX5)	24	-	0
Ceftazidim (CAZ10)	24	-	0
Hloramfenikol (C30)	24	-	0
Gentamicin (CN10)	24	-	0
Meropenem (MEM10)	24	-	0
Pefloksacin (PEF5)	24	3 (53, 54, 55)	12,5
Sulfametoksazol (RL100)	24	ND	ND
Tetraciklin (TE30)	24	-	0
Tigecycline (TGC15)	24	-	0
Trimetoprim (W5)	24	-	0

ND – nije definisan kriterijum procene AMR

Svi ispitani izolati bili su osetljivi na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, hloramfenikol, gentamicin, meropenem, tetraciklin, tigecycline i trimetoprim. Utvrđena je rezistencija tri izolata na pefloksacin i jednog izolata na amoksicilin. Preostali izolati bili su osetljivi na ampicilin (23 izolata) i pefloksacin (21 izolat).

5.5.3.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove disk-difuzionom metodom

Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove dobijeni disk difuzionom metodom prikazani su u Tabeli 5.50., 5.51. i 5.52.

Tabela 5.50. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* izolovanih iz kliničkog materijala poreklom od obolelih ljudi

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Rezistentni izolati	
		Broj (oznaka)	(%)
Ampicilin (AMP10)	12	8 (61, 64, 65, 66, 67, 70, 71, 72)	66,7
Aztromicin (AZM15)	12	-	0
Cefotaksim (CTX5)	12	-	0
Ceftazidim (CAZ10)	12	-	0
Hloramfenikol (C30)	12	2 (64, 71)	16,7
Gentamicin (CN10)	12	-	0
Meropenem (MEM10)	12	-	0
Pefloksacin (PEF5)	12	2 (64, 71)	16,7
Sulfametoksazol (RL100)	12	ND	ND
Tetraciklin (TE30)	12	8 (61, 64, 65, 66, 67, 70, 71, 72)	66,7
Tigecycline (TGC15)	12	-	0
Trimetoprim (W5)	12	6 (65, 66, 67, 70, 71, 72)	50

ND – nije definisan kriterijum procene AMR

Svi ispitani izolati bili su osetljivi na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, gentamicin, meropenem i Tigecycline. Utvrđena je rezistencija 8 izolata ampicilin (66,7%), 8 izolata na tetraciklin (66,7%), 6 izolata na trimetoprim (50%), 2 izolata na hloramfenikol (16,7%) i 2 izolata na pefloksacin (16,7%).

Tabela 5.51. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* izolovanih iz hrane i hrane za životinje

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Rezistentni izolati	
		Broj (oznaka)	(%)
Ampicilin (AMP10)	24	18 (73, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93)	75
Azitromicin (AZM15)	24	-	0
Cefotaksim (CTX5)	24	-	0
Ceftazidim (CAZ10)	24	-	0
Hloramfenikol (C30)	24	17 (73, 74, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93)	70,8
Gentamicin (CN10)	24	-	0
Meropenem (MEM10)	24	-	0
Pefloksacin (PEF5)	24	-	0
Sulfametoksazol (RL100)	24	ND	ND
Tetraciklin (TE30)	24	20 (73, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96)	83,3
Tigecycline (TGC15)	24	-	0
Trimetoprim (W5)	24	-	0

ND – nije definisan kriterijum procene AMR

Svi ispitani izolati bili su osetljivi na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, gentamicin, meropenem, pefloksacin, tigecycline i trimetoprim.

Utvrđena je rezistencija 20 izolata na tetraciklin (83,3%), 18 izolata na ampicilin (75%) i 17 izolata na hloramfemikol (70,8%).

Tabela 5.52. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* izolovanih iz fecesa
živine

Antimikrobni lekovi	Broj ispitanih izolata	Rezistentni izolati	
		Broj (oznaka)	(%)
Ampicilin (AMP10)	24	4 (104, 107, 116, 120)	16,7
Azitromicin (AZM15)	24	-	0
Cefotaksim (CTX5)	24	-	0
Ceftazidim (CAZ10)	24	-	0
Hloramfenikol (C30)	24	-	0
Gentamicin (CN10)	24	-	0
Meropenem (MEM10)	24	-	0
Pefloksacin (PEF5)	24		0
Sulfametoksazol (RL100)	24	ND	ND
Tetraciklin (TE30)	24	2 (104, 107)	8,3
Tigecycline (TGC15)	24	-	0
Trimetoprim (W5)	24	107	4,17

ND – nije definisan kriterijum procene AMR

Svi ispitani izolati bili su osetljivi na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, hloramfenikol, gentamicin, meropenem, pefloksacin i tigecycline.

Utvrđena je rezistencija 4 izolata na ampicilin (16,7%), 2 izolata na tetraciklin i jednog izolata na trimetoprim (4,17%).

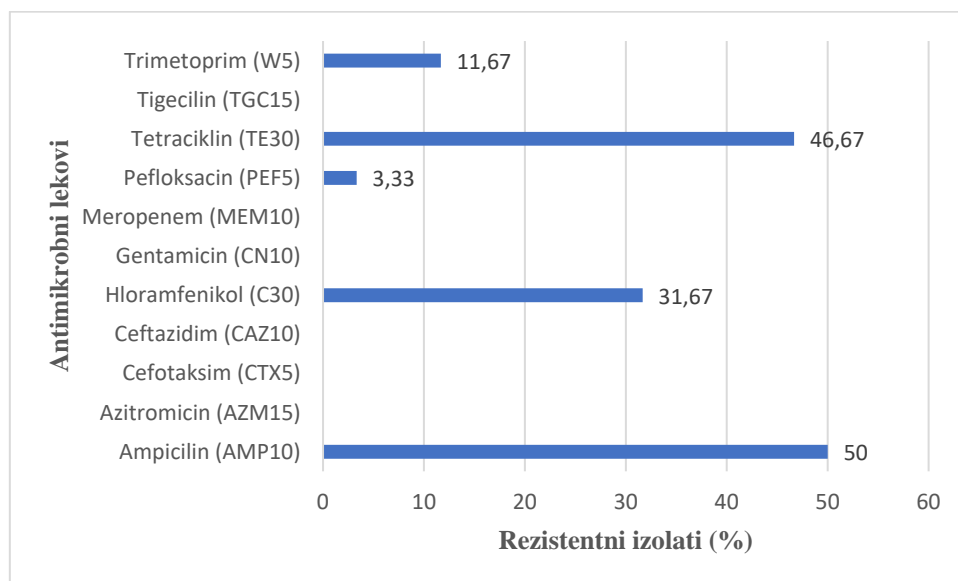
5.5.3.3. Zbirni prikaz rezultata ispitivanja osjetljivosti *S. Typhimurium* disk difuzionom metodom

Osetljivost 60 izolata *S. Typhimurium* prema 12 antimikrobnih lekova prikazana je u Tabeli 5.53. Svih 60 izolata pokazali su osjetljivost na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, gentamicin, meropenem i tigecycline. Rezistencija se kretala od 3,33% na pefloksacin, 11,67 % na trimetoprim, 31,67% na hloramfenikol, 46,67 % na tetraciklin do 50% na amoksicilin. Izolati iz hrane pokazali su visok stepen rezistencije na hloramfenikol (70,83%), ampicilin (75%) i tetraciklin (75%). Takođe, humani izolati u visokom procenu pokazali su rezistenciju na ampicilin (66,67%), tetraciklin (66,67%) i trimetoprim (50%).

Tabela 5.53. Zbirni prikaz rezultata ispitivanja osjetljivosti *S. Typhimurium* disk difuzionom metodom

Antimikrobni lekovi	Poreklo izolata/ broj			
	Ljudi /12	Hrana /24	Feces/24	Ukupno
	R (%)	R (%)	R (%)	R (%)
Ampicilin (AMP10)	8 (66,67)	18 (75)	4 (16,67)	30 (50)
Azitromicin (AZM15)	0	0	0	0
Cefotaksim (CTX5)	0	0	0	0
Ceftazidim (CAZ10)	0	0	0	0
Hloramfenikol (C30)	2 (16,67)	17 (70,83)	0	19 (31,67)
Gentamicin (CN10)	0	0	0	0
Meropenem (MEM10)	0	0	0	0
Pefloksacin (PEF5)	2 (16,67)	0	0	2 (3,33)
Sulfametoksazol (RL100)	ND	ND	ND	ND
Tetraciklin (TE30)	8 (66,67)	18 (75)	2 (8,33)	28 (46,67)
Tigecycline (TGC15)	0	0	0	0
Trimetoprim (W5)	6 (50)	0	1(4,17)	7 (11,67)

Grafički prikaz osetljivosti 60 izolata *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove nakon ispitivanja disk difuzionom metodom dat je na grafikonu 5.1.



Grafikon 5.1. Zbirni prikaz rezultata ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* (n = 60) disk difuzionom metodom

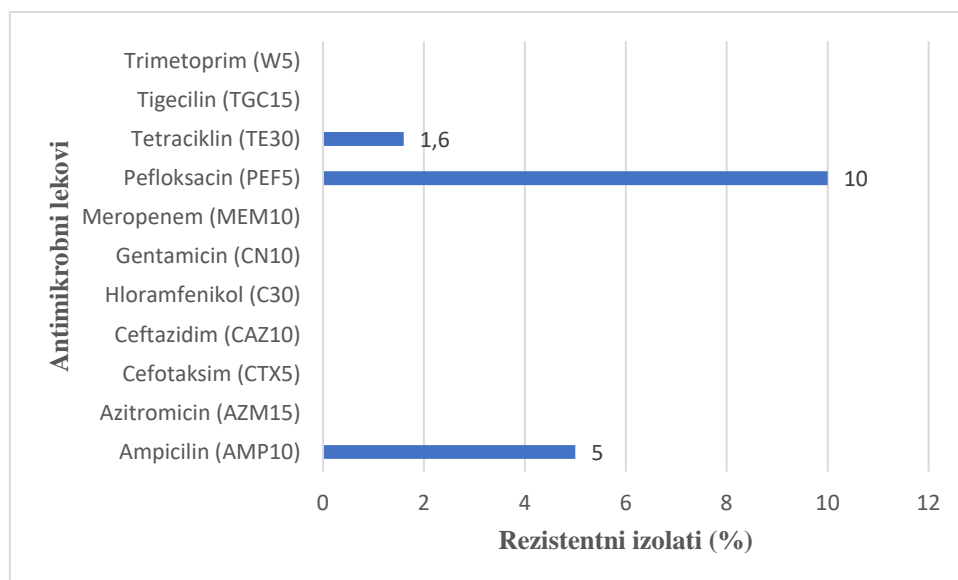
5.5.3.4. Zbirni prikaz rezultata ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* disk difuzionom metodom

Osetljivost 60 izolata *S. Enteritidis* prema 12 antimikrobnih lekova prikazana je u Tabeli 5.54. Svih 60 izolata pokazali su osetljivost na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, hloramfenikol, gentamicin, meropenem, tigecline i trimetoprim. Ukupno 10% izolata pokazalo je rezistenciju na pefloksacin, 5% na ampicilin i 1,67% na tetraciklin.

Tabela 5.54. Zbirni prikaz rezultata ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* disk difuzionom metodom

Antimikrobni lekovi	Poreklo izolata /broj			
	Ljudi /12	Hrana /24	Feces/24	Ukupno
	R (%)	R (%)	R (%)	R (%)
Ampicilin (AMP10)	0	2 (8,33)	1 (4,17)	3 (5)
Azitromicin (AZM15)	0	0	0	0
Cefotaksim (CTX5)	0	0	0	0
Ceftazidim (CAZ10)	0	0	0	0
Hloramfenikol (C30)	0	0	0	0
Gentamicin (CN10)	0	0	0	0
Meropenem (MEM10)	0	0	0	0
Pefloksacin (PEF5)	1(4,17)	2 (8,33)	3 (12,5)	6 (10)
Sulfametoksazol (RL100)	ND	ND	ND	ND
Tetraciklin (TE30)	0	1 (4,17)	0	1 (1,67)
Tigecycline (TGC15)	0	0	0	0
Trimetoprim (W5)	0	0	0	0

Grafički prikaz osetljivosti osetljivosti 60 izolata *S. Enteritidis* na antimikrobne lekove nakon ispitivanja disk difuzionom metodom dat je na grafikonu 5.2.



Grafikon 5.2. Zbirni prikaz rezultata ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* (n = 60) disk difuzionom metodom

5.5.4. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove E testom

5.5.4.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* na antimikrobne lekove E testom

Izolati *S. Enteritidis*, rezistentni nakon ispitivanja disk-difuzionom metodom, ispitani su E-testom. E test je primenjen na izolate koji su pokazali rezistenciju na ciprofloksacin (6 izolata), ampicilin (3 izolata) i tetracikline (1 izolat). Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom prikazani su u Tabeli 5.55..

Tabela 5.55. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* dobijenih E-testom

Antimikrobni lekovi	Rezistentni izolati nakon disk difuzione metode	Rezistentni izolati nakon E testa	
		Oznaka	(%)
Ampicilin (AMP 0.016-256 µg/mL)	3 (17, 31, 55)	3 (17, 31, 55)	100
Ciprofloksacin (CIP 0.002-32 µg/mL)	6 (4, 27, 32, 53, 54, 99)	3 (27, 32, 55)	50
Tetraciklin (TE 0.016-256 µg/mL)	1 (17)	1 (17)	100

5.5.4.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove E testom

Izolati *S. Typhimurium*, rezistentni nakon ispitivanja disk-difuzionom metodom, ispitani su E-testom. E test je primenjen na izolate koji su pokazali rezistenciju na ampicilin (30 izolata), tetracikline (30 izolata), hloramfenikol (19 izolata), trimetoprim (7 izolata) i ciprofloksacin (2 izolata).

Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom prikazani su u Tabeli 5.56.

Tabela 5.56. Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* dobijenih E-testom

Antimikrobni lekovi	Rezistentni izolati nakon disk difuzione metode	Rezistentni izolati nakon E testa	
		Oznaka	(%)
Ampicilin (AMP 0.016-256 µg/mL)	30 (61, 64, 65, 66, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 104, 107, 116, 120)	29 (61, 64, 65, 66, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 104, 107, 116, 120)	96,7
Ciprofloksacin (CIP 0.002-32 µg/mL)	2 (64, 71)	2 (64, 71)	100
Hloramfenikol (C 0.016-256 µg/mL)	19 (64, 71, 73, 74, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93)	19 (64, 71, 73, 74, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93)	100
Tetraciklin (TE 0.016-256 µg/mL)	30 (61, 64, 65, 66, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96 104, 107)	29 (61, 64, 65, 66, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96 104, 107)	96,7
Trimetoprim (TM 0.002-32 µg/mL)	7 (65, 66, 67, 70, 71, 72, 107)	7 (65, 66, 67, 70, 71, 72, 107)	100

6. DISKUSIJA

I pored mnogobrojnih programa suzbijanja, *Salmonella* spp. predstavljaju jedne od vodećih patogenih mikroorganizama prenosivih hranom, u zemljama u razvoju, ali i u razvijenim zemljama. Procenjuje se da su *Salmonella* spp. na godišnjem nivou odgovorne za oko 80,3 miliona slučajeva oboljenja ljudi koji se dovode u vezu sa hranom (Majowicz i sar., 2010). U zemljama Evropske Unije, posle kampilobakterioze, salmoneloza je druga najčešće registrovana infekcija prilikom epidemija koje se dovode u vezu sa kontaminiranom hranom (EFSA, 2017). U Republici Srbiji u posmatranom periodu od 2012. do 2016. u okviru alimentarnih epidemija najčešće su registrovane epidemije salmoneloze (IZJZS, 2017).

Veliki broj alternativnih metoda razvijen je i validovan u cilju detekcije *Salmonella* spp., važnog patogenog mikroorganizma prenosivog hranom (Lee i sar., 2015). Pored toga, napredak u razvoju molekularnih metoda pružio je alate visoke diskriminatorne moći koji su posebno mesto primene zauzeli pri određivanju izvora kontaminacije hrane. U poslednjih 30 godina, brojne metode genotipizacije patogenih mikroorganizama prenosivih hranom su razvijene i primenjuju su u laboratorijama širom sveta i u velikoj meri su zamenile fenotipske metode. Ove metode, pored primene u rešavanju epidemija u cilju utvrđivanja srodnosti pojedinih sojeva, pružaju i jedan širi koncept od izuzetnog značaja za javno zdravlje, kao što su filogenetske analize, karakterizacija i evolucija virulentnih gena, gena rezistencije i drugih relevantnih gena. Trenutna praksa je da se za tipizaciju patogenih mikroorganizama prenosivih hranom koristi kombinacija različitih fenotipskih i genotipskih metoda tipizacije. Razvoj metode sekvenciranja celog genoma (eng. *Whole Genome Sequence analysis* - WGS) postepeno menja ovu praksu i ima tendenciju da je u potpunosti zameni (EFSA, 2013).

