

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Miloš N. Arsić

**IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA SOJEVA *YERSINIA*
ENTEROCOLITICA KOD SVINJA NA LINIJI KLANJA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Miloš N. Arsić

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF
YERSINIA ENTEROCOLITICA STRAINS IN PIGS ON
THE SLAUGHTERLINE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI

Dr **Nedjeljko Karabasil**, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr **Ljubiša Šarić**, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Novom Sadu, Institut za prehrabmene tehnologije Novi Sad

ČLANOVI KOMISIJE

Dr **Nedjeljko Karabasil**, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr **Ljubiša Šarić**, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Novom Sadu, Institut za prehrabmene tehnologije Novi Sad

Dr **Mirjana Dimitrijević**, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr **Marko Dmitrić**, naučni saradnik,
Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo“

Dr **Miloš Petrović**, docent,
Univerzitet u Nišu, Poljoprivredni fakultet Kruševac

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Želeo bih da izrazim najdublju zahvalnost svom mentoru prof. dr Neđeljku Karabasilu, na njegovoj nepokolebljivoj podršci, smernicama i mentorstvu tokom mog akademskog puta. Njegovo stručno znanje, pronicljive povratne informacije i ohrabrenje bili su od neprocenjive vrednosti za moje istraživanje, osećam se srećnim što imam priliku da radim sa njim.

Dr Ljubiši Šariću hvala na izdvojenom vremenu, korisnim komentarima i idejama u toku sprovođenja eksperimenta i pisanja ove doktorske disertacije, koji su dali pečat ovom radu.

Posebnu zahvalnost dugujem Doc. dr Milošu Petroviću, direktoru Uprave za veterinu, na ukazanom poverenju i pruženoj šansi za napredovanjem u karijeri. Ovo putovanje bi bilo mnogo teže bez njegovog zalaganja, energije i nesebične podrške pružene meni.

Takođe, želim da se zahvalim članovima komisije, prof. dr Mirjani Dimitrijević i Dr Marku Dmitriću na njihovom vremenu, stručnosti i konstruktivnoj kritici. Njihove sugestije su bile ključne u oblikovanju ove doktorske disertacije.

Zahvalan sam svojim kolegama i prijateljima iz Veterinarskog specijalističkog instituta „Niš“ na pruženoj podršci, podsticajnom akademskom okruženju i motivaciji tokom uspona i padova pri izradi doktorske disertacije.

Posebno želim da se zahvalim Dr Dejanu Vidanoviću i Dr Nataši Galić na njihovoj neizmernoj podršci i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dela rada.

Prijatelju i kolegi Ivanu Vičiću posebno hvala na stručnoj pomoći prilikom statističke obrade podataka i pisanja rezultata.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima Mileni i Nenadu, za njihovu безусловnu ljubav, podršku i ohrabrenje. Njihovo verovanje u mene održalo me je u teškim vremenima i inspirisalo me da ostvarim svoje snove. Mojoj supruzi Jovani, koja je učinila pisanje ove teze lakšim hvala na razumevanju, strpljenju i svim lepim zajedničkim trenucima.

Hvala vam svima od srca.

Miloš Arsić

Svom dedi Đorđu...

IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA SOJEVA *YERSINIA ENTEROCOLITICA* KOD SVINJA NA LINIJI KLANJA

Sažetak:

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je utvrđivanje ukupne prevalencije *Y. enterocolitica* kod svinja i karakterizacija izolata u odnosu na bioserotip, prisustvo gena virulencije, genetski diverzitet i otpornost na antimikrobne lekove. Proučavani su mogući faktori rizika u proizvodnji svinja povezani sa infekcijom *Y. enterocolitica* koji nastaju u fazama pre klanja i za vreme klanja. Tokom četiri sezone pregledano je ukupno 960 uzoraka tonzila svinja poreklom sa farmi otvorenog i zatvorenog tipa zaklanih na tri različite klanice. Svinje su bile poreklom sa ukupno 30 različitih farmi raspoređenih u pet regiona u Republici Srbiji. Prilikom svakog uzorkovanja popunjava se upitnik o uslovima na farmi kao i uslovima u toku transporta i vremenu boravka u depou klanice. Ukupna prevalencija *Y. enterocolitica* kod svinja iznosila je 10,4%. Najčešći bioserotip *Y. enterocolitica* bio je BT4/O:3 (81,6%). Patogenost 63 izolata *Y. enterocolitica* BT4/O:3 (uključujući i BT4 S-/O:3), potvrđena je prisustvom gena virulencije *ail* i *ystA* i odsustvom gena *ystB* (100%). Karakterizacijom 63 potvrđena izolata pomoću PFGE identifikovano je pet različitih genotipova sa zajedničkim identičnim genetskim profilima (100% sličnosti) unutar svakog genotipa. Četiri genotipa potiču sa oba tipa farmi i sa tri različite klanice, što ukazuje na visoku genetsku stabilnost i prostornu cirkulaciju patogenog mikroorganizma. Disk difuzionom metodom utvrđeno je da su svi izolati *Y. enterocolitica* bili su osetljivi na cefotaksim, ceftazidim, meropenem, gentamicin, trimetoprim i sulfonamide. Izolati koji potiču sa zatvorenog tipa farmi bili su rezistentni samo na ampicilin, dok je rezistencija na ampicilin, nalidiksinsku kiselinu, tetraciklin i hloramfenikol utvrđena na farmama otvorenog tipa. Metodom multivarijantne logističke regresije utvrđeni su faktori rizika koji zajedno doprinose pojavi infekcije svinja sa *Y. enterocolitica* i uključuju farme otvorenog tipa (odnos verovatnoće, OR=2,31, 95% interval poverenja, CI=1,41-3,79, $p<0,001$), vreme boravka u depou klanice od 3-6h (OR=1,63, CI=1,04-2,58, $p<0,035$) i zimsku sezonu (OR=3,85, CI=2,01-7,36, $p<0,001$). Pored opšte karakterizacije izolata *Y. enterocolitica* identifikacija glavnih rizika povezanih sa infekcijom omogućava bolju primenu preventivnih mera za smanjenje pojave i distribucije infekcije *Y. enterocolitica*.

Ključne reči: *Yersinia enterocolitica*, svinja, faktori rizika, bio-serotipizacija, PFGE, geni virulencije, antimikrobna rezistencija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija mesa

UDK broj: 636.4.033:579.84(043.3)

637.5:636.4]:614.3(0.43.3)

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* STRAINS IN PIGS ON THE SLAUGHTERLINE

Abstract:

The aim of the research within this doctoral dissertation was to determine prevalence of *Y. enterocolitica* in pigs of slaughter age and to characterize the isolates in relation to bio-serotype, the presence of virulence genes, genetic diversity, and antimicrobial resistance. Moreover, possible risk factors associated with *Y. enterocolitica* infection during the preharvested and harvested phase of pig production were studied. During four seasons, a total of 960 tonsil samples from pigs originating from *farrow to finish* and *fattening* farms slaughtered at three different slaughterhouses were examined. The pigs came from a total of 30 different farms distributed in five regions in Serbia. During each sampling, a questionnaire was filled out about the conditions on the farm as well as the conditions during transport and the time of stay in the lairage. The overall *Y. enterocolitica* prevalence in the pigs was 10.4%. The most common *Y. enterocolitica* bio-serotype was 4/O:3, accounting for 81.6% of investigated isolates. The pathogenicity of 63 *Y. enterocolitica* 4/O:3 (including 4S-/O:3) isolates, originating from all infected farms, was confirmed by the presence of both the *ail* and *ystA* virulence-associated genes and the absence of *ystB* gene (100%). Characterization with PFGE of 63 confirmed *Y. enterocolitica* isolates identified five different genotypes with shared identical genetic profiles (100% similarity) within each genotype. The four genotypes originate from both types of farms and from three different slaughterhouses, which indicates high genetic stability and spatial circulation of the pathogen. Using the disk diffusion method, it was determined that all isolates of *Y. enterocolitica* were susceptible to cefotaxime, ceftazidime, meropenem, gentamicin, trimethoprim and sulfonamides. Isolates originating from farrow-to-finish farms were only resistant to ampicillin, while resistance to nalidixic acid, tetracycline, and chloramphenicol at fattening farms was also observed. Using the method of multivariate logistic regression, risk factors that together affect *Y. enterocolitica* pig infection were determined and include fattening farms (odds ratio, OR=2.31, 95% CI=1.41–3.79, $P<0.001$), a 3–6 h lairage period (OR=1.63, 95% CI=1.04–2.58, $P<0.035$) and winter season (OR=3.85, 95% CI=2.01–7.36, $P<0.001$). In addition to the overall characterization of *Y. enterocolitica* isolates, identification of the main risks associated with infection allows better application of preventive measures to reduce the occurrence and distribution of *Y. enterocolitica* infection.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, pigs, risk factors, bio-serotyping, PFGE, virulence genes, antimicrobial resistance,

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific subfield: Meat hygiene and technology

UDK number: 636.4.033:579.84(043.3)

637.5:636.4]:614.3(0.43.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Klasifikacija i taksonomija <i>Yersinia</i> spp.	3
2.2. Osnovne karakteristike <i>Y. enterocolitica</i>	3
2.3. Kulturelne i biohemijske osobine <i>Y. enterocolitica</i>	4
2.4. Rezistencija <i>Y. enterocolitica</i> prema antimikrobnim lekovima.....	5
2.5. Osnovne karakteristike jersinioze kod ljudi	5
2.6. Incidencija jersinioze kod ljudi	6
2.7. Nalaz <i>Y. enterocolitica</i> u lancu proizvodnje hrane	7
2.7.1. Rezervoari <i>Y. enterocolitica</i>	7
2.7.2. Nalaz <i>Y. enterocolitica</i> kod svinja.....	8
2.7.3. Faktori rizika na farmama svinja	8
2.7.4. Nalaz <i>Y. enterocolitica</i> u klanicama i rizik od kontaminacije mesa tokom klanja ...	9
2.7.5. Primena dobre higijenske prakse u cilju smanjenja kontaminacije	9
2.7.6. Kategorizacija rizika na farmama i klanicama	10
2.8. Metode za detekciju <i>Y. enterocolitica</i>	11
2.9. Monitoring i nadzor nad <i>Y. enterocolitica</i>	12
3. CILJ I ZADACI.....	13
4. MATERIJAL I METODE	14
4.1. Podaci o uzorkovanim svinjama i farmama porekla	14
4.2. Klanice – opis linije klanja.....	17
4.3. Uzorkovanje tonzila sa trupova zaklanih svinja	17
4.4. Izolacija i identifikacija <i>Y. enterocolitica</i>	18
4.4.1. Izolacija <i>Y. enterocolitica</i>	18
4.4.2. Identifikacija <i>Y. enterocolitica</i>	21
4.4.3. Određivanje biotipova <i>Y. enterocolitica</i>	21
4.4.4. Serotipizacija <i>Y. enterocolitica</i>	21
4.5. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)	23
4.6. Detekcija gena virulencije <i>Y. enterocolitica</i>	23

4.7. Testiranje osjetljivosti <i>Y. enterocolitica</i> na antimikrobne agense	24
4.8. Statistička analiza i utvrđivanje faktora rizika	25
5. REZULTATI	26
5.1. Podaci iz lanca hrane i uzorkovanje	26
5.2. Nalaz <i>Y. enterocolitica</i> u uzorcima tonzila	28
5.3. Rezultati fenotipizacije (bioserotipizacije) izolata <i>Y. enterocolitica</i>	40
5.4. Distribucija izolata <i>Y. enterocolitica</i> u odnosu na bioserotip.....	42
5.5. Rezultati ispitivanja gena virulencije <i>Y. enterocolitica</i>	43
5.6. Rezultati genotipizacije izolata <i>Y. enterocolitica</i> izolovanih iz tonzila svinja	43
5.7. Rezultati ispitivanja osjetljivosti izolovanih bioserotipova <i>Y. enterocolitica</i> na antimikrobne agense disk-difuzionom metodom.....	45
5.8. Analiza faktora rizika	47
6. DISKUSIJA	50
7. ZAKLJUČCI.....	61
8. LITERATURA	63

1. UVOD

Hrana predstavlja izvor visokovrednih nutrijenata kao što su proteini, ugljeni hidrati, masti, vitamini i minerali. Kao takva, sa druge strane, predstavlja idealan matriks za razvoj patogenih mikroorganizama koji dovode do pojave različitih bolesti prenosivih hranom. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization* - WHO) bolesti prenosive hranom obuhvataju veliki broj različitih oboljenja koje nastaju kao posledica konzumiranja hrane kontaminirane raznim mikroorganizmima, a među njima u najvećem broju dolazi do pojave bolesti kampilobakterioze, salmoneloze i jersinioze. Iako je proizvodnja hrane danas u velikoj meri napredovala primenom mera dobre proizvođačke i higijenske prakse kao i primenom HACCP sistema (eng. *Hazard Analysis Critical Control Points*), industrija hrane se stalno sreće sa novim izazovima u proizvodnji bezbedne hrane kada su u pitanju bolesti prenosive hranom.

U toku 2021. godine ukupno je prijavljeno 22.381 slučaj bolesti koje se prenose hranom, među kojima su kao najčešći uzročnici identifikovani bakterije, zatim bakterijski toksini, virusi i paraziti. Jersinioza izazvana sa *Yersinia enterocolitica* navodi se kao treća najčešća zoonoza koja se prenosi sa asimptomatskih, zdravih svinja, na ljude putem sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa, pri čemu može izazvati oboljenje i pri niskim infektivnim dozama. Prema izveštaju Evropske agencije za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority* - EFSA) u toku 2021. godine ukupan broj prijavljenih i potvrđenih slučajeva jersinioze bio je 6.789 (EFSA i ECDC, 2022). Kod ljudi se najčešće izoluju bioserotip 4/O:3, zatim 2/O:9 i 2/O:5, koji su zapravo i najčešće prijavljeni uzročnici bolesti, (EFSA i ECDC, 2018). Nekoliko država članica Evropske unije u toku 2021. godine prijavilo je pozitivne nalaze *Y. enterocolitica* u sirovoj hrani ili u hrani spremnoj za konzumiranje koja je sadržala meso svinja (EFSA i ECDC, 2022).

Najveći broj prijavljenih slučajeva jersinioze bio je u Nemačkoj i Francuskoj i zajedno čine 49,5% od ukupnog broja prijavljenih slučajeva u Evropskoj uniji. Kod država članica Evropske Unije koje su u našem okruženju najviše slučajeva bilo je potvrđeno u Rumuniji gde je registrovano 15 slučajeva, zatim u Hrvatskoj 14 slučajeva i u Bugarskoj gde je zabeleženo 5 slučajeva (EFSA i ECDC, 2022). U Republici Srbiji u toku 2021. godine zabeležen je 21 slučaj jersinioze (IZJZS, 2022), međutim, stvarni broj slučajeva verovatno je mnogo veći ali zbog lakše kliničke slike i ne javljanja lekaru ostaju neprijavljeni.

Jersinioza ljudi nastaje unošenjem kontaminirane hrane i vode sa *Y. Enterocolitica*, koja kod ljudi izaziva simptome infekcije gastrointestinalnog trakta i može se manifestovati kao akutni gastroenteritis, terminalni ileitis ili mezenterični limfadenitis (Bottone, 1999). Kao glavni izvor zaraze navode se zdrave, asimptomatske svinje koje kao takve dolaze na klanicu i predstavljaju izvor infekcije za druge svinje tokom boravka u depou klanice. Nepoštovanje principa dobre higijenske prakse za vreme klanja može predstavljati rizik od dalje unakrasne kontaminacije trupova svinja na klanici.

Prva infekcija sa *Y. enterocolitica* zabeležena je u Njujorku/SAD 1939. godine (Schleifstein i Coleman, 1939). Veću pažnju na ovaj mikroorganizam skrenuo je događaj iz 1976. godine u školskom kampu u Njujorku (SAD), kada se 222 dece i zaposlenih inficirali kontaminiranim čokoladnim mlekom. Kao posledica infekcije 12 obolelih je imalo simptome upale slepog creva i operisano je bezpotrebno (Black i sar., 1978). Tom prilikom se došlo do saznanja da infekcija sa *Y. enterocolitica* može izazvati simptome slične simptomima upale slepog creva. Druga veća registrovana epidemija bila je 1983. godine kada je u letnjem kampu obolelo 239 osoba, od kojih je petoro podvrgnuto operaciji slepog creva. Uzročnik bolesti u obe epidemije bila je *Y. enterocolitica* serotip O:8 (Shayegani i sar., 1983).

U Srbiji do sada nije bilo dostupnih podataka o nalazu *Y. enterocolitica* kod svinja na liniji klanja. Ova studija predstavlja prvo istraživanje o nalazu patogenih biotipova *Y. enterocolitica* u lancu proizvodnje mesa svinja u Srbiji. Studija je imala za cilj utvrđivanje prevalencije kod svinja na klanici, istraživanje mogućih faktora rizika u fazama pre klanja i tokom samog klanja, karakterizaciju izolata u odnosu na bioserotip, prisustvo gena virulencije, genetski diverzitet i osetljivost na antimikrobne lekove.

U ovoj studiji dobijen je koristan uvid u faktore rizika koji ukazuju da razlike u sistemima upravljanja i primene principa dobre prakse mogu uticati na nalaz *Y. enterocolitica* na farmama. Utvrđivanje rizičnih faktora predstavlja važan alat za unapređenje kontrolnih mera, kako na farmama tako i na klanicama, sa ciljem eliminacije ili smanjenja nalaza *Y. enterocolitica* u lancu proizvodnje i potrošnje mesa svinja a sve u cilju očuvanja javnog zdravlja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Klasifikacija i taksonomija *Yersinia* spp.