Ukratko, tokom izrade ove doktorske disertacije izvršena je "in house" validacija protokola za detekciju *Salmonella* spp. i detekciju *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* real-time PCR metodom, ali i razvijen potpuno novi real-time PCR protokol za detekciju *Salmonella* spp. u hrani. Pored toga izvršena je i karakterizacija izolata *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, epidemiološki važnih sojeva sa aspekta javnog zdravlja.

6.1. Real-time PCR detekcija *Salmonella* spp. u hrani i hrani za životinje

Standardna metoda za detekciju *Salmonella* spp. u hrani uključuje neselektivno predobogaćenje, praćeno selektivnim obogaćenjem i selektivnom izolacijom na čvrstim podlogama, nakon čega sledi biohemijsko i serološko potvrđivanje suspektnih kolonija (ISO, 2017). Čitava procedura zahteva minimum 4 dana za detekciju i potvrđivanje *Salmonella* spp. što je znatno duže u poređenju sa real-time PCR metodom koja zahteva oko 20 sati, uključujući i fazu predobogaćenja koja je zajednička za obe metode. Činjenica da obe metode imaju istovetnu početnu fazu (predobogaćenje) pruža mogućnost nastavaka ispitivanja u skladu sa standardnom SRPS EN ISO 6579-1:2017 metodom u slučaju da je genom *Salmonella* spp. detektovan. Standardna metoda ostaje nezamenjiva kao konfirmaciona metoda u takvim slučajevima. Međutim, s obzirom da njena procedura zahteva znatno više vremena, koje u nekim situacijama prevazilazi rok upotrebe ispitivanog proizvoda i da je za njeno izvođenje potrebno znatno više materijalnih i ljudskih resursa, real-time PCR metoda se pokazala kao dobra alternativna metoda. Real-time PCR metoda ispunjava uslove koje postavlja savremena industrija hrane, ali i javno zdravstvo, obezbeđujući brzu detekciju *Salmonella* spp., a uz to pruža visok nivo osetljivosti i specifičnosti, odličnu efikasnost i smanjen rizik od unakrsne kontaminacije (Rodriguez-Lazaro i sar., 2014). Implementacija ove metode u rutinskim ispitivanjima, unapredila bi sistem bezbednosti u celokupnom lancu proizvodnje hrane i hrane za životinje, obezbeđujući rezultate podudarne sa standardnom metodom, ali znatno brže. U slučajevima kada se vrši detekcija *Salmonella* spp. kao pokazatelja kriterijuma higijene na liniji klanja (uzimanjem briseva trupova svinja i goveda, kao i kožica sa vrata živine), dobijanje rezultata za manje od 24 časa od momenta uzorkovanja, doprinelo bi smanjenju slučajava unakrsne kontaminacije pravovremenim reagovanjem u smislu primene adekvatnih mera sanitacije. U slučaju epidemija bilo bi pravovremeno i olakšano utvrđivanje izvora infekcije. Primena alternativnih metoda u laboratoriji omogućila bi i ispitivanje većeg broja uzoraka dnevno, uz istovremeno smanjenje potreba za ljudskim i materijalnim resursima.

Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) objavila je standard koji se odnosi na opšte zahteve i definicije pri detekciji patogenih mikroorganizama prenosivih hranom real-time PCR metodom (ISO, 2015 b). Dodatno, nemački institut za standardizaciju

publikovao je standard koji specificira metodu za detekciju *Salmonella* spp. u hrani i hrani za životinje i izolatima dobijenim iz njih primenom PCR metode, uključujući i real-time PCR (DIN, 2013). Veliki broj real-time PCR protokola razvijen je u cilju detekcije *Salmonella* spp. u hrani (Malorny i sar., 2004; Píknová i sar., 2005; Josefsen i sar., 2007; Krascenicsová i sar., 2008; McGuinness i sar., 2009; Chen i sar., 2010; McCabe i sar., 2010; Anderson i sar., 2011; Prendergast i sar., 2012; Zhang i sar., 2015; Denis i sar., 2016). Pored detekcije *Salmonella* spp., real-time PCR metoda daje i mogućnost tipizacije *Salmonella* spp. (Prendergast i sar., 2013; Maurischat i sar., 2015; Bugarel i sar., 2017). Takođe, postoje i validovani, komercijalno dostupni kitovi za detekciju *Salmonella* spp. zasnovani na real-time PCR metodi (<http://www.aoac.org>, <http://www.microval.org>, <http://www.nmkl.org>, <https://nf-validation.afnor.org/en/>). Osnovni preduslov koji alternativna metoda mora ispuniti da bi bila primenjena u rutinskim ispitivanjima je njena validacija u skladu sa nekim od međunarodno prihvaćenih protokola (AOAC, 2012; AFNOR, 2016; NordVal, 2017; ISO, 2016). Podaci dobijeni pri validacionim studijama sprovedenim tokom izrade ove doktorske disertacije su dragoceni, jer se radi o širokom spektru uzoraka, raznorodnih po fizičko-hemijskim osobinama, što u nekim slučajevima može imati uticaj na rezultat ispitivanja. Poznato je da brojne supstance ili fizičko-hemijski faktori, mogu inhibirati PCR u hrani, na primer proteinaze (u proizvodima od mleka), masti i visoka koncentracija kalcijumovih jona (mlečni proizvodi, sir), niska pH vrednost (voće, na primer maline) ili veliki broj mikroorganizama prisutnih u hrani (Wilson, 1997). Postojanje inhibitornih materija u uzorku, uz nepoštovanje osnovnih principa interne kontrole pri izvođenju PCR, moglo bi dovesti do pojave lažno negativnih rezultata (ISO, 2008). Stoga validacione studije u kojima je alternativna metoda zasnovana na principu PCR, definišu za koje kategorije hrane je alternativna metoda validovana. U slučaju da se vrši validacija za sve tipove hrane, neophodno je da minimum pet kategorija hrane budu upotrebljene kao matriks (ISO, 2016).

Validacijom i standardizacijom real-time PCR protokola za detekciju *Salmonella* spp. u hrani, ispunjavaju se i zahtevi zakonske regulative neophodni da se alternativna metoda koristi kao ekvivalentna zamena standardnoj. U zemljama Evropske Unije, Uredba Evropske Komisije o mikrobiološkim kriterijumima za hranu (2073/2005) dozvoljava upotrebu alternativnih metoda ukoliko su validovane u skladu sa EN ISO 16140 ili nekim drugim međunarodno prihvaćenim protokolom. Ako subjekt u poslovanju hranom želi da

koristi analitičke metode osim onih koje su predhodno validovane, mora se izvršiti njihova validacija, a primenu odobrava nadležni organ (OJEU, 2005). Propisi Republike Srbije po ovom pitanju imaju postavljen strožiji kriterijum, jer alternativne metode i pored ispunjenosti uslova koji se odnosi na validaciju u skladu sa EN ISO 16140 ili nekim drugim međunarodno prihvaćenim protokolom, moraju biti odobrene od strane Ministarstva nadležnog za poslove poljoprivrede (SG, 2010).

Optimizacija i “in house“ validacija protokola za detekciju genoma *Salmonella* spp., sprovedena tokom izrade ove doktorske disertacije, pruža jasniji uvid u performanse ispitanih metoda i daje dovoljno podataka za njihovu eventualnu implementaciju u rutinskim ispitivanjima.

Tokom studije poređenja metoda, rezultati dve nepatentirane real-time PCR metode za detekciju *Salmonella* spp. u hrani (Protokol A i protokol M) upoređeni su u odnosu na standardnu metodu (SRPS EN ISO 6579-1:2017). Poređenje dela rezultata vršeno je i prema validovanom real-time PCR kit IQ check® *Salmonella* II kit – u (Bio-Rad, SAD), koji je služio i kao konfirmatorna alternativna metoda. Real-time PCR protokoli primenjeni u toku ove studije uključili su fazu predobogaćenja, praćenu ekstrakcijom DNK i real-time PCR detekcijom. Faza predobogaćenja je potrebna da bi se povećao broj vijabilnih ćelija *Salmonella* spp. prisutnih u hrani, ali ima i pozitivan uticaj kroz razređenje eventualno prisutnih inhibitornih materija ili mrtvih bakterijskih ćelija koje su ostale u hrani nakon termičke obrade (Schrank i sar., 2001; Zheng i sar., 2014).

Invazija intestinalnih epitelnih ćelija predstavlja jedan od najvažnijih koraka u patogenezi mnogobrojnih enteričnih bakterija (Hale i Formal, 1988). Jedan od najranijih koraka u patogenezi salmoneloze, predstavlja invazija i penetracija bakterija u ćeliju domaćina i upravo ta sposobnost definisana je grupom gena koja uključuje i *invA* gen (Galán i Curtiss, 1989; Rahn i sar., 1992). Izbor *ttr* lokusa kao specifičnog ciljnog gena za *Salmonella* spp. mogao bi imati prednost nad ostalim publikovanim ciljnim sekvencama pri identifikaciji svih *Salmonella* spp. sojeva jer od njega zavisi respiracija tetracionata što omogućava preživljavanje i rast *Salmonella* spp. u anaerobnim uslovima (Delibato i sar., 2014).

Prajmeri i fluorescentno obeležena proba „Protokola A“ specifično se vezuju za *invA* gen *Salmonella* spp. koji se nalazi u okviru „Salmonella Pathogenicity Island - 1 (SPI -1)“, dok je ciljni region prajmera i fluorescentno obeležene probe „Protokola M“, *ttr* kompleks

gena *Salmonella* spp. koji se nalazi u blizini „*Salmonella* Pathogenicity Island - 2 (SPI - 2) (Malorny i sar., 2007 b). Odabrani set *invA* prajmera predhodno je validovan sa 630 *Salmonella* sojeva. Sa izuzetkom dva soja *S. Litchfield* i dva soja *S. Senftenberg* svi ostali sojevi *Salmonella* su detektovani (Rahn i sar., 1992). Takođe, svih 120 *Salmonella* sojeva ispitanih primenom PCR zasnovane na specifičnom regionu *ttr* gena uspešno je detektovano (Malorny i sar., 2004).

Nakon „Chelex“ DNK ekstrakcije broj pozitivnih rezultata primenom „Protokol A“ bio je veći za 5, u poređenju sa rezultatima standardne metode (SRPS EN ISO 6579-1:2017), dok je primenom „Protokol M“ bio veći za 6. Postoje publikovani podaci da *InvA* gen sa visokim stepenom homologije u odnosu na *InvA* gen *Salmonella* spp, mogu posedovati i neke vrste u okviru roda *Shigella* i *Citrobacter*. Posledično, njihovo prisustvo u uzorku moglo bi dati lažno pozitivne rezultate prilikom real-time PCR detekcije *Salmonella* spp. (Zheng i sar., 2014). Ipak, nijedan od 142 soja koji ne pripadaju *Salmonella* spp. nije dao specifičan produkt amplifikacije tokom *exclusivity* provere prajmera za detekciju *InvA* gena. Nespecifična amplifikacija nekoliko sojeva koji ne pripadaju rodu *Salmonella* rezultirala je produktom koji se razlikovao u veličini u odnosu na specifičan produkt amplifikacije od 254 bp (Rahn i sar., 1992). Ovde bi trebalo naglasiti da je tokom *exclusivity* provera specifičnosti prajmera za *InvA* gen izvršena klasičnim PCR-om i da se uvođenjem probe koja se specifično vezuje za sekvencu *InvA* gena, povećava i specifičnost metode (Protokol A). Rezultati još jedne studije pokazuju da je prilikom *exclusivity* provere u kojoj je primenom real-time PCR protokola za detekciju *InvA* gena *Salmonella* spp. ispitano 42 izolata koji ne pripadaju rodu *Salmonella* i svi su pokazali negativan rezultat (Anderson i sar., 2011). Slično tome, govori i *exclusivity* studija u kojoj je 87 izolata koji ne pripadaju rodu *Salmonella* dalo negativan rezultat primenom protokola za detekciju *ttr* gena *Salmonella* spp. (Malorny i sar., 2004).

Osnovni preduslov da se neka metoda koristi kao “screening metoda” jeste da ne daje lažno negativne rezultate. U slučaju primene real-time PCR metode, kao što je i ova studija pokazala, lažno negativnih rezultata “nema”, dok se problem inhibicije rešava upotrebom interne ili eksterne amplifikacione kontrole (IAC) (Hoorfar i sar., 2003; ISO, 2008). Interna amplifikaciona kontrola mora biti dodata u svaku reakciju u definisanoj količini ili broju kopija (ISO, 2008). Interna amplifikaciona kontrola je zapravo neciljna DNK sekvencija (eng. *nontarget DNA*), prisutna u svakoj tubici gde se odvija PCR, a njena

amplifikacija vrši se paralelno sa amplifikacijom ciljane DNK (eng. *target DNA*). U PCR sa IAC, kontrolni signal za IAC mora biti prisutan ukoliko nije detektovan signal ciljane sekvence. Kada nisu detektovani ni signal za IAC, ni ciljani signal, smatra se da je prisutna inhibicija PCR. U slučaju da je detektovan ciljani signal, analiziranje signala za IAC nije neophodno (Hoorfar i sar., 2003).

Amplifikacija DNK interne amplifikacione kontrole može biti izvršena istim parom prajamera koji se koristi za ciljnu DNK (homologna IAC; na primer, IAC Protokola M) ili različitim parom prajamera (heterologna IAC; na primer, DNA Extraction Control mix 610, Bioline, Velika Britanija). Koncentracija IAC DNK mora biti najmanja moguća u cilju detekcije i male inhibicije, ali u isto vreme mora dati stabilan pozitivan signal. Niža koncentracija IAC DNK smanjuje efekat kompetitivne amplifikacije između nje i ciljane DNK, koje u jednoj reakcionoj tubici koriste zajedničke nukleotide iz PCR miksa, čime se obezbeđuje da ne utiče na limit detekcije ciljane DNK (Raymaekers i sar., 2009; ISO, 2015 b). U slučaju da se u reakciji nalazi ciljna DNK, ne može se očekivati stabilnost C_q vrednosti IAC, upravo zbog kompetitivne amplifikacije i tada su C_q vrednosti za IAC više, a može se desiti da signal za IAC i ne bude detektovan. Ovo je prihvatljivo, jer takav nalaz nema uticaj na rezultat, jer je osnovni cilj IAC da eliminiše lažno negativne rezultate (Hoorfar i sar., 2003). Interna kontrola amplifikacije može biti dodata u uzorak u početnoj fazi ispitivanja i istovremeno imati i funkciju kontrole ekstrakcije, što je i primenjeno tokom eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije (ISO, 2015 b).

Interne amplifikacione kontrole (IAC) primenjene tokom ispitivanja (DNA Extraction Control mix 610, Bioline, Velika Britanija i IAC protokola M) u optimalnoj koncentraciji nisu nepovoljno uticale na osetljivost za detekciju ciljnog mikroorganizma, a pri tome su ispunile svoju funkciju indikujući inhibitorne efekte. U PCR bez IAC, negativan odgovor može značiti da ciljani mikroorganizam nije prisutan u reakciji, ali takođe može značiti da je reakcija inhibirana (neispravan PCR aparat, prisustvo inhibitornih supstanci u uzorku, pogrešan odnos reagenasa u reakciji itd.) (Hoorfar et al., 2003). Tokom ispitivanja C_q za IAC (DNA Extraction Control mix 610, Bioline, Velika Britanija) bila je u opsegu od 28,36 - 32,81 (srednja vrednost 30,3). Interna amplifikaciona kontrola „Protokola M“ imala je C_q u opsegu 30 ± 2 .

Uzorci koji su posle ispitivanja standardnom metodom (SRPS EN ISO 6579-1: 2017) dali negativne rezultate, a real-time PCR metodom pozitivne (pozitivna devijacija) imali su

C_q vrednosti u opsegu od 31,87 do 38,11. Uzorci koji su bili pozitivni primenom standardne metode (SRPS EN ISO 6579-1: 2017), imali su $C_q < 38$. Stoga je za graničnu „target“ C_q , vrednost postavljen 39. ciklus, čime je isključena svaka mogućnost lažno negativnih rezultata primenom real-time PCR metode.

U dva prirodno kontaminirana uzorka (mehanički separisano meso živnine) nakon „chelex“ ekstrakcije utvrđeno je prisustvo inhibitora pri čemu su C_q vrednost IAC iznosile 35,89 i 36,91. Ponovnim ispitivanjem, pri čemu je kao „template“ upotrebljen 1 μ L DNK u PCR reakciji, eliminisan je efekat inhibitora i ostvarene C_q vrednosti iznosile su 20,32 za prvi, odnosno 23,21 za drugi uzorak (Tabela 5.5. Ostvarene C_q vrednosti nakon ispitivanja prirodno kontaminiranih uzoraka nakon „Chelex“ ekstrakcije; uzorci 23 i 50). U slučaju inhibicije PCR reakcije, neki autori savetuju da se izvrši selektivno obogaćenje u Rapaport-Vassiliadis bujonu (RV), a nakon toga ponovi PCR reakcija (Anderson i sar., 2011). Za prvi uzorak izvršili smo ekstrakciju DNK iz RV (Oxoid, Velika Britanija), nakon čega je ostvarena C_q vrednost 21,99 (IAC C_q 30,12). Ekstrakcijom DNK iz drugog selektivnog obogaćenja, Muller-Kauffmann tetrations bujona sa dodatkom novobiocina (MKTTn, Oxoid, Velika Britanija), ostvarena je C_q vrednost 28,39 (IAC C_q 30,32). Iz ovoga je izveden zaključak da bi u slučaju pojave inhibicije, trebalo ponoviti PCR reakciju uz upotrebu 1 μ L DNK kao „template“, čime se smanjuju troškovi i vreme trajanja ispitivanja. Prisustvo inhibitora detektovano je i nakon „chelex“ ekstrakcije u 3 uzorka veštački kontaminiranih malina (efekat inhibitora otklonjen uz upotrebu 1 μ L DNK kao „template“). Takođe, prisustvo inhibitora detektovano je u jednom uzorku veštački kontaminiranih malina nakon „PBS“ ekstrakcije (efekat inhibitora nije otklonjen uz upotrebu 1 μ L DNK kao „template“, u takvim slučajevima mora se nastaviti detekcija *Salmonella* spp. standardnom metodom).

U zavisnosti od procedure ekstrakcije DNK ili primenjenog real-time PCR protokola, 2,5 - 4,2% uzoraka bili su pozitivni primenom real-time PCR i negativni nakon primene standardne metode (SRPS EN ISO 6579-1:2017) (Tabela 5.1. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih nakon ispitivanja svih uzoraka hrane i uzoraka iz okruženja u zoni proizvodnje ili rukovanja hranom). Čak i kada PCR funkcioniše optimalno, postoji mogućnost da neće uvek doći do 100% „slaganja“ između standardne i PCR metode. Postoji nekoliko objašnjenja za pojavu pozitivnih rezultata real-time PCR metodom, nakon koje nije

moguća izolacija primenom standardne metode: 1. bakterije mogu biti vijabilne, ali u stanju u kojem se ne mogu kultivirati (eng. *viable but nonculturable*); 2. oštećenje bakterijske ćelije tokom obrade hrane; 3. mrtve bakterijske ćelije (Maurer, 2006).

Analitička osetljivost PCR metode odnosi se na broj kopija ciljne DNK koji može biti pouzdano detektovan u uzorku njenom primenom. Obično se izražava terminom „limit detekcije metode (LOD)“, a predstavlja koncentraciju ciljne DNK koja može biti detektovana sa definisanim stepenom sigurnosti (najčešće se koristi nivo verovatnoće od 95%) primenom odgovarajuće analitičke procedure. Najniži LOD u idealnim uslovima, teoretski mogući uz nivo poverenja od 95% iznosi 3 kopije po PCR (Bustin i sar., 2009; Forootan i sar., 2017). Analitička osetljivost real-time PCR metode za detekciju *InvA* prilikom testiranja suspenzije ćelija iznosi 10^3 cfu/ml predobogaćenja, što odgovara koncentraciji od 10 DNK kopija po PCR reakciji i uporediva je sa real-time PCR metodom za detekciju *ttr* gena (Anderson i sar., 2011).

Standard SRPS EN ISO 22118:2015 („Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Lančana reakcija polimeraze (PCR) za detekciju i kvantifikaciju patogenih mikroorganizama u hrani - Karakteristike performansi“) definiše osetljivost kvalitativnih metoda kao najmanji broj ćelija, čestica ili molekula koji može biti detektovan u jednoj reakciji i pravi razliku između osetljivosti metode (eng. *method sensitivity*) i osetljivosti reakcije (eng. *reaction sensitivity*). Osetljivost reakcije definiše kao precizno definisanu količinu nukleinske kiseline koja se koristi kao „template“ u PCR, a zapravo predstavlja termin definisan u prethodnom pasusu (LOD ili analitička osetljivost). Osetljivost metode, zavisi od više faktora, uključujući i ekstrakciju DNK. Testiranje osetljivosti metode mora se izvesti na uzorcima koji sadrže i mikrofloru uobičajenu za tip hrane koja se ispituje, a procena osetljivosti metode mora uključiti pet različitih kategorija hrane. Minimalni zahtev koji se odnosi na osetljivost kvalitativnih metoda za detekciju patogenih mikroorganizama prenosivih hranom je sposobnost da detektuju 1-10 ćelija bakterija u definisanoj količini odgovarajućeg tipa hrane koji se ispituje (ISO, 2015 a).

Tokom ispitivanja osetljivosti metode, ukupno 150 veštački kontaminiranih uzoraka (Tabela 5.2. Zbirni prikaz rezultata nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka),

po 30 uzoraka čevapa, malina, pasterizovanog mleka, pilećeg mesa i kožica sa vrata živine, ispitano je na prisustvo *Salmonella* spp. real-time PCR metodom za detekciju *invA* (Protokol A) i *ttr* gena (Protokol M), nakon 2 načina ekstrakcije DNK (Chelex i PBS). Dodatno, veštački kontaminirani uzorci su ispitani i upotrebom komercijalno dostupnog real-time PCR kita (IQ check® *Salmonella* II, Bio-Rad, USA). Koristeći suspenziju poznate koncentracije bakterijskih ćelija, izvršena je veštačka kontaminacija uzoraka, a nivo kontaminacije iznosio je 1-10 (20 uzoraka) i 10-100 cfu/25 g uzorka (5 uzoraka). Neinokulisani uzorci upotrebljeni su kao negativne kontrole (5 uzoraka). Rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pokazali su da su svi primenjeni real-time PCR protokoli osetljivi i mogu detektovati 1-10 cfu u 25 g pilećeg mesa, čevapa, malina, pasterizovanog mleka i kožica sa vrata živine. Ostvarena osetljivost oba real-time protokola uporediva je sa drugim protokolima za detekciju *Salmonella* spp. (Chen et al., 1997; Sharma i Carlson, 2000; Uyttendaele i sar., 2003; Hein i sar., 2006) Lažno negativnih rezultata nije bilo. Pozitivna devijacija ostvarena je ispitivanjem jednog uzorka malina primenom „protokola M“ nakon „Chelex“ ekstrakcije DNK, pri čemu je isti uzorak bio pozitivan i nakon ispitivanja primenom IQ Check *Salmonella* II kita (Bio-Rad, SAD). U svaku reakciju uključena je i interna amplifikaciona kontrola. Prisustvo inhibitora PCR, koje nije bilo moguće ukloniti ponovnim testiranjem sa smanjenom količinom template (1 µL), detektovano je u jednom uzorku veštački kontaminiranih malina nakon „PBS“ ekstrakcije DNK. PCR inhibitori mogu biti prisutni u biološkom materijalu, uzorcima iz okruženja i hrani, uključujući i voće (Schrader, 2012). Pojava inhibicije dovodi se i u vezu sa hranom niske pH vrednosti, što je u ovom slučaju moglo biti uzrok (Wilson, 1997).

Neznatne razlike među protokolima prikazane u tabeli (Tabela 5.1. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih nakon ispitivanja svih uzoraka hrane i uzoraka iz okruženja u zoni proizvodnje ili rukovanja hranom), delom su i posledica različitih graničnih C_q vrednosti primenjenog protokola. Na primer, uzorak veštački kontaminiranih malina koji je pokazao pozitivnu devijaciju nakon testiranja IQ check® *Salmonella* II kit-om ostvario je C_q vrednost 38,8, a nakon primene protokola M (PBS ekstrakcija), ostvario je C_q vrednost 40,31, pri čemu je svrstan u kategoriju negativno slaganje (Dmitric i sar., 2018). Generalno, oba uzoraka koji su pokazali pozitivnu devijaciju nakon testiranja komercijalnim kitom (IQ check® *Salmonella* II kit, Bio-Rad, USA), imali su visoke C_q vrednosti (38,8 i 35,57). Takođe,

primenom IQ check® Salmonella II kita, nije bilo problema u vezi sa inhibicijom PCR reakcije i nisu ostvareni lažno negativni rezultati. Rezultati studije pokazali su odlično slaganje primenjenih real-time PCR metoda u odnosu na standardnu metodu (SRPS EN ISO 6579-1:2017) (Dmitric i sar., 2018).

Iako metode za detekciju *Salmonella* spp. zasnovane na real-time PCR tehnologiji poseduju visoku osetljivost (Rodriguez-Lazaro i sar., 2014), većina protokola ipak uključuje fazu predobogaćenja. Ovaj korak produžava vreme trajanja ispitivanja, ali ima i pozitivne efekte - omogućava revitalizaciju subletalno oštećenih ćelija tokom procesa obrade hrane, razređivanjem smanjuje koncentraciju inhibitora PCR, ali i eventualno mrtvih ćelija *Salmonella* (omogućava diferencijaciju vijabilnih i nevijabilnih ćelija). Takođe, faza predobogaćenja daje mogućnost potvrđivanja prisustva *Salmonella* spp. primenom standardne SRPS EN ISO 6579-1: 2017 metode, nakon detekcije genoma real-time PCR metodom, u istovetnom delu uzorka za ispitivanje. Različite procedure ekstrakcije DNK *Salmonella* spp. bile su predmet evaluacije tokom istraživačkih studija (Medici i sar. 2003; Wang i sar., 2004; Vazquez-Novelle i sar. 2005; Chua i Bhagwat 2009; Braun i Methner 2011; Rodriguez-Lazaro i sar., 2014;). Standard SRPS EN ISO 20837:2008 daje mogućnost upotrebe komercijalno dostupnih kitova za ekstrakciju DNK *Salmonella* spp., ali opisuje i kompletnu proceduru zasnovanu na termalnoj lizi ćelije. Ova procedura obuhvata korak centrifugiranja predobogaćenja pri čemu se bakterijske ćelije koncentrišu na dnu tubice u “dugme”. Bakterijske ćelije se ispiraju, a zatim se vrši liziranje inkubacijom na temperaturi od 95 °C i ponovno centrifugiranje da bi se izvršila precipitacija ostataka ćelijskih zidova (polisaharida i proteina) kako bi dobili ekstrakt nukleinskih kiselina. Tokom studije poređenja metoda izvršeno je i poređenje uticaja različitih procedura ekstrakcije (Chelex i PBS) na krajnji rezultat, odnosno na ostvarene C_q vrednosti. Ostvarene C_q vrednosti nakon “Chelex” ekstrakcije bile su niže nego nakon ekstrakcije procedurom “PBS”. Takođe, ostvarene C_q vrednosti nakon primene “Protokola M” bile su niže nego nakon primene “Protokola A”. Prema ostvarenim rezultatima blaga prednost može se dati “Protokolu M” u kombinaciji sa “Chelex” ekstrakcijom. Međutim, razlike u ostvarenim rezultatima izraženim kvalitativno (genom detektovan ili genom nije detektovan), nakon različitih procedura ekstrakcije su neznatne, tako da se “PBS” procedura ekstrakcije može koristiti kao pouzdana. Njena primena

snižava ukupne troškove izvođenje metode, ali ima i nedostatak koji se ogleda kroz češću pojavu inhibicije PCR, nego nakon "Chelex" ekstrakcije.

Ukupno 100 uzoraka hrane za životinje, ispitano je na prisustvo *Salmonella* spp. real-time PCR metodom za detekciju *invA* (Protokol A) i *ttr* gena (Protokol M), uz paralelno ispitivanje standardnom metodom SRPS EN ISO 6579-1:2017. Primenjena je samo „Chelex“ procedura ekstrakcije DNK, jer je na početku eksperimenta utvrđeno da ekstrakcija procedurom „PBS“ nije adekvatna. Nakon centrifugovanja predobogaćenja formirani „pelet“ se čvrsto lepio za dno tubice tako da je njegovo resuspendovanje primenom „PBS“ procedure bilo otežano. Dodatno, hrana za životinje se obično sastoji od velikog broja različitih sastojaka, za koje se zna da mogu inhibirati PCR (na primer, soli), pa je prilikom ekstrakcije uputno primeniti proceduru koja će inhibitore eliminisati ili njihovo dejstvo ublažiti (Wilson, 1997).

Tokom provere osetljivosti metode ispitano je ukupno 30 veštački kontaminiranih uzoraka potpune krmne smeše za ishranu živine, a nivo kontaminacije iznosio je 0 (5 uzoraka), 1-10 (20 uzoraka) i 10-100 cfu/25 g (5 uzoraka). Rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pokazali su da su primenjeni real-time PCR protokoli osetljivi i mogu detektovati 1-10 cfu u 25 g potpune krmne smeše za ishranu živine (ISO, 2015 a). Interne amplifikacione kontrole (IAC) primenjene tokom ispitivanja (DNA Extraction Control mix 610, Bioline, Velika Britanija; IAC protokola M) u optimalnoj koncentraciji nisu nepovoljno uticale na osetljivost za detekciju ciljnog mikroorganizma. I pored činjenice da u smislu prisustva inhibitornih materija hrana za životinje predstavlja kompleksan matriks (Wilson, 1997), prisustvo inhibitora PCR nije detektovano ni u jednom uzorku. Takođe, hrana za životinje često predstavlja nepovoljan matriks za ispitivanje PCR-om i zbog prisustva prateće flore u velikom broju (Löfström, 2004). Ipak, rezultati oba primenjena protokola pokazala su 100 % slaganje sa standardnom metodom, nakon ispitivanja prirodno i veštački kontaminiranih uzoraka hrane za životinje (Tabela 5.26. Zbirni prikaz rezultata ostvarenih nakon ispitivanja svih uzoraka hrane za životinje). Nije ostvarena razlika pri kvalitativno izraženim rezultatima (genom detektovan ili genom nije detektovan) između primenjenih real-time PCR protokola. Ispitivanjem 9 prirodno kontaminiranih uzoraka potpune krmne smeše za živinu i 18 uzoraka kontaminiranih mešanjem uzoraka kojima je predhodno detektovana *Salmonella* spp., sa uzorcima u kojima *Salmonella* spp. nije detektovana, prosečna C_q vrednost nakon

primene protokola M (26,22) bila je niža u poređenju sa protokolom A (27,90) (Tabela 5.29. Prikaz C_q vrednosti - prirodno kontaminirani i nekontaminirani pomešani sa kontaminiranim uzorcima).

Ispitivanjem 20 veštački kontaminiranih uzoraka hrane za životinje, za nivo kontaminacije (1-10 cfu/25 g) prosečna C_q vrednost takođe je bila niža nakon protokola M (17,07) u poređenju sa protokolom A (19,14). Apsolutna razlika između primenjenih protokola za nivo kontaminacije 10-100 cfu/25 g, bila je još viša ali zbog malog broja uzoraka na tom inokulacionom nivou nije uzeta u razmatranje (Tabela 5.28. Zbirni prikaz ostvarenih C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka hrane za životinje). Prema ostvarenim rezultatima blaga prednost može se dati "Protokolu M" u poređenju sa "Protokolom A", jer je ostvario C_q vrednosti koje su ispitivanjem veštački kontaminiranih uzoraka bile prosečno niže za 2,07, a ispitivanjem prirodno kontaminiranih (\pm nekontaminirani uzorci) za 1,68. Ostvarene C_q vrednosti u pojedinim uzorcima koji si nastali mešanjem kontaminiranih i nekontaminiranih uzoraka, bile su i nakon dvostrukog ili trostrukog razređivanja niže nego u početnom prirodno kontaminiranom uzorku. Ovakav nalaz je bio i očekivan jer je distribucija *Salmonella* spp. u hrani za životinje neujednačena (Löfström, 2004).