Rod *Yersinia* prema današnjoj nomenklaturi obuhvata 11 vrsta: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei*, *Y. aldovae* i *Y. ruckeri* (Fàbrega i Vila, 2012). *Y. enterocolitica* se ranije smatrala delom familije *Enterobacteriaceae*. Najnovija taksonomska ispitivanja svrstavaju *Y. enterocolitica* u rod *Yersinia* i familiju *Yersiniaceae* iz reda *Enterobacterales* (Schoch i sar., 2020). Prema osnovnoj podeli *Y. enterocolitica* ima dve podvrste: *Yersinia enterocolitica* subsp. *Enterocolitica*, u koju se svrstavaju sojevi sa 16S rRNA tipom američkog porekla, i *Yersinia enterocolitica* subsp. *Paleartica*, u koju spadaju sojevi evropskog porekla (BT1A, BT2, 3 4 i 5) (Neubauer sar., 2000).

2.2. Osnovne karakteristike *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica je asporogeni, fakultativno anaerobni, Gram negativni bacil, sa razlikama u morfologiji u rasponu od malih kokobacila sa zaobljenim krajevima do izduženih bacila. Pri temperaturi od 25°C predstavlja pokretan mikroorganizam, sa peritrihno raspoređenim flagelama, a nepokretan je kada se kultiviše pri temperaturi od 37°C. *Y. enterocolitica* je heterogena grupa sojeva, koja se na osnovu svojih fenotipskih karakteristika klasifikuje u 6 biotipova (1A, 1B, 2, 3, 4 i 5). Biotipovi 1B, 2, 3, 4 i 5 su patogeni za ljude (EFSA, 2011). Biotip 1A se smatra nepatogenim za čoveka (Singh i Viridi, 2004). Na osnovu hemijskih osobina površinskog O antigena *Y. enterocolitica* je podeljena na više od 48 serotipova. Za ljude su patogeni prevashodno biotip 4 (serotip O:3) i biotip 2 (serotip O:2) (EFSA, 2011; Keet, 1974). Kao najčešći uzročnik bolesti prijavljen je bioserotip BT4/O:3, zatim BT2/O:9 i BT2/O:5, 27 (EFSA i ECDC, 2018). Najvažniji serotip *Y. enterocolitica* u mnogim evropskim zemljama je serotip O:3, zatim serotip O:9 (Bottone, 1997).

Kod patogenih bioserotipova BT4/O:3 i BT2/O:9 utvrđeno je prisustvo *pYV* plazmida (*Yersinia virulence plasmid*), *ail* i *ystA* hromozomskog gena. Gen *ail* kodira proizvodnju *ail* proteina (*attachment-invasion locus*), koji je odgovoran za adherenciju jersinija za epitelne ćelije creva. Nasuprot tome, *ystA* gen kodira proizvodnju enterotoksina *ystA*, koji je glavni uzrok dijareje tokom jersinioze. Sojevi biotipa 1A ne sadrže *pYV* plazmid, koji je glavni faktor virulencije, pa se ne smatraju patogenim za čoveka (Tennant i sar., 2003; Singh i Viridi, 2004). Međutim, u novije vreme je u više izveštaja prikazano da je biotip 1A izolovan u kliničkim slučajevima

jersinioze kod pacijenata koji su imali gastrointestinalne probleme (Batzilla i sar., 2011). Iako biotip 1A vrlo retko proizvodi *ystA* enterotoksin, *ystB* gen koji kodira proizvodnju homolognog biološki aktivnog enterotoksina *ystB* nađen je u više od 80% slučajeva. Samim tim, potencijalna opasnost od sojeva biotipa 1A se ne može isključiti (Grant i sar., 1998).

Za razliku od ostalih enteropatogenih bakterija, *Y. enterocolitica* je psihotropna i može da raste pri temperaturama u rasponu od 0 do 44°C (Keet, 1974). Kao takva može se razmnožavati pri temperaturama frižidera i preživeti u zamrznutoj hrani tokom dužeg vremenskog perioda. Optimalna temperatura rasta je 25–28°C (Fàbrega i Vila, 2012). *Y. enterocolitica* su termolabilne bakterije i uništavaju se pri temperaturama pasterizacije. Ispitivanjem termostabilnosti utvrđeno je da D-vrednost iznosi $D_{50}=45,87$; $D_{55}=10,98$; $D_{60}=2,53$; $D_{62}=1,42$, a u cilju uspešne pasterizacije i sprečavanja kontaminacije preporučena temperatura pasterizacije je 62°C (Bolton i sar., 2013). Enterotoksin čiju proizvodnju kodira *yst* gen je termostabilan i zapaženo je da se pri temperaturi od 100°C tokom 20 minuta ne denaturiše (Rakin i sar., 2015).

Y. enterocolitica može da raste pri pH vrednostima nižim od 9, dok se optimalne vrednosti pH kreću od 4,2 do 4,4. Optimalna vrednost aktivnosti vode iznosi a_w 0,96, dok je minimalna vrednost aktivnosti vode pri kojoj *Y. enterocolitica* može da raste a_w 0,945 (Stern i sar., 1980). Niske pH vrednosti i prisustvo organskih kiselina mogu inhibirati rast *Y. enterocolitica*. Dobro podnosi NaCl u koncentraciji od 5%, dok je koncentracija od 7% NaCl inaktivira (Bari i sar., 2011).

2.3. Kulturelne i biohemijske osobine *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica ima sposobnost rasta na čvrstim hranljivim podlogama kao što su krvni agar sa ovčjom krvi, MacConkey i Hektoen-enteric agar, međutim, na ovim podlogama se istovremeno dobro razmnožavaju i *Enterobacteriaceae* (Bottone, 2015). Standardna metoda za izolaciju i identifikaciju *Y. enterocolitica* (SRPS EN ISO 10273:2017) podrazumeva upotrebu selektivne čvrste podloge, CIN agara (agar sa dodatkom antibiotika cefsoludin, irgasan i novobiocin), koji se inkubira pri temperaturi od 30°C tokom 24–48h. Karakteristične kolonije *Y. enterocolitica* na CIN agaru su sitne (<1 mm), glatke, sa crvenim centrom (zbog fermentacije manitola) i prozirnom zonom (SRPS EN ISO 10273:2017). Zbog svog karakterističnog izgleda na CIN agaru, nazivaju se kolonijama *bikovih očiju* i omogućavaju lako prepoznavanje (Schiemann, 1979).

Biohemijske osobine *Y. enterocolitica* prikazane su u tabeli (Tabela 2.1). *Y. enterocolitica* je oksidaza negativna, katalaza pozitivna i ureaza pozitivna, ima sposobnost da fermentiše glukozu, ali ne fermentiše laktozu, vrši dekarboksilaciju ornitina, ali ne dekarboksiliše lizin. Na dvostrukom šećeru po Kligleru pokazuju crvenu boju kosine i žutu boju stuba, bez stvaranja gasa i vodonik sulfida (Bottone, 1997).

Tabela 2.1. Biohemijske osobine *Y. enterocolitica* (Weagant i Feng , 2017)

Lysine	-	Sucrose	+ c
Arginine	-	Rhamnose	-
Ornithine	+ c	Raffinose	-
Pokretljivost na 22-26	+	Melibiose	-
Pokretljivost na 35-37	-	Simmons citrate	-
Urea	+	Voges- Proskauer	+/- (+)
Phenylalanine deaminase	-	Indole	+/-
Mannitol	+	Salicin	+/-
Sorbitol	+	Esculin	+/-
Cellobiose	+	Lipase	+/-
Adonitol	-	Pyrazinamidase	+/-
Inositol	+/- (+)		

2.4. Rezistencija *Y. enterocolitica* prema antimikrobnim lijekovima

Većina gastrointestinalnih infekcija koje izaziva *Y. enterocolitica* su lokalnog tipa i ograničene su na crevni trakt, pa ne zahtevaju antimikrobno lečenje. Izuzetak predstavljaju teži slučajevi praćeni sistemskom infekcijom i bakterijemijom (Bottone, 2015). Antimikrobna terapija je indikovana kod imunokompromitovanih osoba, kao i za lečenje enterokolitisa i stanja praćenih septikemijom ili invazivnom infekcijom (Fàbrega i Vila, 2012). Iako bolest kod ljudi obično ne zahteva terapiju, široka upotreba antibiotika na nivou farme mogla bi dovesti do pojave rezistencije na više lekova i do mogućnosti prenošenja rezistencije unutar vrste, kao i na druge organizme (Bottone, 2015; Van Boeckel i sar., 2015).

Y. enterocolitica pokazuje osetljivost prema aminoglikozidima, hloramfenikolu, tetraciklinu, cefalosporinima treće generacije i fluorohinolonima, ali je otporna na penicilin, ampicilin i cefalosporine prve generacije (Bent i Glenn, 2010). Svetska zdravstvena organizacija za antimikrobnu terapiju jersinioze preporučuje upotrebu tetraciklina, hloramfenikola kotrimoksazola, kao i cefalosporine treće generacije i fluorohinolone (Fàbrega i Vila, 2012).

Otpornost na beta laktamske antibiotike omogućena je prisustvom hromozomskih gena *blaA* i *blab*, koji imaju sposobnost da kodiraju proizvodnju beta laktamaza (Bolton i McDowell, 2013). Postoje 2 tipa enzima B laktamaza: neinducibilni B laktamaza enzim A širokog spektra i inducibilni cefalosporinaza enzim B (Bottone, 2015).