Primena prajmera koje je dizajnirao Ranh (Ranh i sar., 1992) i koji su korišćeni tokom ove studije, bili su predmet evaluacije u modifikovanom testu za detekciju *Salmonella* spp. u hrani za životinje klasičnim PCR - om (Löfström, 2004). Međutim, prema dostupnim podacima ovo je prva studija u kojoj real-time PCR metoda za detekciju *invA* gena (Protokol A) primenjena za detekciju *Salmonella* spp. u hrani za životinje. Protokol za detekciju *ttr* gena uspešno je validovan i odobren od strane "Nordic Organization for Validation of Alternative Methods (NordVal)" za detekciju *Salmonella* spp. u hrani za životinje (Löfström i Hoorfar, 2012). Protokol se zasniva na detekciji *ttr* gena (Malorny i sar., 2004), ali je primenjena modifikovana procedura uključujući i upotrebu LNA probe umesto *TaqMan* probe (Josefsen i sar., 2007).

6.2. Razvoj nove metode za detekciju *Salmonella* spp. u hrani

Tokom izrade ove doktorske disertacije, razvijen je i optimizovan potpuno nov real-time PCR protokol za detekciju *Salmonella* spp. u hrani. Prvi korak u razvoju nove metode

podrazumeva odabir ciljne sekvence, pretraživanjem dostupnih podataka, a zatim sledi odabir programa koji će biti upotrebljen za dizajniranje oligonukleotida. Trenutno, nekoliko softverskih paketa, kao što su “Primer Express”, “Primer 3” i “Oligo” dostupno je za dizajniranje prajmera i probe (Raymaekers i sar., 2009). Tokom razvoja ove metode dizajniranje prajmera i *TaqMan* probe zasnovano je na publikovanoj DNK sekvenci *invA* gena *Salmonella* spp., dok je primenom „Primer 3 software“ (Rozen i Skaletsky, 2000) izvršeno dizajniranje prajmera i probe.

Specifičnost seta oligonukleotida (prajmera i probe) mora biti proverena tokom razvoja metode čime se potvrđuje da metoda isključivo detektuje ciljnu sekvencu. Kao prvo, mora se izvršiti “in silico” pretraživanje javno dostupnih DNK sekvenci u bazama podataka. Prema ishodu ove pretrage vrši se odabir dizajniranih prajmera. U sledećoj fazi, izabrani set oligonukleotida mora biti eksperimentalno proveren (Broeders i sar., 2014). Teoretskim ispitivanjem specifičnosti (“in-silico”) prajmera i probe primenom „Basic Local Alignment Search Tool - BLAST“ (Altschul i sar., 1990) u NCBI bazi nukleotida potvrđena je specifičnost odnosu na ostale publikovane sekvence ciljnog gena i odsustvo homologije sa sekvencama drugih mikroorganizama.

Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) publikovala je standard koji jasno definiše karakteristike performansi molekularnih metoda, uključujući i proveru specifičnosti, prilikom koje bi metodu trebalo proveriti ispitivanjem 50 sojeva ciljnog mikroorganizama (*inclusivity*). Dodatno, mora se izvršiti i testiranje metode ispitivanjem ne-ciljnih mikroorganizama, pri čemu se moraju uključiti taksonomski povezani, ali i mikroorganizmi koji nisu blisko povezani (*exclusivity*). U ovu svrhu, trebalo bi ispitati minimum 30 sojeva (ISO, 2015 a).

Analitička specifičnosti dizajniranih prajmera i probe izvršena je ispitivanjem DNK 76 izolata *Salmonella* spp. (*inclusivity*) i DNK 45 izolata pripadnika drugih rodova (*exclusivity*) uključujući i pripadnike familije *Enterobacteriaceae*, kao što su *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* i *Citrobacter youngae*. Metoda je uspešno detektovala sve izolate *Salmonella* spp., sa druge strane nije registrovana amplifikacija DNK izolata koji nisu pripadnici roda *Salmonella*, čime je i eksperimentalno potvrđena njena specifičnost.

Određivanje granice detekcije (LOD) i efikasnosti reakcije izvršeno je primenom dva modela PCR uređaja (AriaMx Real-Time PCR, Stratagene Mx3005P PCR). Granica

detekcije određena je ispitivanjem serije decimalnih razređenja genomske DNK *S. Enteritidis* (ATCC 13076). Ispitivanja su ponovljena 20 puta za svaki stepen razređenja. Stepen razređenja sa najmanjim brojem kopija po reakciji koji je dao 19 pozitivnih rezultata smatra se limitom detekcije metode za nivo poverenja od 95% (LOD_{95%}). Na ovaj način određen limit detekcije real-time PCR metode (protokol MD) iznosi 10 kopija/PCR.

Karakteristike PCR mogu se odrediti iz standardne krive zasnovane na seriji desetostrukih razređenja DNK u okviru dinamičkog opsega (eng. *dynamic range*) metode (Raymaekers i sar., 2009). Dinamički opseg je opseg iznad kojeg povećanje u koncentraciji početnog materijala rezultira odgovarajućim povećanjem produkta amplifikacije (TFS, 2016). Svako razređenje analizira se u triplikatu (Raymaekers i sar., 2009). Iz standardne krive određuju se karakteristike reakcije uključujući „slope” i „correlation coefficient”. Koeficijent korelacije (R^2) je merilo koliko dobro podaci odgovaraju standardnoj krivi. Vrednost R^2 zapravo odražava linearnost standardne krive. U idealnom slučaju, $R^2 = 1$, iako 0,999 je uglavnom maksimalna vrednost. „Slope” log-linearne faze amplifikacije je mera efikasnosti reakcije. Da bi se dobili tačni i ponovljivi rezultati reakcija mora imati efikasnost što bližu 100% (TFS, 2016). „Slope” linearne regresione linije u idealnim uslovima iznosi - 3.3219 pri čemu efikasnost reakcije iznosi 100%, što znači da se broj ciljnih molekula („template”) duplira nakon svakog PCR ciklusa (Raymaekers i sar., 2009). Reakcija mora imati efikasnost između 90 i 110% što odgovara „slope” između - 3,58 i - 3,10 (TFS, 2016). Tokom provere novodizajniranih oligonukleotida efikasnost amplifikacije izračunata je pomoću softvera PCR uređaja prema formuli $e = 10^{-1/s} - 1$ (gde je „s” - „slope” standardne krive). Prosečna efikasnost PCR izračunata iz „slope” standardne krive dobijene ispitivanjem serije razređenja genomske DNK *S. Enteritidis*, iznosila je 96,86%. Prosečna vrednost koeficijenta korelacije (R^2) iznosila je 0,998, a „slope” 3,4. Rezultati pokazuju da metoda poseduje gotovo idealne performanse.

Veoma bitan zahtev koji metoda mora ispuniti je „robustness”, što omogućava njenu implementaciju u drugim laboratorijama. Ispitivanje ove karakteristike podrazumeva podvrgavanje predložene metode malim proceduralnim promenama kako bi se utvrdio njihov uticaj na karakteristike metode (ISO, 2015 a). Da bi procenila „robustness” real-time PCR metode, različiti eksperimentalni uslovi mogu biti neznatno promenjeni, a zatim se vrši njihov uticaj na rezultate ispitivanja. Eksperiment može uključiti manje

greške u pipetiranju, neznata odstupanja aniling temperature, upotrebu različitih real-time PCR uređaja ili master miksa (Broeders i sar., 2014). Robustnost nove metode za detekciju *invA* gena *Salmonella* spp. razvijene tokom izrade ove doktorske disertacije proverena je modifikacijama standardne procedure koje su podrazumevale upotrebu dva različita real-time PCR uređaja (AriaMx Real-Time PCR i Stratagene Mx3005P PCR), pripremu reakcione smeše koristeći dva različita master miksa (Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix, Agilent Technologies, SAD i Path-ID™ qPCR Master Mix, Applied Biosystems) i izvođenje PCR u ukupnoj zapremini miksa od 25 µl, pri čemu je kao „template“ u reakciju dodavano 2 µl i 5 µl DNK (50 kopija DNK *S. Enteritidis* po reakciji). Različite kombinacije pobrojanih parametara su primenjene. Metoda je uspešno primenjena prilikom ispitivanja uzorka u tri ponavljanja za svaku modifikaciju. Nakon optimizacije real-time PCR metode izvršeno je ispitivanje 150 veštački kontaminiranih uzoraka uz paralelno ispitivanje primenom standardne metode (SRPS EN ISO 6579-1:2017) (Tabela 5.33. Ispitivanje veštački kontaminiranih uzoraka primenom real-time PCR metode - Protokol MD). Ekstrakcija DNK izvršena je primenom „Chelex“ protokola. Nivo kontaminacije iznosio je 0 (5 uzoraka), 1-10 (20 uzoraka) i 10-100 cfu/25 g uzorka (5 uzoraka). U dva uzorka u kojima pri nivou kontaminacije 1-10 cfu/25 g *Salmonella* spp. nisu detektovane standardnom metodom, ostvarene su C_q vrednosti bliske graničnoj (39). U jednom uzorku malina ostvarena C_q vrednost bila je 40,80 (negativno slaganje), dok je u uzorku mleka ostvarena C_q vrednost iznosila 37,48 (pozitivna devijacija). Lažno negativnih rezultata nije bilo. Interna amplifikacione kontrola (IAC) primenjena je tokom ispitivanja (DNA Extraction Control mix 610, Bioline, Velika Britanija) u optimalnoj koncentraciji i nije nepovoljno uticala na osetljivost za detekciju ciljnog mikroorganizma (IAC C_q u opsegu od 30-32). Rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pokazali su da je primenjena real-time PCR metoda (Protokol MD) osetljiva i može detektovati 1-10 cfu u 25 g pilećeg mesa, ćevapa, malina, pasterizovanog mleka i kožica sa vrata živine čime je ispunjen uslov osetljivosti metode iz standarda koji definiše performanse molekularnih metoda (ISO, 2015 a).

Poređenje karakteristika nove metode (Protokol MD) sa metodama koje su bile predmet ispitivanja u prvom delu studije (Protokol A i protokol M) izvršeno je ispitivanjem 30 veštački kontaminiranih uzoraka pilećeg mesa. Ekstrakcija DNK izvršena je primenom „Chelex“ protokola. Nivo kontaminacije iznosio je 1-10 (20 uzoraka) i 10-100 cfu/25 g

uzorka (5 uzoraka). Neinkulirani uzorci upotrebljeni su kao negativne kontrole (5 uzoraka). Rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pokazali su da su primenjene real-time PCR metode (Protokol A, protokol M i protokol MD) osetljive i mogu detektovati 1-10 cfu u 25 g pilećeg mesa. Ostvareno je 100 % slaganje rezultata ispitivanih metoda, pri čemu su sve tri metode uspešno detektovale genom *Salmonella* spp. u svim kontaminiranim uzorcima.

Zabeležene su razlike u ostvarenim C_q vrednostima, pri čemu je prosečna C_q vrednost Protokola A iznosila 20,57 (20,96 za nivo kontaminacije od 1-10 cfu/25g i 18,99 za nivo kontaminacije od 10-100 cfu/25g); Protokola M 18,38 (18,68 za nivo kontaminacije od 1-10 cfu/25g i 17,19 za nivo kontaminacije od 10-100 cfu/25g) i Protokola MD 17,62 (17,88 za nivo kontaminacije od 1-10 cfu/25g i 16,57 za nivo kontaminacije od 10-100 cfu/25g). Rezultati pokazuju da je prosečna ostvarena C_q vrednost protokola MD za 0,76 niža od prosečne C_q vrednosti Protokola M i čak za 2,95 niža od prosečne C_q vrednosti protokola A. *Quantification cycle* (C_q) je redni broj ciklusa u kojem fluorescentni signal seče liniju praga (*threshold*) i ova vrednost je obrnuto srazmerna početnoj količini ciljne sekvence. Niska C_q vrednost ukazuje na veliki broj kopija ciljne sekvence, dok visoka C_q vrednost ukazuje na mali broj. Na primer, ako poredimo dva uzorka, uzorak koji sadrži dva puta više kopija ciljne sekvence, ostvariće C_q za jedan ciklus pre (TFS, 2016). Tokom ovog eksperimenta poređenje metoda izvršeno je pod identičnim uslovima (isti uređaj, isti master mix, isti operater), što znači da je Protokol MD u poređenju sa Protokol A i Protokol M pokazao bolje rezultate, odnosno mogućnost da detektuje niže koncentracije DNK. Pri tome su prosečne C_q vrednosti nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka između protokola A i protokola MD bile statistički značajno različite ($p < 0.05$), dok između protokola M i MD nije utvrđena ($p > 0.05$).

Eksterna procena kvaliteta kroz učešće u ispitivanjima osposobljenosti (eng. *Proficiency Testing*) od izuzetne je važnosti za proveru metoda koje se primenjuju u laboratoriji (Raymaekers i sar., 2009). Nakon optimizacije novog protokola za detekciju genoma *Salmonella* spp. real-time PCR metodom, izvršena je i provera kroz učešća u „ispitivanjima osposobljenosti“ organizovanih od međunarodno priznatih i akreditovanih ustanova za tu delatnost. Metoda je uspešno primenjena prilikom „ispitivanja osposobljenosti“ pri čemu je uzorak ovsene kaše (25 g) kontaminiran *Salmonella* Bracknell, a nivo kontaminacije iznosio je 7 cfu/g. Metoda je proverena u još jednom

ciklusu „ispitivanja osposobljenosti“ pri čemu je ispitano pet uzoraka koji sadržali različite *Salmonella* serotipove, uključujući referentne sojeve, ali i sojeve često izolovane u uzorcima poreklom od živine. Uzorci su sadržali čiste kulture *Salmonella* i/ili druge mikroorganizme. Metoda je uspešno detektovala genom *Salmonella* spp. u svim kontaminiranim uzorcima, uključujući i uzorak u kojem je nivo kontaminacije iznosio < 10 cfu *S. Senftenberg* po uzorku.

Rezultati ove studije pokazuju da je razvijena, optimizovana i “in house” validovana nova metoda koja poseduje visoke performanse i koja bi nakon validacije između različitih laboratorija mogla postati međunarodno prihvaćena real-time PCR metoda za detekciju *Salmonella* spp. u hrani (Broeders i sar., 2014).

6.3. Real-time PCR detekcija *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* u hrani

Pored detekcije *Salmonella* spp., real-time PCR metoda daje i mogućnost tipizacije izolovanih *Salmonella* spp., ali i njihovu detekciju direktno u uzorku (Seo i sar., 2004, Maurischat et al., 2015, Prendergast et al., 2013, Xiaohua i sar., 2016, Bugarel et al., 2017, Malorny i sar., 2007, Lee i sar., 2009). Bez obzira da li se real-time PCR metoda primenjuje u cilju detekcije ili tipizacije patogenih mikroorganizama prenosivih hranom, neophodno je da bude validovana u skladu sa nekim od međunarodno priznatih protokola (AOAC, 2012; AFNOR, 2016; NordVal, 2017; ISO, 2016). Razvoj i implementacija brzih metoda za detekciju *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* od izuzetnog su značaja jer su to epidemiološki važni serotipovi koji predstavljaju najčešće uzročnike salmoneloze ljudi. Prema podacima koje je objavila Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA) tri najčešća *Salmonella* serotipa u 2015., sa procentualnim učešćem 69,7% od ukupno potvrđenih slučajeva salmoneloze ljudi, bila su *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i monofazna *S. Typhimurium*, dok je u 2014. godini procentualno učešće iznosilo 69, 6% (EFSA, 2017).

Regulativa Evropske Komisije 1086/2011 (OJEU, 2011) uvela je novi mikrobiološki kriterijum koji se odnosi na detekciju *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* u pilećem mesu. Uvođenjem ovog mikrobiološkog kriterijuma u propise Republike Srbije, metoda koja je bila predmet evaluacije, između ostalog i kroz proširenje validacije u kojem je kao matriks upotrebljeno pileće meso, mogla bi da pronade svoju primenu.

Tokom izrade ove doktorske disertacije detekcija genoma *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* primenom real-time PCR metode izvršena je koristeći prajmere i probe za detekciju *safA* (*S. Enteritidis*) i *fliA-IS200* gena (*S. Typhimurium*), koje su upotrebljene i u prethodno validovanom protokolu za detekciju *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, uključujući i monofaznu *S. Typhimurium*. Ovaj protokol je optimizovan i validovan kao multiplex real-time PCR, koji je uključio 5 pari prajmera i proba, uključujući i prajmere i probu za IAC (Maurischat i sar., 2015).

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije obuhvatio je modifikaciju protokola za detekciju *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, uključujući i monofaznu *S. Typhimurium* (Maurischat i sar., 2015), zatim dodatnu proveru specifičnosti prajmera i proba upotrebom 60 izolata *S. Enteritidis* i 60 izolata *S. Typhimurium* i poređenje dva načina ekstrakcije (Chelex i PBS).

Metoda koja je bila predmet modifikacije tokom validacione studije pokazala je odlične rezultate, ali postoji nekoliko faktora koji ograničavaju njenu primenu u rutinskim ispitivanjima. Na prvom mestu su troškovi izvođenja. Protokol sa 5 fluorescentnih proba u reakciji izuzetno je skup. Dodatno, broj proba ograničava i širu upotrebu u različitim laboratorijama, jer će manji broj real-time PCR uređaja moći da podrži ovaj protokol. Dodatno, sa aspekta propisa nalaz monofazne *S. Typhimurium* tretira se isto kao nalaz bifazne, zbog toga nije neophodno da „screening“ metoda pravi tu razliku. To su osnovni razlozi za modifikaciju predhodno validovanog protokola. Modifikacija je podrazumevala optimizaciju tripleks real-time PCR metode za detekciju *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, bez mogućnosti da napravi razliku između bifazne i monofazne varijante. Upotrebljeni su prajmeri i probe za detekciju *safA* i *fliA-IS200* gena (Maurischat i sar., 2015), pri čemu je proba za *Salmonella* Typhimurium na 5' kraju obeležena sa Hexachloro-Fluorescein (HEX) umesto Yakima Yellow (YY). Umesto interne amplifikacione kontrole (IAC, pUC18/19), kao IAC upotrebljen je DNA Extraction Control mix 610 (Bioline, Velika Britanija). Dva µl ekstrahovane DNK korišćeno je kao template.

Ukupno 120 veštački kontaminiranih uzoraka ispitano je primenom multiplex real-time PCR protokola za detekciju *safA* gena *S. Enteritidis* i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium*, pri čemu su kao template u jednoj reakciji istovremeno bili prisutni DNK oba serotipa i DNK interne amplifikacione kontrole (IAC). Primenjene su dve procedure ekstrakcije –

„Chelex” i „PBS”. Paralelno je izvršeno i ispitivanje standardnom metodom SRPS EN ISO 6579-1:2017. Rezultati ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka pokazali su da je primenjena real-time PCR metoda za detekciju *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* osetljiva i može detektovati ciljni serotip u 25 g piletine i pilećih kožica pri nivou kontaminacije 1-10 cfu. Istovetni rezultati ostvareni su nakon obe procedure ekstrakcije, a ostvareno je i 100% slaganje alternativne i standardne metode (Tabela 5.38. Kvalitativan prikaz rezultata nakon ispitivanja veštački kontaminiranih uzoraka). Prosečna C_q vrednost svih uzoraka ostvarena nakon „Chelex“ ekstrakcije (21,29) u poređenju sa „PBS“ ekstrakcijom (22,97) bila je niža za 1,68. S obzirom da je metoda zadovoljila uslov osetljivosti, obe procedure ekstrakcije mogu biti primenjene, ali bi ipak blagu prednost trebalo dati ekstrakciji prema protokolu „Chelex“.

Specifičnost upotrebljenih prajmera i proba predhodno je proverena (Maurischat i sar., 2015). Tokom *inclusivity* provere prajmera i probe za *safA* gen uspešno je detektovano 104 od 105 sojeva *S. Enteritidis*, dok su prajmeri i proba za *fliA-IS200* gen uspešno detektovali 170 od 171 ispitanog soja bifazne i monofazne *S. Typhimurium*. Za *exclusivity* je upotrebljeno 140 ne-ciljnih *Salmonella* serotipova i 40 sojeva enterobakterija. Nije bilo pozitivnih rezultata ni sa jednom od 40 ispitanih enterobakterija. Signal za gen *safA* detektovan je kod dva soja *S. Moscow* i *S. Blegdam*. Jedan od dva ispitana soja *S. enterica* serovar Farsta dao pozitivan *fliA-IS200* PCR signal (Maurischat i sar., 2015). S obzirom da primenjene modifikacije metode, ne utiču na specifičnost predhodno testiranih prajmera i probe, nije bilo neophodno vršiti njihovu proveru (ISO, 2016). Ipak, provera je izvršena upotrebom 60 izolata *S. Enteritidis* i 60 izolata *S. Typhimurium*, pri čemu je istovremeno proveren i *inclusivity* i *exclusivity*. Na primrer, dodavanjem „template“ poreklom od *S. Enteritidis* u duplex PCR očekivani rezultat je pozitivan signal za *safA* i negativan za *fliA-IS200* gen. Svi izolati su uspešno potvrđeni.

6.4. Karakterizacija *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* izolovanih iz lanca hrane

Detekcija *Salmonella* spp. u uzorcima poreklom od životinja i ljudi, kao i u uzorcima iz okruženja u zoni proizvodnje i rukovanja hranom, predstavlja samo početni korak u identifikaciji izvora i definisanju puteva prenošenja ovog patogenog mikroorganizma.

Tokom epidemioloških studija, uglavnom nije dovoljno da se izolati *Salmonella* tipiziraju do nivoa vrste i serotipa, već je neophodna i primena metoda tipizacije koje mogu napraviti razliku između epidemiološki različitih, ali genetički srodnih izolata (Deng i sar., 2015). Praćenje izvora mikrobioloških zagađivača oduvek je bilo značajno u lancu proizvodnje hrane, međutim napredak u razvoju molekularnih metoda tipizacije pružio je alate koji omogućavaju brže i izuzetno pouzdano određivanje izvora kontaminacije hrane (Moorman i sar., 2010).

Prilikom izbora i ocenjivanja metoda tipizacije osnovne karakteristike koje moraju biti uzete u razmatranje su **reproducibilnost** (dobijanje identičnih rezultata za svaki izolat prilikom ponovljene tipizacije, nezavisno od operatera, mesta i vremena izvođenja), **moć diskriminacije** (procena sposobnosti diferencijacije između dva nesrodna izolata, uzorkovana nasumično iz populacije određene vrste), **stabilnost** (odnosi se na stabilnost markera koji su predmet analiziranja odabranom metodom; na primer, karakteristika ispitana metodom tipizacije, mora ostati stabilna za svaki izolat posle primarne izolacije, tokom skladištenja u laboratoriji i subkultivacije), **sposobnost tipizacije**, eng. „**typeability**“ (odnosi se na sposobnost metode da tipizira sve testirane izolate; može se izraziti kao procenat tipiziranih izolata u odnosu na ukupan broj testiranih - „typeable and non-typeable“) i **epidemiološko slaganje** (rezultati tipizacije bi trebalo da reflektuju, da se slažu i eventualno dodatno rasvetle dostupne epidemiološke podatke; na primer, epidemiološki povezani izolati za koje se predpostavlja da potiču od jednog soja ili jednog klona, pri epidemiji trebalo bi da budu tipizirani kao identični ili povezani tipovi.) (Hunter, 1990, Belkum i sar., 2007; EFSA, 2013).

Nakon ocene prikladnosti metode za tipizaciju određene vrste, zasnovane na osnovnim karakteristikama, potrebno je razmotriti i izvodljivost metode. Izvodljivost metode zavisi od brojnih faktora kao što su obim istraživanja, pravovremenost zahtevanih rezultata, finansijskih i tehničkih resursa, a sledeći parametri moraju biti uzeti u obzir (Belkum i sar., 2007): **fleksibilnost** - odražava opseg vrsta koje se mogu tipizirati sa minimalnim modifikacijama metode; **brzina izvođenja** - odnosi se na ukupno vreme potrebno od prijema bakterijskog izolata do dobijanja kompletnih rezultata tipizacije; **pristupačnost** - odnosi se na dostupnost reagenasa i opreme, kao i na veštine neophodne za izvođenje date metode u laboratoriji; **lakoća korišćenja** - obuhvata tehničku jednostavnost, radno

opterećenje, pogodnost za obradu velikog broja izolata i lakoću bodovanja i tumačenja rezultata; **troškovi** - zavise od velikog broja faktora, kao na primer, početnog kapitala neophodnog za opremu; troškova servisiranja; troškova potrošnog materijala i reagenasa; troškova osoblja, koji posebno zavise od vremena potrebnog za obavljanje procedure, broja neophodnog osoblja i njihovih obuka); **podesnost rezultata tipizacije za kompjutersku analizu i skladištenje u elektronskim bazama podataka.**

Tokom izrade ove doktorske disertacije karakterizacija izolata *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* obuhvatila je molekularnu karakterizaciju (Real-time PCR detekcija *safA* gena *S. Enteritidis* i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium*; Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE), ispitivanje osetljivosti prema antimikrobnim lekovima (Disk - difuziona metoda) i određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (E test).

6.4.1. Tipizacija primenom real-time PCR protokola za detekciju *safA* gena *S. Enteritidis* i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium*

Tipizacija 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i 60 izolata *S. Typhimurium* izvršena je upotrebom real-time PCR protokola za detekciju *safA* gena *S. Enteritidis* i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium* (Maurischat i sar., 2015). Detekcija *safA* gena uspešno je izvršena kod svih 60 izolata *S. Enteritidis*. Sekvenca se i u predhodnoj studiji pokazala kao izuzetno specifična za *S. Enteritidis*, sa izuzetkom *S. Blegdam* i *S. Moscow* (Maurischat i sar., 2015), koje su genetski veoma srodne sa *S. Enteritidis* (Achtman i sar., 2012). Osnova za detekciju *S. Typhimurium* je insercioni element (IS 200) u “*fli*” operonu ovog serotipa, koji predstavlja specifičan, filogenetski važan marker ovog serotipa (Burnens i sar., 1997). Flagela *S. Typhimurium* zahteva više od 50 gena za formiranje i obavljanje funkcije, a jedan od tih gena je i *fliA* gen koji kodira flagela-specifični sigma faktor *S. Typhimurium* (Ikebe i sar., 1999). Tokom ove studije uspešno je detektovan *fliA-IS200* gen svih 60 izolata *S. Typhimurium*.

6.4.2. Genotipizacija *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* primenom PFGE metode

Elektroforeza u pulsirajućem polju je prvi put opisana 1983. godine i veoma brzo je postala popularna metoda za tipizaciju patogenih mikroorganizama prenosivih hranom (Schwartz i sar., 1983). Metoda se zasniva na primeni restrikcioni endonukleaza, enzima koji vrše isecanje kompletne bakterijske DNK na fragmente velikih molekulskih težina (do 1200 kilobaznih parova) (Salem i sar., 2012). Obzirom na to da se fragmenti DNK molekula ove veličine ne mogu razdvajati standardnim elektroforetskim tehnikama, koristi se posebna tehnika elektroforeze, pri čemu se menja smer električnog polja, čime se postiže razdvajanje DNK fragmenata koji se kasnije vizuelizuju bojenjem etidijum bromidom. Tokom kontinualne elektroforeze, DNK fragmenti veličine 30-50 kb migriraju istom brzinom bez obzira na veličinu, što se na gelu uočava kao jedna difuzna traka. Međutim, ukoliko su fragmenti DNK primorani da menjaju smer kretanja tokom elektroforeze, fragmenti različitih veličina biće međusobno razdvojeni. Sa svakom novom preorijentacijom električnog polja, manji DNK fragmenti će početi da se kreću u novom smeru brže nego oni veće molekulske mase. Usled toga, veći DNK fragmenti zaostaju iza, obezbeđujući separaciju od manjih DNK fragmenata (Rašeta, 2014).

Prilikom tipizacije salmonela primarna restrikciona endonukleaza je *XbaI*. Ukoliko se nakon restrikcije primarnim enzimom dobiju PFGE profili koji se ne mogu razlikovati, koriste se sekundarni (*BlnI/AvrII*) ili tercijarni enzimi (*SpeI*) (Ribot i sar., 2006). Standardizacija PFGE metode od strane „PulseNet International“ rezultirala je da PFGE postane najčešće korišćena metoda za identifikaciju izvora epidemija, nadzor i ispitivanje najvažnijih patogenih mikroorganizama prenosivih hranom, uključujući i *Salmonella* spp. (Ribot i sar., 2006).

Diskriminatorna moć PFGE metode zavisi od broja i distribucije restrikcioni mesta u celom genomu, uključujući i ekstrahromozomsku DNK, koji definišu broj i veličinu traka („band - ova“) u PFGE profilu i može biti povećana kombinacijom različitih restrikcioni endonukleaza. U okviru i između laboratorija, reproducibilnost rezultata može biti visoka (Swaminathan et al., 2001). Međutim, metoda je naporna za izvođenje, zahteva dosta vremena (najčešće tri dana), koje se dodatno produžava upotrebom većeg broja restrikcioni enzima, i to se smatra glavnim nedostatkom (Steve i sar., 2004). Pored toga,

zahteva i skupu opremu za izvođenje, visok kvalitet reagenasa i značajno iskustvo u pripremanju agaroznih „plagova“ (Herschleb i sar., 2007). Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) se još uvek koristi kao metoda izbora za tipizaciju *Salmonella* ispod nivoa serovarijeteta, a u budućnosti, performanse novih metoda tipizacije za ove patogene mikroorganizme, biće vrednovane poređenjem sa PFGE.

Ispitivanjem genetske sličnosti 60 izolata *S. Enteritidis*, 12 poreklom od ljudi, 24 poreklom iz hrane i 24 poreklom iz fecesa živine, upotrebom enzima *XbaI*, utvrđeno je 20 različitih PFGE profila (genotipova) Unutar izolata koji pripadaju istom profilu genetska sličnost je iznosila 100% dok je sličnost između različitih genotipova iznosila od 78% do 97%. Najbrojnijem genotipu, sa 100% identičnim PFGE profilom (SENTXB0001) pripada ukupno 22 izolata (36,67%), od kojih je 7 izolata bilo poreklom od ljudi (58,33%), 13 izolata poreklom iz hrane i hrane za životinje (54,17%), a dva izolata poreklom iz fecesa živine (8,33%). U drugi po veličini genotip (SENTXB0002) svrstano je 8 izolata (13,33%), jedan poreklom od ljudi (8,33 %), jedan poreklom iz hrane za životinje (4,17 %) i šest poreklom iz fecesa živine (25%). U genotip SENTXB0003 svrstana su 4 izolata (6,67%), dva poreklom iz hrane (8,33%) i dva poreklom iz fecesa živine (8,33%). U genotip SENTXB0004 svrstana su 3 izolata (5%), 2 poreklom iz hrane i hrane za životinje (8,33%) i jedan poreklom iz fecesa živine (4,17 %). U genotip SENTXB0005 i SENTXB0006 svrstana su po 3 izolata (5%), sva 3 (12,5%) poreklom iz fecesa živine. Tri genotipa (SENTXB0007, SENTXB0008, SENTXB0009) obuhvatila su po 2 (3,33%) izolata. Jedanaest genotipova (od SENTXB00010 do SENTXB00020) obuhvatilo po 1 izolat (1,67%). Zapaža se da su prva dva genotipa obuhvatila 50% ukupnog broja izolata, 33% izolata iz fecesa, 58,34 % izolata iz hrane i hrane za životinje i čak 66,7% izolata poreklom od obolelih ljudi.

Ispitivanjem genetske sličnosti 60 izolata *S. Typhimurium*, 12 poreklom od ljudi, 24 poreklom iz hrane i 24 poreklom iz fecesa živine, upotrebom enzima *XbaI*, utvrđen je 21 različit PFGE profil (genotip). Unutar izolata koji pripadaju istom profilu genetska sličnost je iznosila 100% dok je sličnost između različitih genotipova iznosila od 77% do 98%. Najbrojniji genotip, sa 100% identičnim PFGE profilom, je grupa označena kao STYPXB0001 sa ukupno 21 izolatom (35%), od kojih je 17 (70,83%) izolata bilo poreklom iz hrane, a 4 (16,67%) iz fecesa živine. U drugi po veličini genotip,

STYPXB0002, svrstano je 9 izolata (15%), pet poreklom od ljudi (41,67%), jedan poreklom iz hrane za životinje (4,17) i tri poreklom iz fecesa živine (12,5%). U genotip STYPXB0003 svrstano je 5 izolata (8,33%), jedan poreklom iz hrane za životinje (4,17%) i 4 poreklom iz fecesa živine (16,67). U genotip STYPXB0004 (5%) svrstana su 3 izolata, svi poreklom iz fecesa živine (12,5%). Pet genotipova (od STYPXB0005 do STYPXB0009) obuhvatilo je po 2 izolata (3,33%), a 12 genotipova (od STYPXB0011 do STYPXB0021) po 1 izolat (1,67%). Zapaža se da su prva dva genotipa obuhvatila 50% ukupnog broja izolata, 29,17% izolata iz fecesa, 41,67% izolata poreklom od obolelih ljudi i čak 75 % izolata iz hrane oi hrane za životinje (pri čemu 70,83% pripada prvom genotipu).