2.5. Osnovne karakteristike jersinioze kod ljudi

Jersinioza je oboljenje koje nastaje unošenjem hrane i vode kontaminirane sa *Y. enterocolitica*. Ovo oboljenje kod ljudi izaziva simptome infekcije gastrointestinalnog trakta i može se manifestovati kao akutni gastroenteritis, terminalni ileitis ili mezenterični limfadenitis (Bottone, 1999). Patogeneza *Y. enterocolitica* započinje unošenjem kontaminirane hrane i vode, i obuhvata prijanjanje bakterija na površinu crevnih resica i translokaciju preko M ćelija koje pokrivaju limfoidne folikule tankog creva (Bottone, 2015).

Infektivna doza iznosi 10^8 – 10^9 ćelija i veća je u odnosu na druge patogene bakterije koje se mogu naći u hrani (Zielińska i sar., 2015). Step en razvoja bolesti i težina kliničke slike zavise od nekoliko različitih faktora kao što su uzrast, imunološki status i vrsta hrane kojom se unose patogene *Y. enterocolitica*. Oboljenje se podjednako javlja kod svih ljudi, ali se smatra da deca mlađa od 5 godina, starije osobe i osobe sa oslabljenim imunitetom spadaju u rizičnu grupu (Chlebicz i Śliżewska, 2018).

Simptomi se obično pojavljuju 4–7 dana nakon infekcije i mogu da traju u proseku 1–3 nedelje. Kod starije dece i odraslih prvenstveno se javlja jednostrani bol u stomaku, praćen visokom temperaturom, pa se bolest često može pomešati sa *apendicitisom* (upala slepog creva). Drugi simptomi su osip i bolovi u zglobovima. Najčešće manifestacije jersinioze su enterokolitis, pseudoapendicitis i post infektivni reaktivni artritis, dok u nekim slučajevima može doći do teže infekcije, kao što je septikemija (EFSA 2011). Takođe su opisani simptomi kao što su dijareja, mučnina i povraćanje (Bottone, 1997). Postoje i slučajevi ekstraintestinalne komplikacije koji uključuju apscese na jetri i slezini (Rabson i sar., 1975) kao i endokarditis (Urbano-Márquez i sar., 1983).

2.6. Incidencija jersinioze kod ljudi

Jersinioza izazvana sa *Y. enterocolitica* je jedna od vodećih zoonoza u Evropskoj uniji koja se prenosi hranom i nalazi se na trećem mestu po učestalosti, odmah posle kampilobakterioze i salmoneloze.

Na osnovu izveštaja Evropske agencije za bezbednost hrane, tokom 2020. godine ukupan broj prijavljenih i potvrđenih slučajeva jersinioze kod ljudi u Evropskoj uniji bio je 5668 (EFSA i ECDC, 2021a). Tokom 2019. godine ukupan broj prijavljenih i potvrđenih slučajeva jersinioze kod ljudi u Evropskoj uniji bio je 6961 (EFSA i ECDC, 2021b). Evropski centar za prevenciju i kontrolu bolesti navodi da broj slučajeva u 2018. godini iznosi 6806, sa stopom pojavljivanja od 1,6 na 100000 stanovnika. Najveća stopa incidencije zabeležena je u Finskoj (9,6 na 100000 stanovnika), gde su prijavljena 3862 obolela sa poznatim tokom bolesti, od čega su tri završila sa smrtnim ishodom. Najveći broj prijavljenih slučajeva bio je kod dece starosne dobi 0–4 godine i čini gotovo četvrtinu svih prijavljenih slučajeva (ECDC, 2019). U toku 2017. godine ukupan broj prijavljenih i potvrđenih slučajeva jersinioze u zemljama Evropske unije bio je 6823 (EFSA i ECDC, 2018).

U periodu od 2008. do 2017. godine zabeležen je trend smanjenja prijavljenih i potvrđenih slučajeva jersinioze, ali u periodu od 2013. do 2017. godine trend ne pokazuje značajnije povećanje ili smanjenje broja slučajeva (EFSA i ECDC, 2018). *Y. enterocolitica* je bila najčešći uzročnik oboljenja kod ljudi, a najzastupljeniji bioserotip bio je BT4/O:3, a zatim BT2/O:9 i BT2/O:5,27 (EFSA i ECDC, 2018). Broj obolelih ljudi i incidencija u zemljama Evropske unije u periodu od 2013. do 2020. godine prikazana je u Tabeli 2.2 (EFSA i ECDC, 2021a,b).

Tabela 2.2. Jersinioza ljudi u zemljama Evropske unije u periodu od 2013. do 2020. godine

Jersinioza ljudi	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Broj potvrđenih slučajeva	6471	6625	7202	6861	6823	6699	6961	5668
Broj potvrđenih slučajeva na 100.000 stanovnika	1,92	1,92	2,2	1,82	1,77	1,6	1,7	1,78

Prema izveštaju o zaraznim bolestima Instituta za Javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, tokom 2013. godine prijavljeno je 36 slučajeva enteritisa prouzrokovanih patogenom *Y. enterocolitica*, sa stopom incidencije od 0,50/100000 stanovnika (IZJZS, 2014). U naredim godinama evidentan je trend pada incidencije prijavljenih slučajeva oboljenja (IZJZS, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020) što je prikazano u Tabeli 2.3.

Tabela 2.3. Jersinioza ljudi u Srbiji u periodu od 2013. do 2020. godine

Jersinioza ljudi	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Broj potvrđenih slučajeva	36	35	15	19	14	20	14	16
Broj potvrđenih slučajeva na 100.000 stanovnika	0,5	0,49	0,21	0,27	0,2	0,29	0,2	0,23

2.7. Nalaz *Y. enterocolitica* u lancu proizvodnje hrane

2.7.1. Rezervoari *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica je široko rasprostranjena u prirodi i može se naći u crevnom traktu različitih sisara, ptica, hladnokrvnih i vodenih vrsta. Izolati iz životne sredine su većinom avirulentni i ne izazivaju oboljenje ljudi. Međutim, izolati poreklom od svinja mogu da sadrže patogene serotipove. Pored toga, navodi se da psi, preživari, glodari i voda iz okoline takođe mogu biti rezervoari ovih patogenih bioserotipova (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2006a; 2006b).

Krave, ovce i koze mogu biti rezervoari biotipova 2 i 3 i serotipova O:5,27 i O:9 (Fearnley i sar., 2005). Kod ovaca, zečeva i koza izolovani su sojevi retkih biotipova kao što su bioserotip 5/O:2,3, dok su kod činčila izolovani sojevi bioserotipova 3/O:1, 2 i 3 (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2006b).

Psi i mačke mogu izlučivati iz organizma patogene sojeve *Y. enterocolitica*, uglavnom BT4/O:3, putem fekalija i nekoliko nedelja nakon infekcija, tako da kućni ljubimci predstavljaju jedan od izvora infekcija ljudi koji su u bliskom kontaktu sa njima, a naročito dece (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2006b). Glodari mogu biti rezervoari serotipa O:8, što je utvrđeno u Japanu (Hayashidani i sar., 2003).

2.7.2. Nalaz *Y. enterocolitica* kod svinja

Smatra se da su glavni izvor infekcije zdrave, asimptomatske svinje. Ljudi se najčešće inficiraju konzumiranjem sirove ili nedovoljno kuvane hrane i kontaminirane vode (EFSA i ECDC, 2019). Svinje se smatraju prirodnim rezervoarom *Y. enterocolitica*, što objašnjava njeno prisustvo u klanicama i povezanost između potrošnje mesa svinja i učestalosti pojave jersinioze (Bonardi i sar., 2013; Vilar i sar., 2015). Procenjuje se da je 77,3% slučajeva jersinioze kod ljudi posledica konzumiranja kontaminiranog mesa svinja (Fosse i sar., 2008). Brojne studije ukazuju na postojanje korelacije između sojeva *Y. enterocolitica* izolovanih iz klinički zdravih svinja i sojeva poreklom od ljudi kod kojih je ovaj mikroorganizam dijagnostikovao (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2011). Rezultati Fredriksson-Ahomaa i sar. (2006a) ukazuju na veliku genomsku sličnost izolata izolovanih od svinja i od ljudi.

Najčešći vektor prenosa je nedovoljno termički obrađeno meso svinja kao i proizvodi od mesa svinja (EFSA i ECDC, 2018). Najbolje adaptirani bioserotipovi su zapravo i najčešće prijavljeni uzročnici bolesti, bioserotip 4/O:3, zatim 2/O:9 i 2/O:5, 27 (EFSA i ECDC, 2018). Sojevi biotipa 1A nisu adaptirani na čoveka jer ne sadrže *pYV* plasmid koji je glavni faktor virulencije, pa se ne smatraju patogenim za čoveka (Singh i Viridi, 2004). Dokazano je postojanje istih genotipova *Y. enterocolitica* kod pozitivnih svinja u klanici, kao i na farmi sa koje su zaklane svinje dopremljene u klanicu a na kojoj je utvrđena prevalencija od 33%, što potvrđuje da pozitivne svinje potiču sa farme na kojoj nastaje infekcija svinja (Laukkanen i sar., 2009).

2.7.3. Faktori rizika na farmama svinja

Proizvodni sistemi (konvencionalni i organski) mogu imati uticaj na nalaz ovih bakterija, stim da je prevalencija veća na farmama sa konvencionalnim načinom proizvodnje u odnosu na organsku proizvodnju (Von Altrock i sar., 2006). U okviru farme prevalencija je vrlo promenljiva, što ukazuje na uticaj pojedinih faktora na farmi. Primećeno je da je prevalencija *Y. enterocolitica* BT4/O:3 veća na farmama otvorenog tipa koje kupuju prasad (*fattening farms*) iz otkupa ili od malih farmi (Skjerve i sar., 1998). Zavisno od primenjenih biosigurnosnih mera na farmi, utvrđeno je da je prevalencija veća na farmama sa nižim nivoima biosigurnosnih mera (Zdolec i Kiš, 2021).

U odnosu na kategoriju svinja većina studija ukazuje na postojanje većeg rizika od pojave *Y. enterocolitica* kod tovljenika. Ispitivanjem svinja na farmi utvrđeno je da se kod prasadi nakon zalučenja ne izoluje *Y. enterocolitica*, dok se kasnije, prebacivanjem prasadi u tov, broj pozitivnih prasadi postepeno povećava (Gürtler i sar., 2005). Infekcija svinja se vezuje za starost životinja. Prevalencija *Y. enterocolitica* kod krmača je uglavnom niska (Korte i sar., 2004). Tokom uzgoja, svinje se inficiraju posle prva dva meseca (Nesbakken i sar., 2006; Gurtler i sar., 2005). Kao mogući izvori infekcije prasadi u tovu navode se kontaminirani feces i površine u tovilištu (Fukushima i sar., 1983). U početku se *Y. enterocolitica* nalazi u izmetu i tonzilama. Sa starošću procenat inficiranih svinja opada, a smanjenje broja pozitivnih uzoraka fecesa je izraženije nego u slučaju uzoraka tonzila (Gurtler i sar., 2005). Klanjem starijih svinja, *Y. enterocolitica* se uglavnom nalazi u tonzilama i u manjoj meri u sadržaju iz rektuma. Ovaj patogeni mikroorganizam se takođe može naći u drugim delovima creva, u submaksilarnim i mezenterijalnim limfnim čvorovima, ali u mnogo nižem procentu (Nesbakken i sar., 2003). U ranijim istraživanjima utvrđeno je da je prevalencija *Y. enterocolitica* 10 puta veća u tonzilama nego u fecesu (Fredriksson Ahomaa i sar., 2001a; Nesbakken i sar., 2006).

Prema nalazu Fredriksson Ahoma i sar. (2011) divlje svinje mogu biti nosioci patogenih sojeva *Y. enterocolitica* BT4/O:3. Ove životinje slobodno žive u prirodi i mogu doći u kontakt sa domaćim svinjama i zbog toga predstavljaju važan rezervoar *Y. enterocolitica* u životnoj sredini. Evisceracija odstreljenih divljih svinja bez poštovanja dobre higijenske prakse može izložiti lovce ovoj bakteriji i dovesti do kontaminacije životne sredine (Koronkiewicz i sar., 2004).

2.7.4. Nalaz *Y. enterocolitica* u klanicama i rizik od kontaminacije mesa tokom klanja

Klanje svinja je otvoreni proces usled koga klanjem inficiranih svinja može doći do kontaminacije i unakrsne kontaminacije trupova i organa zaklanih svinja (Fredriksson-Ahoma i sar., 2006a; 2006b). Kako ovaj patogeni mikroorganizam ostaje prisutan u lancu proizvodnje mesa svinja, kontaminacija trupova i proizvoda je moguća još u početnim koracima, naročito tokom rukovanja i obrade glave, jezika i tonzilama zaklanih svinja (Van Damme i sar., 2015). U istraživanju koje je sprovedeno na jednoj klanici u Brazilu dokazano je prisustvo *Y. enterocolitica* BT4/O:3 u tonzilama kod 10% uzoraka (Martins i sar., 2021). Van Damme i sar., (2013) utvrdili su prisustvo *Y. enterocolitica* BT4/O:3 u 11,4 % uzoraka briseva sa površine trupova i u 4,9% uzoraka mlevenog mesa svinja. Prema istraživanju sprovedenom na jednoj klanici u Minhenu u periodu od 2000. do 2004. godine, od 164 ispitanih uzoraka tonzila svinja, 101 uzorak je bio pozitivan na prisustvo *Y. enterocolitica* BT4/O:3 (Fredriksson Ahomaa i sar., 2010). Ispitivanjem trupova na klanici utvrđeno je da se patogeni sojevi *Y. enterocolitica* mogu izolovati u najvećem procentu na tonzilama (55,3%), a zatim iz uzoraka briseva sa linije presečenja karličnog kanala, grudne kosti i mandibularne regije (Van Damme i sar., 2015). Svinjske iznutrice kao što su svinjski jezici, jetra, srce i bubrezi vrlo često mogu biti kontaminirani patogenim sojevima *Y. enterocolitica*, zbog čega predstavljaju potencijalni izvor kontaminacije (Fredriksson Ahomaa i sar., 2006a). Nalaz *Y. enterocolitica* u mišićima obraza može predstavljati dodatni rizik po javno zdravlje usled povećanja njihovog broja tokom skladištenja mesa pri temperaturi frižidera (Fredriksson Ahomaa i sar., 2012a).

2.7.5. Primena dobre higijenske prakse u cilju smanjenja kontaminacije

Prisustvo *Y. enterocolitica* se ne može otkriti konvencionalnim pregledom mesa, tako da se mere kontrole odnose na spečavanje ili smanjenje fekalne i druge kontaminacije počevši od farme, zatim tokom transporta, za vreme boravka u depou klanice, kao i prilikom samih operacija klanja. Primena ovih mera obezbeđena je kroz primenu dobre higijenske prakse i analizom rizika i kritičnih kontrolnih tačaka u svim fazama proizvodnje (Blagojevic i sar., 2021). Tehnika i higijena klanja mogu imati uticaj na procenat kontaminacije sa trupova na proizvode klanja. Zavisno od tehnike obrade trupova nakon klanja, mogu da se uzorkuju tonzile i/ili rektalni sadržaj. U slučaju kada se glava odvaja od trupa pre rasecanja celog trupa na polutke, može se očekivati da kontaminacija koja potiče iz krajnika i usne duplje bude niska, tako da se samo fekalna kontaminacija može uzeti u obzir. U slučaju kada se glava ne odvaja od trupa već se raseca na polovinu zajedno sa celim trupom, fekalna kontaminacija i posebno kontaminacija putem tonzila se mora uzeti u obzir. Zbog toga se status zaklanih svinja prvenstveno zasniva na prisustvu *Y. enterocolitica* u fekalnom sadržaju i tonzilama (Rahikainen i sar., 2016).

Zbog činjenice da su svinje asimptomatski nosioci *Y. enterocolitica*, inspekcijski pregled mesa na liniji klanja može predstavljati rizik od dalje kontaminacije mesa (Laukkanen i sar., 2009), jer pri rasecanju i pregledanju limfnih čvorova postoji mogućnost prenošenja ove bakterije dalje duž lanca proizvodnje mesa.

U cilju smanjenja kontaminacije posebnu pažnju treba posvetiti postupku uklanjanja tonzila iz ždrele, jer ukoliko tonzile nisu u potpunosti odstranjene, može doći do kontaminacije sa limfnog tkiva na susedno mišićno tkivo (Borch i sar., 1996). Primena dobre higijenske prakse tokom čitavog procesa klanja, a naročito postupci manipulacije kao što je oslobađanje rektuma i njegovo istovremeno podvezivanje plastičnom kesom, može u značajnoj meri smanjiti kontaminaciju trupova (Andersen, 1988). Utvrđeno je da postupci uklanjanja glave bez prethodnog rasecanja na polovine zajedno sa trupom, kao i pranje i sterilisanje noževa značajno mogu smanjiti kontaminaciju trupova patogenim sojevima *Y. enterocolitica* (Van Damme i sar., 2015).

Sposobnost *Y. enterocolitica* da stvara biofilm na radnim površinama predstavlja dodatnu opasnost u vidu sekundarne kontaminacije usled povremenog oslobađanja bakterija iz biofilma (Kim i sar., 2008).

Postupci hlađenja trupova posle klanja ne smanjuju prevalenciju *Y. Enterocolitica*, zbog njihovog psihotropnog karaktera, usled čega može doći i do povećanja njihovog broja (Nesbakken i sar., 2008). Zbog toga se posebna pažnja mora obratiti na smanjenje početne kontaminacije trupova prilikom klanja svinja primenom tehnika dobre higijenske prakse.