6.4.3. Ispitivanje osetljivosti *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove

Prema podacima koje je objavila EFSA u zemljama Evropske Unije tokom 2016. godine izolati *Salmonella* spp. poreklom od obolelih ljudi bili su u visokom procentu rezistentni na sulfonamide (34,6%), ampicilin (29,5%) i tetracikline (29,2%). Izolati *S. Typhimurium* u visokom procentu pokazali su rezistenciju na ampicilin (60,6%), sulfonamide (50,0%) i tetracikline (51,3%), dok su izolati *S. Enteritidis* bili rezistentni na nalidiksičnu kiselinu (18,4%), kolistin (17,5%) i ciprofloksacin / pefloksacin (12,3%). Sa druge strane izolati *Salmonella* spp. poreklom iz mesa živine pokazali su rezistenciju u visokom procentu na ciprofloksacin (64,7%), nalidiksičnu kiselinu (61,5%), sulfametoksazol (55,6%) i tetraciklin (46,1%), dok je rezistencija na ampicilin iznosila 19,7%, a na trimetoprim 14,8% (EFSA i ECDC, 2018).

Tokom eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije 60 izolata ***S. Enteritidis*** ispitano je primenom disk-difuzione metode, pri čemu je 10% izolata pokazalo je rezistenciju na pefloksacin, 5% na ampicilin i 1,67% na tetraciklin. Izolati *S. Enteritidis*, rezistentni nakon ispitivanja disk-difuzionom metodom, ispitani su E-testom. E test je primenjen na izolate koji su pokazali rezistenciju na ciprofloksacin (6 izolata), ampicilin (3 izolata) i tetracikline (1 izolat). Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Enteritidis* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom pokazali su da je 3/3 (100%) rezistentno na ampicilin, 1/1 (100%) rezistentno na tetraciklin i i 3/6 (50%) rezistentno na ciprofloksacin. Fluorohinoloni su u širokoj upotrebi prilikom terapije komplikovanih slučajeva

salmoneloze odraslih osoba, dok se kod dece primenjuju uglavnom cefalosporini treće generacije (EFSA, 2017 a). Međutim, odmah posle početka primene fluorohinolona u terapiji, detektovani su i sojevi salmonela rezistentni na njih (Mølbak i sar., 1999; Chen i sar., 2007). Svetska zdravstvena organizacija (WHO) je 2017. godine salmonele rezistentne na fluorohinolone rangirala kao patogene mikroorganizme visokog prioriteta za istraživanje i razvoj novih antimikrobnih lekova (Tacconelli i sar., 2018). Pojava serotipova *Salmonella* spp. sa smanjenom osetljivošću na fluorohinolone, kao što je ciprofloksacin, često predstavlja rezultat hromozomske mutacije DNK giraze, najčešće u regionu *gyrA* gena (Griggs, 1996), a veoma retko u regionu *gyrB* gena (Pidcock, 2002). I drugi mehanizmi rezistencije mogu dovesti do smanjene osetljivosti *Salmonella* spp. na fluorohinolone, uključujući promenu propustljivosti ćelijske membrane i aktiviranje efluks pumpi (Ruiz, 2003).

Sa aspekta javnog zdravlja poseban problem predstavljaju netifoidne salmonele rezistentne na cefalosporine proširenog spektra, kao što je ceftriakson, koji se uglavnom koristi za lečenje dece (Tassios i sar., 1999; Miriagou i sar., 2004, Su i sar., 2005). Alternativno, azitromicin ili imipenem mogu biti upotrebljeni (Stoycheva i Murdjeva, 2006). Neki serotipovi *Salmonella* spp. počeli su da razvijaju otpor prema cefalosporinima širokog spektra kao rezultat mutiranih gena koji kodiraju za β -laktamaze, enzime koji hidrolizuju antibiotike sa β -laktamskim prstenovima kao što su cefalosporini (Carattoli, 2003). Mnogi tipovi β -laktamaza (CTX-M, TEM, OXA, SHV) identifikovani su u izolatima *Salmonella* (Fernandez Vazquez i sar., 2006; Morris i sar., 2006; González-Sanz i sar., 2009; Tamang i sar., 2011;). Takođe, istraživanja su pokazala da neki izolati *Salmonella* na plazmidima poseduju gen *blaCMY-2* koji proizvodi AmpC β -laktamazu koja dovodi do pojave rezistencije na cefalosporine i amoksisilin / klavulonske kiseline (Foster i sar., 2008; Keelara i Thakur, 2014). Ispitivanjem 60 izolata *S. Enteritidis* i isto toliko izolata *S. Typhimurium*, nije utvrđena rezistencija prema primenjenim cefalosporinima (cefotaksim i ceftazidim) tokom izvođenja disk-difuzione metode u eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije.

Nakon primene disk difuzione metode svih 60 izolata *S. Typhimurium* pokazali su osetljivost na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, gentamicin, meropenem i tigecycline. Rezistencija se kretala od 3,33% na pefloksacin, 11,67 % na trimetoprim, 31,67% na hloramfenikol, 46,67 % na tetraciklin do 50% na amoksisilin. Izolati iz hrane pokazali su

visok stepen rezistencije na hloramfenikol (70,83%), ampicilin (75%) i tetraciklin (75%). Takođe, humani izolati u visokom procenu pokazali su rezistenciju na ampicilin (66,67%), tetraciklin (66,67%) i trimetoprim (50%). Izolati *S. Typhimurium*, rezistentni nakon ispitivanja disk-difuzionom metodom, ispitani su E-testom. E test je primenjen na izolate koji su pokazali rezistenciju na ampicilin (30 izolata), tetracikline (30 izolata), hloramfenikol (19 izolata), trimetoprim (7 izolata) i ciprofloksacin (2 izolata). Rezultati ispitivanja osetljivosti *S. Typhimurium* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom pokazali su da je 2/2 (100%) rezistentno na ciprofloksacin, 19/19 (100%) na hloramfenikol i 7/7 (100%) na trimetoprim, dok je 29/30 (96,7)% rezistentno na ampicilin i tetraciklin.

Porast prevalencije *Salmonella* spp. rezistentnih na više antibiotika (eng. *Multi Drug Resistant - MDR*), ali i rezistencija prema klinički važnim antimikrobnim agensima, kao što su fluorohinoloni i cefalosporini treće generacije, predstavljaju ozbiljan problem širom sveta. Antimikrobni lekovi bili su u širokoj upotrebi u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji kao promotori rasta, kao i u prevenciji bolesti. Veza između upotrebe antimikrobnih lekova kod životinja i pojave rezistentnih bakterija koje mogu dovesti do oboljevanja ljudi je potvrđena (Araque, 2009; Gousia i sar., 2011). Zbog toga je u zemljama Evropske Unije regulativom EC No 1831/2003 zabranjena upotreba svih antimikrobnih lekova kao aditiva za hranu za životinje (OJEU, 2003).

Veliki razlog za zabrinutost na nivou javnog zdravlja bila je pojava *Salmonella* Tyhimurium DT 104, koja je prvi put identifikovana u Velikoj Britaniji 1984 (Threlfall i sar., 1996). Ovaj fagotip ispoljava rezistenciju prema pet antimikrobnih agenasa: ampicilin, hloramfenikol, streptomycin, sulfametoksazol i tetraciklin (Gebreyes et al., 2004; Rayamajhi et al., 2008). Studije pokazuju da serotipovi *Salmonella* spp. koji su rezistentni na više antibiotika (eng. *Multi Drug Resistant - MDR*) imaju sposobnost stvaranja različitih tipova hibridnih plazmida. Većina genetskih kaseti lociranih u okviru ovih plazmida sastoji se od gena rezistencije koji dovode do smanjene osetljivosti na antimikrobne lekove kao što su hloramfenikol, tetraciklin, ampicilin i streptomycin (Guerra i sar., 2002).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja u okviru ove disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Validaciona studija prilikom koje su testirani real-time PCR protokoli za detekciju *invA* i *ttr* gena *Salmonella* spp. u hrani i hrani za životinje pokazala je da ispitani protokoli mogu biti upotrebljeni kao adekvatna zamena standardnoj metodi. Relativna osetljivost alternativnih metoda iznosila je 100%. U zavisnosti od procedure ekstrakcije DNK i primenjenog real-time PCR protokola, relativna tačnost bila je u opsegu od 98.7% do 99.2%. Niže C_q vrednosti ostvarene su primenom real-time PCR protokola za detekciju *ttr* gena *Salmonella* spp.
2. Izvršeno je dizajniranje prajmera i probe i optimizacija novog real-time PCR protokola za detekciju *invA* gena *Salmonella* spp. Ostvareni rezultati pokazali su da nova metoda poseduje visoke performanse i da bi nakon validacije između različitih laboratorija mogla postati međunarodno prihvaćen real-time PCR protokol za detekciju *Salmonella* spp. u hrani.
3. Optimizacija real-time PCR protokola za detekciju *safA* gena *Salmonella* Enteritidis i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium* u pilećem mesu i kožiciama sa vrata živine uspešno je izvršena. Ostvareno je 100% slaganje alternativne i standardne metode, uz osetljivost 1-10 cfu/25 g uzorka.
4. Tipizacija 60 izolata *Salmonella* Enteritidis i 60 izolata *S. Typhimurium* primenom real-time PCR protokola za detekciju *safA* gena *S. Enteritidis* i *fliA-IS200* gena *S. Typhimurium* pokazala je da su odabrane sekvence specifične za ispitivane serotipove.
5. Ispitivanjem genetske sličnosti 60 izolata *S. Enteritidis*, upotrebom enzima *XbaI*, utvrđeno je 20 različitih PFGE profila. Unutar izolata koji pripadaju istom profilu genetska sličnost je iznosila 100% dok je sličnost između različitih genotipova iznosila od 78% do 97%. Dva najzastupljenija genotipa obuhvatila su 50% ukupnog broja izolata (33% izolata iz fecesa, 58,34 % izolata iz hrane i hrane za životinje i čak 66,7% izolata poreklom od obolelih ljudi).
6. Ispitivanjem genetske sličnosti 60 izolata *S. Typhimurium*, upotrebom enzima *XbaI*, utvrđen je 21 različit PFGE profil. Unutar izolata koji pripadaju istom profilu genetska sličnost je iznosila 100% dok je sličnost između različitih genotipova

iznosila od 77% do 98%. Dva najzastupljenija genotipa obuhvatila su 50% ukupnog broja izolata (29,17% izolata iz fecesa, 41,67% izolata poreklom od obolelih ljudi i čak 75 % izolata iz hrane i hrane za životinje).

7. Poređenjem dva različita načina ekstrakcije DNK *Salmonella* spp., niže C_q vrednosti ostvarene su nakon procedure primenom komercijalnog preparata „Insta™ Gene matrix, BioRad (Chelex)“ nego primenom procedure zasnovane na termalnoj lizi ćelije (PBS). Kvalitativno izraženi krajnji rezultati bili su istovetni nezavisno od primenjene procedure ekstrakcije.
8. Primenom disk difuzione metode, svih 60 izolata *S. Enteritidis* (100%) su osetljivi na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, hloramfenikol, gentamicin, meropenem, tigeciklin i trimetoprim, dok je 10% pokazalo rezistenciju na pefloksacin, 5% na ampicilin i 1,67% na tetraciklin. Rezistentni sojevi, ispitani su i E-testom, pri čemu je 3 od 3 izolata (100%) pokazalo rezistentnciju na ampicilin, 1 od 1 (100%) na tetraciklin i 3 od 6 (50%) na ciprofloksacin.
9. Primenom disk difuzione metode, svih 60 izolata *S. Typhimurium* (100%) su osetljivi na azitromicin, cefotaksim, ceftazidim, gentamicin, meropenem i tigeciklin, dok je rezistencija utvrđena kod 3,33% izolata na pefloksacin, 11,67% na trimetoprim, 31,67% na hloramfenikol, 46,67 % na tetraciklin i 50% na amoksicilin. Izolati iz hrane pokazali su u visokom procentu rezistencije na hloramfenikol (70,83%), ampicilin (75%) i tetraciklin (75%). Takođe, humani izolati u visokom procentu pokazali su rezistenciju na ampicilin (66,67%), tetraciklin (66,67%) i trimetoprim (50%). Rezistentni sojevi, ispitani su i E-testom, pri čemu je 2 od 2 (100%) izolata pokazalo rezistenciju na ciprofloksacin, 19 od 19 (100%) na hloramfenikol i 7 od 7 (100%) na trimetoprim, dok je 29 od 30 (96,7) % bilo rezistentno na ampicilin i tetraciklin.

8. LITERATURA

1. Abatcha M.G., Zakaria Z., Goni D.M., Kaur D.G. 2014. Typing of *Salmonella* Species: A Mini-Review. *Journal of Natural Sciences Research*, 4 (5): 13-17.
2. Achtman M., Wain J., Weill F.X., Nair S., Zhou Z., Sangal V., Krauland M.G., Hale J.L., Harbottle H., Uesbeck A., Dougan G., Harrison L.H., Brisse S.. 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*, 8 (6): e1002776.
3. Adams M.R., Moss M.O. 2008. Food microbiology, 3rd edition The Royal Society of Chemistry, UK.
4. AFNOR 2016. Validation of methods of analysis - application in food microbiology. Version 5.1 (Issue on 07-10-2016). AFNOR CERTIFICATION, France.
5. Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.. 1990 Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3): 403-410.
6. Amgulo F.J., Johnson K.R., Tauxe R.V., Cohen M.L. 2000. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microbial Drug Resistance*, 6 (1): 77-83.
7. Anderson A., Pietsch K., Zucker R., Mayr A., Müller-Hohe E., Messelhäusser U., Sing A., Ulrich B., Huber I. 2011. Validation of a Duplex Real-Time PCR for the Detection of *Salmonella* spp. in Different Food Products. *Food Analytical Methods*, 4: 259-267.
8. Anderson E.S., Ward L.R., Saxe M.J., de Sa J.D.. 1987. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Hygiene*, 78 (2): 297-300.
9. Antunes P., Mourão J., Campos J., Peixe L.. 2016.. Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22 (2): 110-121.
10. AOAC 2012. Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. Available from <http://www.aoac.org>.

11. Araque M. 2009. Nontyphoid *Salmonella* gastroenteritis in pediatric patients from urban areas in the city of Merida, Venezuela. *Journal of Infection in Developing Countries*, 3: 28-34.
12. Back D.S., Shin G.W., Wendt M., Heo G.J. 2016. Prevalence of *Salmonella* spp. in pet turtles and their environment. *Laboratory Animal Research*, 32 (3): 166–170.
13. Bacon R.T., Sofos J.N., Belk K.E., Hyatt D.R., Smith G.C. 2002. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from beef animal hides and carcasses. *Journal of Food Protection*, 65 (2): 284-290.
14. Barrow P.A., Methner U.. 2013. *Salmonella* in Domestic Animals; CAB, Germany.
15. Belkum van A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K., Fusing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M.. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 13 (3): 1-46.
16. Bertrand S., Rimhanen-Finne R., Weill F.X., Rabsch W., Thornton L., Perevoscikovs J., van Pelt W., Heck M.. 2008. *Salmonella* infections associated with reptils: the current situation in Europe. *Euro Surveillance*, 13 (24): pii 18902.
17. Blaser M.J., Newman L.S.. A Review of Human Salmonellosis: I. Infective Dose. *Reviews of Infectious Diseases*, 4 (6): 1096-1106.
18. Botteldoorn N., Heyndrickx M., Rijpens N., Grijspeerdt K., Herman L.. 2003. *Salmonella* on pig carcasses: Positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *Journal of Applied Microbiology*, 95 (5): 891-903.
19. Braun S.D., Methner U. 2011. Comparison of DNA isolation methods and detection of *Salmonella* spp. from animal faeces and dust using *invA* real-time PCR. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 124 (5-6): 177-185.
20. Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B. 2000. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (7): 2465-2467.
21. Brichta-Harhay D.M., Arthur T.M., Koohmaraie M.. 2008. Enumeration of *Salmonella* from poultry carcass rinses via direct plating methods. *Letters in Applied Microbiology*, 46 (2): 186-191.