2.7.6. Kategorizacija rizika na farmama i klanicama

Poslednjih godina sistem bezbednosti mesa zasnovan na riziku je predmet naučnih istraživanja (Buncic et al., 2019). Sveobuhvatni pristup fazama pre klanja i klanju svinja, koji podrazumeva kategorizaciju rizika na farmi/klanici i poboljšanje higijenske prakse kao i prikupljanje svih epidemioloških podataka u lancu proizvodnje mesa, predstavlja neke od koraka ka povećanju bezbednosti hrane i poboljšanju javnog zdravlja (Blagojevic et al., 2021; Zdolec i Kiš, 2021). Strategija za smanjenje učestalosti infekcije *Y. enterocolitica*, pored prikupljanja epidemioloških podataka i razmene informacija u sistemu lanca hrane, podrazumeva definisanje faktora rizika i uspostavljanje postupaka u cilju njihovog smanjenja ili eliminacije radi daljeg postizanja i utvrđivanja prioritetne kategorizacije farme/klanice, sa ciljem unapređenja bezbednosti hrane i javnog zdravlja (Blagojevic et al., 2021; Zdolec i Kiš, 2021).

Prisustvo *Y. enterocolitica* kod asimptomatskih nosilaca predstavlja dodatni problem u sistemu bezbenosti mesa i prepreku u kontroli opasnosti u proizvodnji mesa. Zbog činjenice da otkrivanje ove opasnosti na svakom pojedinačnom trupu praktično nije moguće niti je ekonomski opravdano, kao jedina efektivna i efikasna kontrola predlaže se primena preventivnih i kontrolnih mera na farmama i klanicama (Blagojevic i Antić, 2014).

Na osnovu podataka o kategorizaciji rizika na farmi, veterinar koji vrši nadzor nad klanjem mogao bi da donese odluku o *ante mortem* inspekciji mesa i u skladu sa tim odobri klanje, zabrani klanje ili primeni dodatne mere u kontroli rizika kao što su tradicionalne metode *post mortem* pregleda mesa, zamrzavanje mesa, laboratorijske analize ili primena tehnike dekontaminacije trupova (topla voda, para). Na ovaj način postiže se bolja bezbednost mesa u odnosu na primenu dosadašnjih standardnih tehnika (Blagojević i Antić, 2014, Zdolec i Kiš, 2021). Za kategorizaciju rizika na farmama u odnosu na *Y. enterocolitica* preporučuje se serološki monitoring pre klanja (Bonardi i sar., 2016).

2.8. Metode za detekciju *Y. enterocolitica*

Za detekciju *Y. enterocolitica* iz uzoraka sa površine trupova i uzoraka tonzila primenjuje se standardna metoda (SRPS EN ISO 10273:2017). Konvencionalne bakteriološke metode koje se zasnivaju na korišćenju mikrobioloških podloga imaju nekoliko ograničenja, kao što su dugotrajne faze inkubiranja, primena obogaćenja, zatim nemogućnost identifikacije vrsta i nedostatak diskriminacije između patogenih i nepatogenih sojeva (Cocolin i Comi, 2005). Osim konvencionalnih metoda, razvijene su pouzdane metode za otkrivanje patogenih *Y. enterocolitica* u prirodno kontaminiranim uzorcima. Koristeći PCR tehniku (reakcija lančane polimeraze), patogena *Y. enterocolitica* se može detektovati brzo i sa velikom specifičnošću i osetljivošću (Fredriksson Ahomaa i sar., 2003a).

Pomoću PCR-a može se detektovati prisustvo patogene *Y. enterocolitica* u prirodno kontaminiranim uzorcima sa velikom preciznošću (Fredriksson Ahomaa i sar., 2007). Kada su uzorci hrane u pitanju, neophodno je korišćenje selektivnog obogaćenja (Rahikainen i sar., 2016), koje omogućava oporavak što većeg broja bakterija. Međutim, trenutno nije dostupan nijedan postupak koji će omogućiti oporavak svih biotipova/serotipova (Fredriksson-Ahomaa i Korkeala, 2003b). Geni *ail*, *inv* i *yst*, koji se nalaze na hromozomu patogenih *Y. enterocolitica*, najčešće su korišćeni hromozomski ciljevi. Pored toga, neki PCR testovi koriste *yersinia* specifični region 16s rRNA (Fredriksson Ahomaa i sar., 2003b). PCR može biti korisna metoda za preliminarni skrining patogenih *Y. enterocolitica*, jer je brz i osetljiv i lako se može primeniti na velikom broju uzoraka. Međutim, izveštavanje za *Y. enterocolitica* ne može se oslanjati samo na prisustvo DNK materijala zbog mogućih pojava lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata (EFSA, 2007). Za otkrivanje patogenih *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* u hrani objavljen je međunarodni standard SRPS CEN ISO/TS 18867:2016.

Subtipizacija se može uraditi različitim metodama, a testovi moraju imati visoku reproduktivnost i dobru sposobnost diskriminacije. Metode koje se koriste za subtipizaciju *Y. enterocolitica* podeljene su u dve grupe:

- Fenotipske metode – detektuju osobine ispoljene od strane mikroorganizma: biotipizacija, serotipizacija, rezistotipizacija (Foxman i sar., 2005). Bioserotipizacija se intenzivno koristi za razlikovanje izolata *Y. enterocolitica*. Šema biotipizacije koju su predložili Wauters i sar. (1987) univerzalno je usvojena. Danas se biotipizacija sprovodi prema Priručniku o bakteriološkim analizama (Weagant i Feng, 2017);
- Genotipske metode – uključuju direktne analize DNK. PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) je zlatni standard za subtipizaciju bakterija. PFGE predstavlja varijaciju elektroforeze u agaroznom gelu, koja omogućava analizu DNK fragmenata celog bakterijskog genoma. Tokom ove metode kompletna hromozomalna DNK se podvrgne sečenju tzv. restrikcionim enzimima, pri čemu nastaju fragmenti DNK različite veličine. Metoda ima veliku diskriminatornu moć i ima prednost u odnosu na sve druge metode (Lukinmaa i sar., 2004).

Od seroloških metoda za detekciju *Y. enterocolitica* može se koristiti indirektna ELISA tehnika, zasnovana na upotrebi prečišćenog lipopolisaharida iz patogene *Y. enterocolitica* (Nielsen i sar., 1996).

2.9. Monitoring i nadzor nad *Y. enterocolitica*

Na nivou Evropske unije trenutno ne postoji obaveza sprovođenja monitoringa i izveštavanja o nalazu *Y. enterocolitica* kod svinja i proizvoda od mesa svinja. S obzirom na to da jersinioza kod ljudi izazvana patogenim sojevima *Y. enterocolitica* postaje sve učestalije oboljenje, Evropska agencija za bezbednost hrane predlaže sprovođenje monitoringa i izveštavanja o nalazu *Y. enterocolitica*. Predložena tehnička specifikacija definiše kao ciljnu grupu uzorkovanja svinje za klanje, telesne mase 50–170 kg. Kao najpodesniji uzorak za procenu kontaminacije preporučuju se tonzile koje se uzorkuju na liniji klanja. Za izolaciju i identifikaciju *Y. enterocolitica* preporučuje se standardna metoda (SRPS EN ISO 10273:2017) koja podrazumeva dugotrajne korake obogaćenja i inkubacije, kao i alternativni način direktnog zasejavanja na površinu selektivnog *Yersinia* agara. Svi izolovani sojevi moraju biti identifikovani do nivoa biotipa i serotipa zbog procene patogenosti. Navedeni monitoring sprovodio bi se u redovnim intervalima, na 3 ili 4 godine, zavisno od procene rizika i epidemiološke situacije u zemlji (EFSA, 2009).

3. CILJ I ZADACI

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je utvrđivanje raširenosti *Y. enterocolitica* u lancu proizvodnje mesa svinja, kao i određivanje bioserotipa i karakterizacija izolata *Y. enterocolitica* i njihov značaj za bezbednost mesa.

Shodno cilju ispitivanja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Uzimanje uzoraka tonzila sa trupova zaklanih svinja (tokom 12 meseci) i prikupljanje podataka iz lanca hrane (farma, transport, klanica);
2. Izolacija *Y. enterocolitica* iz uzoraka tonzila i utvrđivanje prevalencije *Y. enterocolitica* kod svinja na liniji klanja;
3. Formiranje kolekcije izolata *Y. enterocolitica* i određivanje biotipa, serotipa i osetljivosti na antimikrobne agense;
4. Utvrđivanje prisustva gena virulencije kod patogenih sojeva *Y. enterocolitica*;
5. Genotipizacija patogenih sojeva *Y. enterocolitica*;
6. Procena značaja nalaza sojeva *Y. enterocolitica* i faktora rizika u lancu proizvodnje mesa svinja.