22. Broeders S., Huber I., Grohmann L., Berben G., Taverniers I., Mazzara M., Roosens N., Morisset D. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, *Trends in Food Science & Technology*, 37 (2): 115-126.
23. Bugarel M., Tudor A., Loneragan G.H., Nightingale K.K.. 2017. Molecular detection assay of five *Salmonella* serotypes of public interest: Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, and Hadar. *Journal of Microbiological Methods*, 134: 14-20.
24. Burnens A.P., Stanley J., Sack R., Hunziker P., Brodard I., Nicolet J.. 1997. The flagellin Nmethylase gene *fliB* and an adjacent serovar-specific *IS200* element in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology*, 143 (5): 1539–1547.
25. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T.. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55 (4): 611-622.
26. BVL. 2016. Guidelines for the single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods. Federal Office of Consumer Protection and Food Safety. Germany.
27. Carattoli A. 2003. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Current Issues in Molecular Biology*, 5 (4):113-122.
28. CDC. 2017. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* - PNL05 Last Updated December 2017. Centers for Disease Control and Prevention. USA.
29. Chen J., Zhang L., Paoli G.C., Shi C., Tu S.I., Shi X.. 2010. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 137 (2-3): 168-174.
30. Chen S., Cui S., McDermott P.F., Zhao S., White D.G., Paulsen I., Jianghong M.. 2007. Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 535-542.
31. Chen S., Yee A., Griffiths M., Larkin C., Yamashiro C.T., Behari R., Paszko-Kolva C., Rahn K., DeGrandis S.A.. 1997. The evaluation of a fluorogenic

- polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 35 (3): 239-250.
32. Chua T., Bhagwat A.A.. 2009. A Rapid and Simple DNA Extraction Procedure to Detect *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* from Fresh Produce Using Real-time PCR. *Food Analytical Methods*, 2 (2): 96–101.
 33. Connor B.A., Schwartz E.. 2005. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *The Lancet Infectious Diseases*, 5: 623-628.
 34. Cox N.A., Cason J.A., Richardson L.J.. 2011. Minimization of *Salmonella* Contamination on Raw Poultry. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2:75-95.
 35. Crump J.A., Luby S.P., Mintz E.D.. 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82: 346–353.
 36. Damborg P., Broens E.M., Chomel B.B., Guenther S., Pasmans F., Wagenaar J.A., Weese J.S., Wieler L.H., Windahl U., Vanrompay D., Guardabassi L.. 2016. Bacterial Zoonoses Transmitted by Household Pets: State-of-the-Art and Future Perspectives for Targeted Research and Policy Actions. *Journal of Comparative Pathology*, 155 (1): S27-S40.
 37. Darby J., Sheorey H.. 2008. Searching for Salmonella. *Australian Family Physician*, 37 (10): 806-810.
 38. Delibato E., Rodriguez-Lazaro D, Gianfranceschi M., Cesare A.D., Comin D., Gattuso A., Hernandez M., Sonnessa M., Pasquali F., Sreter-Lancz Z., Saiz-Abajo M.J., Pérez-De-Juan J., Butrón J., Prukner-Radovic E., Horvatek Tomic D., Johannessen G.S., Jakočiūnė D., Olsen J.E., Chemaly M., Gall F.L., González-García P., Lettini A.A., Lukac M., Quesne S., Zampieron C., Santis P.D., Lovari S., Bertasi B., Pavoni E., Proroga Y.T.R., Capuano F., Manfreda G., Medici D.D.. 2014. European validation of Real-Time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in pork meat. *International Journal of Food Microbiology*, 184: 134-138.
 39. Deng X., Shariat N., Driebe E.M., Roe C.C., Tolar B., Trees E., Keim P., Zhang W., Dudley E.G., Fields P.I., Engelthaler D.M.. 2015. Comparative analysis of subtyping methods against a whole-genome-sequencing standard for *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Journal of Clinical Microbiology*, 53: 212-218.

40. Denis E., Bielińska K., Wieczorek K., Osek J. 2016. Multiplex real-time PCRs for detection of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and verotoxigenic *Escherichia coli* in carcasses of slaughtered animals. *Journal of Veterinary Research*, 60 (3): 287-292.
41. Dmitric M., Vidanovic D., Matovic K., Sekler M., Saric Lj., Arsic M., Karabasil N.. 2018. In-house validation of real-time PCR methods for detecting the INV A and TTR genes of *Salmonella* spp. in food. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42 (2): e13455.
42. EFSA. 2013. Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications). *EFSA Journal*, 11(12): 3502. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3502.
43. EFSA. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14 (12):4634. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4634.
44. EFSA. 2017 a. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal*, 15 (2): 4694. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4694
45. EFSA. 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15 (12): 5077. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5077.
46. EFSA and ECDC. 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal*, 16 (2): 5182. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5182
47. EUCAST. 2018 a. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0. Available from <http://www.eucast.org>.
48. EUCAST. 2018 b. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 8.0. Available from <http://www.eucast.org>.

49. Evangelopoulou G. D., Burriel A., Spyrou V.. 2010. A concise history of *Salmonella* spp. nomenclature. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61: 323-329.
50. Ferguson G.C., Heinemann J.A., Kennedy M.A.. 2002. Gene Transfer between *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium inside Epithelial Cells. *Journal of Bacteriology*, 184 (8): 2235-2242.
51. Fernandez Vazquez M., Munoz Bellido J.L., Garcia G.M.I., Garcia-Rodriguez J.A.. 2006. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis producing a TEM-52 beta-lactamase: first report in Spain. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 55 (3): 245-246.
52. Foley S.L., Lynne A.M.. 2008. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, 86 (14): E173-187.
53. Folster J.P., Pecic G., McCullough A., Rickert R., Whichard J.M.. 2011. Characterization of bla(CMY)-encoding plasmids among *Salmonella* isolated in the United States in 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (12): 1289-1294.
54. Forootan A., Sjöback R., Björkman J., Sjögreen B., Linz L, Kubista M.. 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12: 1-6.
55. Foxman B., Zhang L., Koopman J.S., Manning S.D., Marrs C.F.. 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations: EP+I*, 2: 10.
56. Galán J.E., Curtiss R.. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (16): 6383-6387.
57. Gebreyes W.A., Thakur S., Davies P.R., Funk J.A., Altier C.. 2004. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997–2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 997–1003.
58. Giaccone V., Catellani P., Alberghini L.. Food as Cause of Human Salmonellosis. In: *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen* (Edited by Barakat S. M. Mahmoud), InTech, Croatia, 47-72.

59. González-Sanz R., Herrera-León S., de la Fuente M., Arroyo M., Escheita M.A.. 2009. Emergence of extended-spectrum β -lactamases and AmpC-type β -lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64 (6): 1181-1186.
60. Gousia P., Economou V., Sakkas H., Leveidiotou S., Papadopoulou C.. 2011. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8: 27-38.
61. Griggs D.J., Gensberg K., Piddock L.J.. 1996. Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40 (4): 1009-1013.
62. Grimont P.A.D., Weill F.X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
63. Guerra B., Soto S, Helmuth R., Mendoza M.C.. 2002. Characterization of a Self-Transferable Plasmid from *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Clinical Isolates Carrying Two Integron-Borne Gene Cassettes Together with Virulence and Drug Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46 (9): 2977-2981.
64. Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M., Fields P.I., Bockemühl J., Grimont PA, Weill F.X. 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 161 (1): 26-29.
65. Gulsen A.. The Occurrence of *Salmonella* in Various Marine Environments in Turkey. In: *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen* (Edited by Barakat S. M. Mahmoud), InTech, Croatia, 73-90.
66. Gunn J.S., Marshall J.M., Baker S., Dongol S., Charles R.C., Ryan E.T. 2014. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis and gallbladder persistence. *Trends in microbiology*, 22 (11): 648-655.
67. Hale T.L., Formal S.B. 1988. Virulence mechanisms of enteroinvasive pathogens, In: *Virulence mechanisms of bacterial pathogens* (Edited by Roth J.A.). American Society for Microbiology. Washington D.C., 61-69.

68. Hansen-Wester I., Stecher B., Hensel M.. 2002. Type III Secretion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Translocated Effectors and SseFG. *Infection and Immunity*, 70 (3): 1403-1409.
69. Hein I., Flekna G., Krassnig M., Wagner M. 2006. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *Journal of Microbiological Methods*, 66 (3): 538-547.
70. Heinitz M.L., Ruble R.D., Wagner D.E., Tatini S.R.. 2000. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *Journal of Food Protection*, 63 (5): 579-592.
71. Hendriksen S.W..M., Orsel K., Wagenaar JA., Miko A., van Duijkeren E.. 2004. Animal-to-Human Transmission of *Salmonella* Typhimurium DT104A Variant. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (12): 2225-2227.
72. Herschleb J., Ananiev G., Schwartz D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*, 2: 677-684.
73. Hickman-Brenner F.W., Stubbs A.D., Farmer J.J.. 1991. Phage typing of *Salmonella enteritidis* in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (12): 2817-2823.
74. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.. 1993. Kinetic PCR analysis: Real-time PCR monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11 (9): 1026-1030.
75. Hoelzer K., Moreno Switt A.I., Wiedmann M..2011. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Veterinary Research*, 42 (1): 34.
76. Hohmann E.L.. 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clinical Infectious Disease*, 32 (2): 263–269.
77. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H.. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (16): 7276-7280.
78. Hoorfar J., Cook N., Malorny B., Wagner M., De Medici D., Abdulmawjood A., Fach P.. 2003. Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (12): 5835.

79. Ikebe T., Iyoda S., Kutsukake K.. 1999. Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*, 145 (6): 1389-1396.
80. ISO. 2008 a. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Polimerazna lančana reakcija (PCR) za otkrivanje patogenih mikroorganizama u hrani - Zahtevi za pripremanje uzoraka za kvalitativno otkrivanje (SRPS EN ISO 20837:2008). Međunarodna organizacija za standardizaciju, Ženeva, Švajcarska.
81. ISO. 2008 b. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Polimerazna lančana reakcija (PCR) za otkrivanje patogenih mikroorganizama u hrani - Zahtevi za amplifikaciju i otkrivanje za kvalitativne metode (SRPS EN ISO 20838:2008). Međunarodna organizacija za standardizaciju, Ženeva, Švajcarska.
82. ISO. 2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Polimerazna lančana reakcija (PCR) za otkrivanje patogenih mikroorganizama u hrani - Opšti zahtevi i definicije (SRPS EN ISO 22174:2008). Međunarodna organizacija za standardizaciju, Ženeva, Švajcarska.
83. ISO. 2012. Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique (EN ISO/TS 6579-2). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
84. ISO. 2014. Mikrobiologija lanca hrane - Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i tipizaciju Salmonella - Deo 3: Uputstvo za tipizaciju Salmonella spp. (SRPS CEN ISO/TR 6579-3:2014). Međunarodna organizacija za standardizaciju, Ženeva, Švajcarska.
85. ISO. 2015 a. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Lančana reakcija polimeraze (PCR) za detekciju i kvantifikaciju patogenih mikroorganizama u hrani - Karakteristike performansi (SRPS EN ISO 22118:2015). Međunarodna organizacija za standardizaciju, Ženeva, Švajcarska.
86. ISO. 2015 b. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Lančana reakcija polimeraze (PCR) u realnom vremenu za detekciju patogenih mikroorganizama u hrani - Opšti zahtevi i definicije (SRPS EN ISO 22119:2015). Međunarodna organizacija za standardizaciju, Ženeva, Švajcarska.
87. ISO. 2016. Mikrobiologija lanca hrane – Validacija metode – Deo 2: Protokol za validaciju alternativnih (zaštićenih) metoda u odnosu na referentnu metodu SRPS

- EN ISO 16140-2:2016. Međunarodna organizacija za standardizaciju, Ženeva, Švajcarska.
- 88.** ISO. 2017. Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i serotipizaciju Salmonella - Deo 1: Otkrivanje Salmonella spp. (SRPS EN ISO 6579-1:2017). Međunarodna organizacija za standardizaciju, Ženeva, Švajcarska.
- 89.** Issenhuth-Jeanjean S., Roggentin P., Mikoleit M., Guibourdenche M., de Pinna E., Nair S., Fields P.I., Weill F.X. 2014. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165 (7): 526-530.
- 90.** IZJZS. 2013. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2012. godinu. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija.
- 91.** IZJZS. 2014. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2013. godinu. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija.
- 92.** IZJZS. 2015. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2014. godinu. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija.
- 93.** IZJZS. 2016. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2015. godinu. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija.
- 94.** IZJZS. 2017. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2016. godinu. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija.
- 95.** Josefsen M.H., Krause M., Hansen F., Hoorfar J.. 2007. Optimization of a 12-hour Taq-Man PCR-based method for detection of Salmonella bacteria in meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (9): 3040-3048.
- 96.** Karabasil N., Dimitrijević M., Kilibarda N., Teodorović V., Baltić M. Ž. 2008. Značaj salmonela u proizvodnji mesa svinja. *Veterinarski glasnik*, 62 (5-6), 259-274.
- 97.** Karabasil N., Dimitrijević M., Pavlićević N., Teodorović V., Lončina J., Nedeljković-Trailović J., Baltić M.Ž. 2012 b. Nalaz salmonela na površinama u stočnom depou i boksu za omamljivanje svinja. *Veterinarski glasnik*, 66 (3-4), 233-242.
- 98.** Karabasil N., Pavlićević N., Galić N., Dimitrijević M., Lončina J., Ivanović J., Baltić M.Ž. 2012 Nalaz salmonela na trupovima svinja u toku klanja i obrade. *Veterinarski glasnik*, 66 (5-6): 377-386.

99. Keelara S, Thakur S. 2014. Dissemination of plasmid-encoded AmpC β -lactamases in antimicrobial resistant *Salmonella* serotypes originating from humans, pigs and the swine environment. *Veterinary Microbiology*, 173 (1-2): 76-83.
100. Krascenicsová K., Piknová L., Kaclíková E., Kuchta T. 2008. Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 46 (4): 483-487.
101. Kureljusic J., Dmitrić M., Vidanović D., Teodorović V., Kureljušić B., Velhner M., Karabasil N.. 2017. Prevalence of *Salmonella enterica* in slaughtered pigs in Serbia: Serotyping, PFGE-genotyping and antimicrobial resistance. *The Journal Of Infection In Developing Countries*, 11(8): 640-645.
102. Lauer W.F., Sidi C.D., Tourniaire J.P.. 2009. iQ-Check *Salmonella* II: real-time polymerase chain reaction test kit. Performance Tested Method 010803. *The Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 92 (6): 1865-1870.
103. Lee K.M., Runyon M., Herrman T.J., Phillips R., Hsieh J. 2015. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47: 264-276.
104. Lee S.H., Jung B.Y., Rayamahji N., Lee H.S., Jeon W. J., Choi K.S., Kweon C.H., Yoo H.S. 2009. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. *Journal of Veterinary Science*, 10 (1): 43–51.
105. Lehmacher A., Bockemühl J., Aleksic S.. 1995. Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika-powdered potato chips. *Epidemiology and Infection*, 115 (3): 501-511.
106. Liofilchem. 2017. MIC Test Strip Interpretative Criteria and Quality Control. Available from <http://www.liofilchem.net>.
107. Löfström C., Hoorfar J.. 2012. Validation of an open-formula, diagnostic real-time PCR method for 20-h detection of *Salmonella* in animal feeds. *Veterinary Microbiology*, 158 (3-4): 431-435.
108. Löfström C., Knutsson R., Axelsson C.E., Rådström P.. 2004. Rapid and Specific Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feed Samples by PCR after Culture Enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (1): 69-75.

109. Luciana F.C., Paixão T.A., Tsolis R.M., Bäumlner A.J., Santos R.L. 2012. Salmonellosis in cattle: Advantages of being an experimental model. *Research in Veterinary Science*, 93 (1): 1-6.
110. Lynch M.F., Tauxe R.V., Hedberg, C.W.. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, 137 (3): 307-315.
111. Majowicz S.E., Musto J., Scallan E., Angulo F.J., Kirk M., O'Brien S.J., Jones T.F., Fazil A., Hoekstra R.M.. 2010. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50 (6): 882-889.
112. Malorny B., Bunge C., Helmuth R. 2007. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods*, 70 (2): 245-251.
113. Malorny B., Mäde D., Teufel P., Berghof-Jäger C., Huber I., Anderson A., Helmuth R.. 2007 b. Multicenter validation study of two blockcycler - and one capillary-based real-time PCR methods for the detection of *Salmonella* in milk powder. *International Journal of Food Microbiology*, 117 (2): 211-218.
114. Malorny B., Paccassoni E., Fach P., Bunge C., Martin A., Helmuth R.. 2004. Diagnostic Real-Time PCR for Detection of *Salmonella* in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (12): 7046-7052.
115. Mandal P.K., Biswas A.K, Choi K., Pal U.K.. 2011. Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview. *American Journal of Food Technology*, 6 (2): 87-102.
116. Martin Busse. 1995. Media for salmonella, *International Journal of Food Microbiology*, 26 (1): 117-131.
117. Matuschek E., Brown D.F., Kahlmeter G.. 2014. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (4): O255–O266.
118. Maurer J.J. 2006. The mythology of PCR: A warning to the wise. In: *PCR methods in foods* (Edited by Maurer J.). Springer Science + Business Media, New York, USA, 27-40.

119. Maurischat S., Baumann B., Martin A., Malorny B.. 2015. Rapid detection and specific differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and its monophasic variant 4,[5],12:i:- by real-time multiplex PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 193: 8-14.
120. McCabe E.M., Burgess C.M., O'Regan E., McGuinness S., Barry T., Fanning S., Duffy G.. 2011. Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hila* gene of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. *Food Microbiology*, 28 (3): 447-456.
121. McCabe E.M., Burgess C.M., Walsh D., O'Regan E., McGuinness S., Barry T., Fanning, S., Duffy G.. 2011. Validation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hila* gene of *Salmonella enterica* serovars. *Journal of Microbiological Methods*, 84 (1): 19-26.
122. McGuinness S., McCabe E., O'Regan E., Dolan A., Duffy G., Burgess C., Fanning S., Barry T., O'Grady J. 2009. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat. *Meat Science*, 83 (3): 555-562.
123. Medici D.D., Croci L., Delibato E., Pasquale D.S., Filetici E. and Toti, L.. 2003. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6): 3456–3461.
124. Miriagou V., Tassios P.T., Legakis N.J., Tzouveleki L.S. 2004. Expanded spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23 (6): 547-555.
125. Mølbak K., Baggesen D.L., Aarestrup F.M., Ebbesen J.M., Engberg J., Frydendahl K., Gerner-Smidt P., Petersen A.M., Wegener H.C.. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. *The New England Journal of Medicine*, 341 (19): 1420-1425.
126. Monack D.M., Mueller A., Falkow S.. 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 2(9): 747-765.

127. Moorman M., Pruetz P., Weidman M. 2010. Value and Methods for Molecular Subtyping of Bacteria. In: Principles of Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment (Edited by Jeffrey L. Kornacki). Food Microbiology and Food Safety. Springer, New York, NY.
128. Morris D., Whelan M., Corbett-Feeney G., Cormican M., Hawkey P., Li X., Doran G.. 2006. First report of extended-spectrum-beta lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates in Ireland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (4): 1608-1609.
129. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273.
130. Navarro E., Serrano-Heras G., Castaño M.J., Solera J.. 2015. Real-time PCR detection chemistry, *Clinica Chimica Acta*, 439: 231-250.
131. NORDVAL. 2017. NordVal International Protocol for the validation of microbiological alternative (proprietary) methods against a reference method - Protocol No. 1. NordVal International, Denmark.
132. OJEU. 2003. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council on additives for use in animal nutrition. *Official Journal L 268*, 18 October 2003, 29-43.
133. OJEU. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 338: 1-26.
134. OJEU. 2011. Commission regulation (EU) no 1086/2011 of 27 October 2011 on amending Annex II to regulation (EC) no 2160/2003 of the European Parliament and of the Council and annex I to commission regulation (EC) no 2073/2005 as regards *Salmonella* in fresh poultry meat. *Official Journal of the European Union*, L 281: 7-11.
135. Ozkalp B., 2012. Isolation and Identification of *Salmonellas* from Different Samples. In: *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen* (Edited by Barakat S. M. Mahmoud), InTech, Croatia, 124-156.

136. Ozkalp B., 2012. Isolation and Identification of *Salmonellas* from Different Samples. In: *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen* (Edited by Barakat S. M. Mahmoud), InTech, Croatia, 124-156.
137. Pajic M., Karabasil N., Todorovic D., Milanov D., Dmitric M., Lakicevic B., Djordjevic V.. 2015. Kontrola Salmonella u primarnoj proizvodnji brojlerskih pilica. *Tehnologija mesa*, 56 (2): 103-108.
138. Piddock L. J.. 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiology Reviews*, 26 (1): 3-16.
139. Píknová L., Kaclíková E., Pangallo D., Polek B., Kuchta T.. 2005. Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. *Current Microbiology*, 50 (1), 38-42.
140. Prendergast D.M., Grady D.O., McCann A., McCabe E., Fanning S., Egan J., Fanning J., Gutierrez, M. 2012. Application of PCR for rapid detection and serotyping of *Salmonella* spp. from porcine carcass swabs following enrichment in semi-solid agar. *Food Research International*, 45 (2): 993-999.
141. Prendergast D.M., Hand D., Ni Ghallchóir E., McCabe E., Fanning S., Griffin M., Egan J., Gutierrez M.. 2013. A multiplex real-time PCR assay for the identification and differentiation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic serovar 4,[5],12:i:-. *International Journal of Food Microbiology*, 166 (1): 48-53.
142. Pui C.F., Wong W.C., Chai L.C., Tunung R., Jeyaletchumi P., Noor Hidayah M.S., Ubong A., Farinazleen M.G., Cheah Y.K., Son R. 2011. Review Article Salmonella: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal* 18: 465-473.
143. Rabsch W. 2007. *Salmonella* Typhimurium phage typing for pathogens. *Methods in Molecular Biology*, 394: 177-211.
144. Rabsch W., Andrews H.L., Kingsley R.A., Prager R., Tschäpe H., Adams L.G., Bäumlér A.J.. 2002. *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and Its Host-Adapted Variants. *Infection and Immunity*, 70 (5): 2249-2255.
145. Radojičić S., Valčić M., Đuričić B.. 2011. Infektivne bolesti životinja - specijalni deo. Naučna KMD, Beograd.

- 146.** Rahn K., De Grandis S.A., Clarke R.C, McEwen S.A., Galán J.E., Ginocchio C., Curtiss R., Gyles C.L.. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6 (4): 271–279.
- 147.** Rasschaert G., Houf K., Godard C., Wildemauwe C., Pastuszczak-Frak M., De Zutter L.. 2008. Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. *Journal of Food Protection*, 71 (1): 146-152.
- 148.** Rašeta M. 2014. Učestalost nalaza *Salmonella* spp. na trupovima brojlera i njihov značaj za bezbednost hrane. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
- 149.** Rašeta M., Vranić V., Lazić-Branković I., Teodorović V., Bunčić O., Grbić Z., Lakićević B.. 2014. Higijena procesa proizvodnje trupova brojlera. *Tehnologija mesa*, 55 (1), 54-59.
- 150.** Rayamajhi N., Kang S.G., Kang M.L., Lee H.S., Park K.Y., Yoo H.S.. 2008. Assessment of antibiotic resistance phenotype and integrons in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolated from swine. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 70: 1133–1137.
- 151.** Raymaekers M., Smets R., Maes B., Cartuyvels R.. 2009. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23 (3): 145-151.
- 152.** Ribot E.M., Fair M.A., Gautom R., Cameron D.N., Hunter S.B., Swaminathan B., Barrett T.J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3 (1): 59-67.
- 153.** Robert S.T., Lily Y.W., Pius B., Olga V.P. 2012. Molecular technologies for *Salmonella* detection. In: *Salmonella - distribution, adaptation, control measures and molecular technologies* (Edited by Bassam Annous). InTech, UK: 481-504.
- 154.** Rodriguez-Lazaro D., Gonzalez-García P., Delibato E., De Medici D2. García-Gimeno R.M., Valero A, Hernandez M.. 2014. Next day *Salmonella* spp. detection method based on real-time PCR for meat, dairy and vegetable food products. *International Journal of Food Microbiology*, 184: 113-120.

155. Rozen S., Skaletsky H.. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132: 365-386.
156. Ruiz J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 (5): 1109-1117.
157. Salem B.I, Mzoughi R., Aouni M. 2012. Laboratory Typing Methods for Diagnostic of *Salmonella* Strains, the “Old” Organism That Continued Challenges. In: *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen* (Edited by Barakat S. M. Mahmoud), InTech, Croatia, 349-373.
158. Sánchez-Vargas F.M., Abu-El-Haija M.A., Gómez-Duarte O.G.. 2011. Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 9 (6): 263-277.
159. Schmieger H. 1999. Molecular Survey of the *Salmonella* Phage Typing System of Anderson. *Journal of Bacteriology*, 181 (5): 1630-1635.
160. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. 2012. PCR inhibitors occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113 (5): 1014-1026.
161. Schrank I. S., Mores M.A., Costa J. L., Frazzon A.P., Soncini R., Schrank A., Vainstein M.H., Silva S.C.. 2001. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Veterinary Microbiology*, 82 (1): 45-53.
162. Schwartz D.C., Saffran W., Welsh J., Haas R., Goldenberg M., Cantor C.R. 1983. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 47: 189-195.
163. Schwarz S., Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* 32: 201–225.
164. Sefton A.M. 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs*, 62 (4): 557-566.
165. Seo K.H., Valentin-Bon I.E., Brackett R.E., Holt P.S.. 2004. Rapid, Specific Detection of *Salmonella* Enteritidis in Pooled Eggs by Real-Time PCR. *Journal of Food Protection*, 67 (5): 864-869.

166. SG. 2010. Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa. Službeni glasnik RS, 72/2010.
167. Sharma V.K., Carlson S.A.. 2000. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. Applied and Environmental Microbiology, 66: 5472-5476.
168. Shu-Kee E., Priyia P., Nurul-Syakima A.M., Hooi-Leng S., Kok-Gan C., Learn-Han Lee. 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance, Frontiers in Life Science, 8 (3): 284-293.
169. Silva, F.V.M., Gibbs P.A. 2012. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. Food Research International 45 (2): 695-699.
170. Steve S.Y., Pendrak M.L., Abela-Ridder B., Punderson J.W., Fedorko D.P., Foley S.L.. 2004. An overview of Salmonella typing: Public health perspectives. Clinical and Applied Immunology Reviews, 4 (3): 189-204.
171. Stevens M.P., Humphrey T.J., Maskell D.J.. 2009. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 364 (1530): 2709-2723.
172. Stoycheva M.V., Murdjeva M.A..2006. Antimicrobial therapy of salmonellosis - current state and perspectives. Folia Medica (Plovdiv), 48 (1): 5-10.
173. Su L.H., Wu T.L., Chia J.H., Chu C., Kuo A.J., Chiu C.H.. 2005. Increasing ceftriaxone resistance in *Salmonella* isolates from a university hospital in Taiwan. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 55 (6): 846-852.
174. Su L.H., Chiu C.H.. 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Medical Journal, 30 (3): 210-219.
175. Subcommittee I. S. (The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology). 1934. The Genus *Salmonella* Lignières, 1900. The Journal of Hygiene, 34 (3): 333-350.
176. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M., Outtersson K., Patel J., Cavalieri M., Cox E.M., Houchens C.R., Grayson M.L., Hansen P., Singh N., Theuretzbacher U., Magrini N. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis The Lancet Infectious Diseases, 18 (3): 318-327.

177. Tamang M.D., Nam H.M., Kim T.S., Jang G.C., Jung S.C., Lim S.K.. 2011. Emergence of Extended-Spectrum β -Lactamase (CTX-M-15 and CTX-M-14)-Producing Nontyphoid *Salmonella* with Reduced Susceptibility to Ciprofloxacin among Food Animals and Humans in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (7): 2671-2675.
178. Tassios P.T., Gazouli M., Tzelepi E., Milch H., Kozlova N., Sidorenko S., Legakis N.J., Tzouvelekis L.S.. 1999. Spread of a *Salmonella* Typhimurium clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (11): 3774-3777.
179. TFS. 2016. Real time PCR handbook - 3rd edition. Thermo Fisher Scientific, USA. Retrieved from: <https://www.thermofisher.com>.
180. Thorns C.J.. 2000. Bacterial food-borne zoonoses. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 19 (1): 226-239.
181. Threlfall E. J., Frost J.A., Ward L.R., Rowe B.. 1996. Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella* typhimurium. *Lancet*, 47 (9007): 1053-1054.
182. Threlfall E.J., Frost J.A. 1990. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 5–16.
183. Tindall B.J., Grimont P.A., Garrity G.M., Euzéby J.P.. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 521-524.
184. Tizard I. 2004. Salmonellosis in wild birds. *Similar in Avian and Exotic Pet Medicine*, 13 (2): 50-66.
185. Uyttendaele M., Vanwildemeersch K., Debevere J.. 2003. Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology*, 37 (5): 386-391.
186. Vazquez-Novelle M.D., Pazos A.J., Abad M., Sanchez J.L., Perez-Paralle M.L.. 2005. Eight-hour PCR-based procedure for the detection of *Salmonella* in raw oysters. *FEMS Microbiology Letters*, 243 (1): 279-283.

- 187.** Velge P., Wiedemann A., Rosselin M., Abed N., Boumart Z., Chaussé A.M., Grépinet O., Namdari F., Roche S.M., Rossignol A., Virlogeux-Payant I. 2012. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *Microbiology Open*, 1(3): 243-258.
- 188.** Walsh C., Duffy G., Nally P., O'Mahony R., McDowell D., Fanning S. 2008. Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella* Typhimurium DT 104 to *Escherichia coli* K12 in food. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 210-215.
- 189.** Wang X., Jothikumar N., Griffiths M.W. 2004. Enrichment and DNA Extraction Protocols for the Simultaneous Detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in Raw Sausage Meat with Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Food Protection*, 67 (1): 189-192.
- 190.** Ward L.R., de Sa J.D., Rowe B. 1987. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiology and Infection*, 99 (2): 291-294.
- 191.** WHO 2015. Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation. World Health Organization. Dostupno na: <http://www.who.int/>
- 192.** Wiedemann A., Virlogeux-Payant I., Chaussé A.M., Schikora A., Velge P.. 2014. Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology*, 5:791.
- 193.** Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (10): 3741-3751.
- 194.** Winfield M.D., Groisman E.A.. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (7): 3687-3694.
- 195.** Winokur P.L., Brueggemann A., DeSalvo D.L., Hoffmann L., Apley M.D., Uhlenhopp E.K., Pfaller M.A., Doern G.V. 2000. Animal and Human Multidrug-Resistant, Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Isolates Expressing a Plasmid-Mediated CMY-2 AmpC β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (10): 2777-2783.
- 196.** Wong D.M.A.L.F, Hald T., van der Wolf P.J., Swanenburg M. 2002. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Production Science*, 76 (3): 215-222.

197. Xiaohua H., Xuebin X., Li K., Liu B., Yue T.. 2016. Identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and variants using a novel multiplex PCR assay. *Food Control*, 65: 152-159.
198. Zhang Z., Xiao L., Lou Y., Jin M., Liao C., Malakar P.K., Pan Y., Zhao Y.. 2015. Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw shrimp. *Food Control*, 51: 31-36.
199. Zhao X., Lin C.W., Wang J., Oh D.H.. 2014. Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (3): 297-312.
200. Zheng Q., Miks-Krajnik M., Yang Y., Xu W., Yuk H.G. 2014. Real-time PCR method combined with immunomagnetic separation for detecting healthy and heat-injured *Salmonella* Typhimurium on raw duck wings. *International Journal of Food Microbiology*, 186: 6-13.

BIOGRAFIJA

Marko Dmitrić rođen je 25.2.1987. godine. Osnovnu školu završio je u Kotraži, a gimnaziju prirodnomatematičkog smera u Čačku. Prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2006/2007. godine. Integrisane osnovne i master akademske studije završio je 2012. godine sa prosečnom ocenom položenih ispita 9,2. U periodu od 1.4.2013. do 31.3.2014. stažirao je u veterinarskoj ambulanti “Srbovet D.O.O.” iz Kraljeva i Veterinarskom specijalističkom institutu “Kraljevo”. Od 1.4.2014. zaposlen je u Veterinarskom specijalističkom institutu “Kraljevo”, gde obavlja poslove saradnika u Odeljenju za ispitivanje sirovina animalnog porekla, hrane i vode.

Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2013/2014. godine. Ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija položio sa prosečnom ocenom 9,67.

U junu 2016. godine završio je specijalizaciju na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

Kao autor ili koautor do sada je objavio 9 radova u časopisima od nacionalnog i međunarodnog značaja. Kao prvi autor objavio je 3 rada u časopisima međunarodnog značaja.

Oženjen je i ima dvoje dece.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Marko Dmitrić

broj upisa 15/09

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„DETEKCIJA SALMONELA VRSTA I KARAKTERIZACIJA *Salmonella* Enteritidis i

***Salmonella* Typhimurium POREKLOM IZ LANCA HRANE“**

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 2.

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

Ime i prezime autora Marko Dmitrić

Broj upisa 15/09

Studijski program Doktorske akademske studije

Naslov rada „DETEKCIJA SALMONELA VRSTA I KARAKTERIZACIJA *Salmonella*
Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium POREKLOM IZ LANCA HRANE“

Mentor Prof. dr Neđeljko Karabasil i dr Dejan Vidanović

Potpisani Marko Dmitrić

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„DETEKCIJA SALMONELA VRSTA I KARAKTERIZACIJA *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium POREKLOM IZ LANCA HRANE“

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____