4. MATERIJAL I METODE

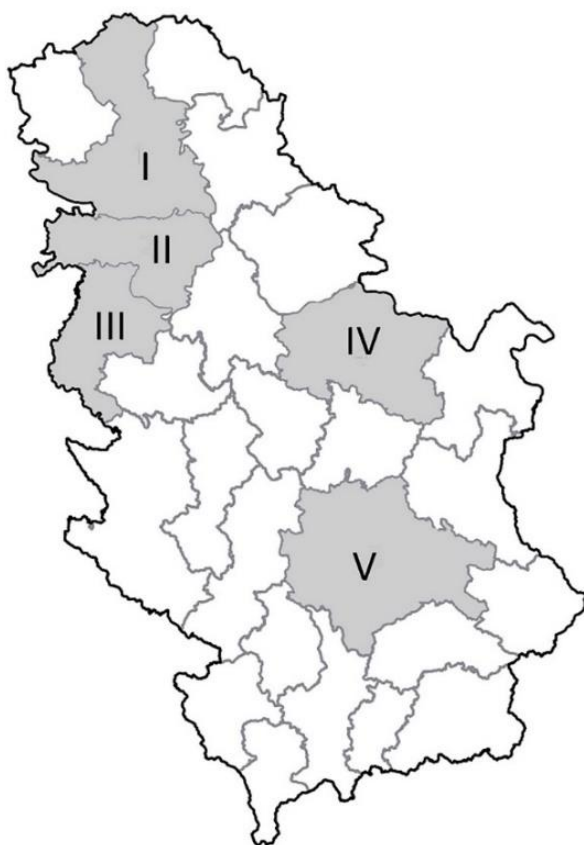
4.1. Podaci o uzorkovanim svinjama i farmama porekla

Uzorkovanje je sprovedeno na tri klanice (A, B, C) koje se nalaze u regionu V na području Nišavskog okruga. Uzorkovane svinje bile su poreklom sa 30 farmi koje su raspoređene u 5 regiona u Srbiji. Za prikupljanje podataka iz lanca hrane, korišćen je prethodno pripremljeni Upitnik (tabela 4.1), koji je sadržavao oblasti u vezi sa farmom porekla svinja; prevozu životinja; i klanici. Pitanja u sklopu Upitnika su bila u vezi sa tipom farme, primenom biosigurnosnih mera, deratizacijom, načinom vodosnadbevanja, trajanjem transporta, statusom vozila i uslovima smeštaja u klanici i operacijama klanja. Procena primenjenih biosigurnosnih mera sprovedena je na osnovu prisustva dezinfekcionih barijera, dok se procena kontrole vode vršila u odnosu na mikrobiološko ispitivanje vode.

Tabela 4.1. Upitnik za prikupljanje podataka iz lanca hrane

Faktor	Kategorija/Odgovor
Starosna kategorija	Tovljenici (< 8 meseci)
Kapacitet farme	Mala (<150); Srednja (150-500); Velika (>500)
Sistem proizvodnje	Zatvoren sistem; sistem završnog tova
Obuke radnika	Da / Ne
Radna uniforma	Da / Ne
Gajenje i drugih životinja	Da / Ne
Prisustvo mačaka	Da / Ne
Prisustvo pasa	Da / Ne
Prisustvo glodara	Da / Ne
Poreklo vode na farmi	Bunarska; Vodovod; Vodovod/bunarska
Kontrola i tretiranje vode na farmi	Da / Ne
Zatvoreni sistem za hranjenje	Da / Ne
Biosigurnosne mere	Da / Ne
Kontrola glodara	Profesionalna; profesionalna/samostalna; Samostalna; Ne sprovodi se
Region	Region I: Severni i Južno Bački okrug; Region II: Sremski okrug; Region III: Mačvanski okrug; Region IV: Podunavski i Braničevski okrug; Region V: Rasinski, Toplički i Nišavski okrug
Prevoz životinja	Prevozno sredstvo: jedan nivo – spratni
Trajanje prevoza	<4 h; >4 h
Klanica	Boravak u depou: 0 – 3 h; 3 - 6 h
	Mešanje životinja: DA - NE

Prilikom svake posete klanici uzorkovane su svinje koje su poreklom samo sa jedne farme, koja je tog dana primljena na klanje što predstavlja ukupno 30 serija uzorkovanja. Precizan broj svinja za uzorkovanje po seriji bio je zasnovan na očekivanoj prevalenciji od 50%, sa intervalom poverenja od 95% i prihvaćenom greškom od 10%. Prosečna starost svinja koje su obuhvaćene uzorkovanjem bila je od 6 do 6,5 meseci sa prosečnom težinom od 110 ± 10 kg. Rasni sastav bio je Landras-Veliki Jokšir-Durok i njihovi hibridi. Broj farmi i broj svinja po okrugu prikazan je u tabeli br. 4.2 i uzorkovanjem je obuhvaćeno ukupno 960 svinja. Geografska distribucija uzoraka po okruzima prikazana je na Slici 4.1.



Slika 4.1
Geografska distribucija svinja obuhvaćenih uzorkovanjem

Region I: Severni i Južno Bački okrug; Region II: Sremski okrug; Region III: Mačvanski okrug; Region IV: Podunavski i Braničevski okrug; Region V: Rasinski, Toplički i Nišavski okrug

Tabela 4.2. Broj uzorkovanih svinja
po farmama i okruzima

Region	Okrug	Farma	Broj uzorkovanih svinja
I	Severno Bački	F1	60
	Južno Bački	F2	40
	Južno Bački	F3	20
	Južno Bački	F4	40
II	Sremski	F5	30
	Sremski	F6	50
	Sremski	F7	30
	Sremski	F8	30
	Sremski	F9	40
	Sremski	F10	60
	Sremski	F11	30
	Sremski	F12	23
	Sremski	F13	30
	Sremski	F14	30
	Sremski	F15	25
III	Mačvanski	F16	10
	Mačvanski	F17	10
	Mačvanski	F18	50
	Mačvanski	F19	40
	Mačvanski	F20	40
IV	Podunavski	F21	60
	Podunavski	F22	20
	Braničevski	F23	30
V	Toplički	F24	10
	Toplički	F25	10
	Toplički	F26	12
	Toplički	F27	40
	Rasinski	F28	30
	Rasinski	F29	30
	Toplički	F30	30
UKUPNO			960

4.2. Klanice – opis linije klanja

Klanice na kojima je vršeno uzorkovanje bile su srednjeg kapaciteta. Na klanici A kapacitet klanja bio je 50 svinja/h. Na klanici B kapacitet klanja bio je 100 svinja/h, dok je na klanici C kapacitet klanja bio 25 svinja/h.

Po prijemu u klanicu i nakon boravka u depou svinje se koridorima dovode do linije klanja i ulaze u pojedinačni boks za omamljivanje. Omamljivanje se obavlja električnom strujom. Električna klješta postavljaju se na glavu životinja tako da struja protiče direktno kroz mozak u trajanju od nekoliko sekundi. Nakon omamljivanja svinje se automatskim dizalicama podižu na visoki kolosek. Iskrvarenje se obavlja u vertikalnom položaju 10 - 15 sekundi nakon omamljivanja ubodom u vrat i presecanjem velikih krvnih sudova. Nakon iskrvarenja vrši se pranje trupova hladnom vodom pod pritiskom i transportovanje do bazena za šurenje. Temperatura vode u bazenima za šurenje bila je od 60 - 65°C, a vreme šurenja u proseku je trajalo 5 min. U klanicama A i B šurenje se obavlja u vertikalnom položaju u bazenima u kojima staje 6 trupova, dok se u klanici C šurenje obavlja u horizontalnom položaju. Nakon šurenja, trupovi odlaze u mašine sa rotirajućim valjcima za mehaničko skidanje dlake i površinskog sloja kože, a zatim se trupovi prebacuju na stolove na kojima se ručno uklanja rožina papaka, isecaju uši i oči i vrši se oslobađanje tetiva na zadnjim ekstremitetima preko kojih se trupovi kače za raspinjače a zatim se podižu na visoki kolosek. Posle podizanja na visoki kolosek vrši se opaljivanje trupova plamenicima na butan gas i trupovi se dalje upućuju na evisceraciju. Evisceracija se obavlja na visokom koloseku rasecanjem trbušnog zida duž bele linije. Nakon otvaranja, trbušni organi se vade i stavljaju u posude konvejskog stola a zatim se pristupa egzenteraciji grudnih organa koji se kače na posebne kuke. Prilikom evisceracije uzima se uzorak dijafragme za utvrđivanje prisustva larvi *Trichinella spp.* Električnom testerom duž linije kičmenog stuba vrši se rasecanje trupova na polutke. U skladu sa dobrom higijenskom praksom između rasecanja dva trupa električna testera se sterilise u posudi sa toplom vodom sa ciljem smanjenja kontaminacije, dok u klanici C to nije bio slučaj. Trupovi se potom obrađuju tako što se odseca rep, ostaci dijafragme, peritonealno masno tkivo i vadi kičmena moždina. Na kraju se trupovi peru vodom pod pritiskom, obeležavaju, mere i upućuju na hlađenje.

4.3. Uzorkovanje tonzila sa trupova zaklanih svinja

Studija je sprovedena tokom 2018. i 2019. godine na tri klanice srednjeg kapaciteta koje se nalaze na području Nišavskog okruga. Ispitivanjem su obuhvaćene sve četiri sezone tokom 12 meseci (proleće: april, maj i jun; leto: jul, avgust i septembar; jesen: oktobar, novembar i decembar; zima: januar, februar i mart). Uzorci tonzila su uzeti sa 960 trupova svinja nakon završene obrade trupova. Broj uzoraka po sezonama i klanicama prikazan je u tabeli 4.3.

Nakon evisceracije i rasecanja trupova izvršeno je uzorkovanje tonzila svinja. Pomoću sterilnih skalpela, makaza i pinceta odsecane su tonzile sa trupova i upakovane u sterilne kese od polivinilhlorida (Nasco, SAD). Tonzile su uzimane sa obe polutke istog trupa. Upakovani i obeleženi uzorci transportovani su do laboratorije pri temperaturi $2\pm 2^{\circ}\text{C}$ i zasejani u roku od 2h od momenta uzorkovanja.

Tabela 4.3. Broj uzoraka po klanicama i sezonama

Sezona	Klanica			UKUPNO
	A	B	C	
Proleće	70	20	130	220
Leto	120	30	92	242
Jesen	130	30	83	243
Zima	120	45	90	255
UKUPNO	440	125	395	960

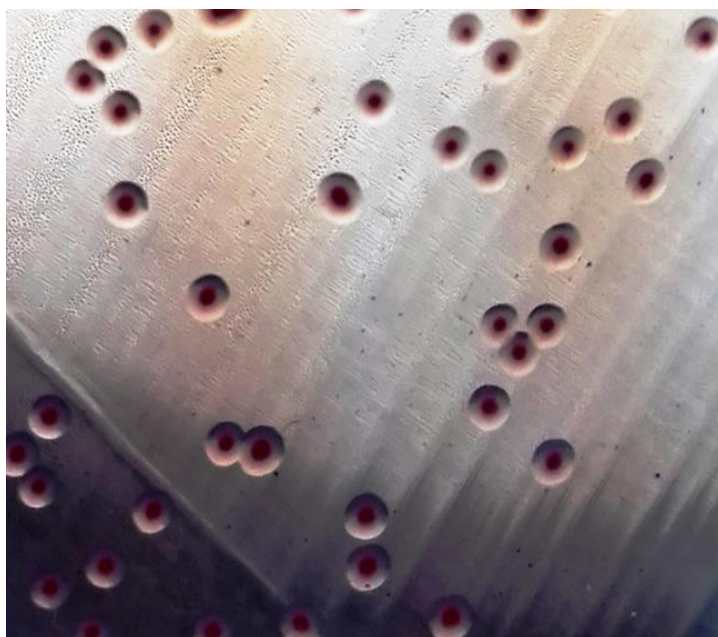
4.4. Izolacija i identifikacija *Y. enterocolitica*

4.4.1. Izolacija *Y. enterocolitica*

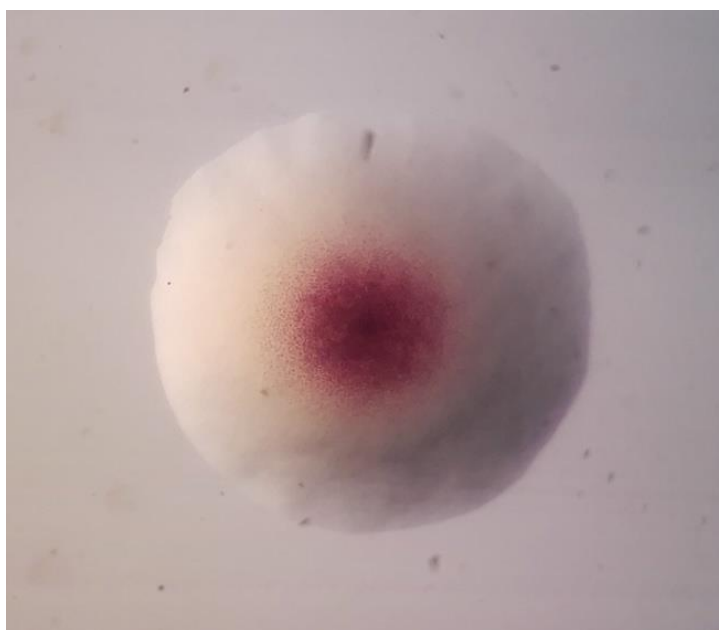
Uzorci tonzila ispitani su na prisustvo/odsustvo *Y. enterocolitica* prema postupku, prethodno opisanom od strane Van Damme i sar. (2010; 2013).

Uzorci tonzila (10g) suspendovani su u 90 ml PSB bujona (Pepton, sorbitol bujon sa dodatkom žučnih soli; Himedia, India) i homogenizovani tokom 30 sekundi pomoću homogenizatora (Stomaher, Interscience). Nakon homogenizacije izvršena je inokulacija 0,1 ml uzoraka na selektivnu podlogu za izolaciju, Yersinia agar (Yersinia selective agar base and Yersinia selective supplement; Himedia, India). Zasejane podloge su inkubirane pri $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ tokom 24 h. Postupak izolacije i identifikacije *Y. enterocolitica* prikazan je na Šemi 4.1.

Nakon inkubacije podloga izabrane su tipične kolonije suspektne na *Y. enterocolitica*: sitne ($\varnothing < 1$ mm), glatke sa crvenim centrom i prozirnom zonom (Slika 4.2 i 4.3). Tipične kolonije su presejane na hranljivi agar (Himedia, India) i inkubirane pri 30°C tokom 24h u cilju dobijanja čistih kultura za dalju biohemijsku identifikaciju. Tipične kolonije na Yersinia agaru su pregledane pod stereomikroskopom (30x) da bi se utvrdila fina zrnasta struktura kolonija (Slika 4.3).



Slika 4.2.
Karakteristične kolonije *Y. enterocolitica*
na Yersinia agaru (MA VSI Niš)



Slika 4.3.
Izgled karakterističnih kolonija *Y. enterocolitica*
na Yersinia agaru pod stereomikroskopom (MA VSI Niš)

Šema 4.2.

Izolacija i identifikacija *Y. enterocolitica*
(Van Damme i sar., 2010; Van Damme i sar., 2013)

Homogenizacija uzoraka:
10 g tonzila + 90 ml PSB

↓ 0,1 ml

Yersinia agar:
30±1°C 24h
Tipične kolonije $\varnothing < 1$ mm,
glatke sa crvenim centrom i prozirnom zonom

↓

Hranljivi agar:
30±1°C 24h

↓

Podloga sa tri šećera (TSI):
30±1°C 24h
Christensen urea agar:
30±1°C 24h
Podloga za pokretljivost:
25±1°C 24h; 30±1°C 24h

↓

Biohemijski panel sa mikrosupstratima Api 20E:
37±1°C 24h

↓

Biotipizacija: diferencijalni biohemijski testovi
Serotipizacija: aglutinacija na pločici za određivanje najčešćih serotipova *Y. enterocolitica*
Genotipizacija: PFGE i PCR (*ail*, *ystA*, *ystB*)
Testiranje osetljivosti na antimikrobne agense

4.4.2. Identifikacija *Y. enterocolitica*

Izolati sa hranljivog agara preliminarno su ispitani korišćenjem testova ureaze (Christensen Urea Agar; Himedia, India), testa za produkciju kiseline i gasa fermentacijom glukoze, saharoze i laktoze (Triple Sugar Iron Agar; Himedia, India) pri 30°C tokom 24h i testom pokretljivosti pri 25°C i 35°C (Motility Test Medium; Liofilchem, Italy). Izolati koji su bili saharoza i glukoza pozitivni (žuta kosina i dubina bez stvaranja gasa i H₂S) ureaza pozitivni, pokretni pri 25°C i oksidaza negativni, testirani su komercijalnim biohemijskim testom sa mikrosupstratima za identifikaciju Enterobacteriaceae API 20E sistem (Bio-Mérieux, France). Nakon inkubacije pri 37±1°C tokom 24 h, očitane su biohemijske reakcije na osnovu uputstva proizvođača, a identifikacija je urađena pomoću identifikacionog softvera proizvođača (www.apiweb.biomerieux.com). Svi izolati *Y. enterocolitica* su presejani na hraniljivi agar (Himedia, India) i inkubirani pri temperaturi od 30°C tokom 24h, nakon čega je urađena biotipizacija i serotipizacija (Referentna laboratoriju za Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae i Yersinia enterocolitica, Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut" u Beogradu).

4.4.3. Određivanje biotipova *Y. enterocolitica*

Za određivanje biotipova *Y. enterocolitica* korišćene su sveže pripremljene podloge, čvrste i tečne, inokulisane u skladu sa procedurama navedenim u Bakteriološkom analitičkom priručniku (Weagant i Feng, 2017).

Identifikacija biotipova izolata *Y. enterocolitica* izvršena je na osnovu očitanih biohemijskih reakcija (Tabela 4.4), kao što su Tween 80 agar sa fenol red (Oxoid, UK), Žuč esculin agar (Bile esculin agar, Himedia, Indija), Podloga za pokretljivost i produkciju indola – SIM (Sulfide Indol Motility medium, Sigma-Aldrich, SAD), zatim 1% odnosno 0.5% rastvori šećera sa Andrade indikatorom: trehaloza i rafinoza, odnosno saharoza, ksiloza, ramnoza (Carl Roth, GmbH), Lizin agar - LIA (Lysin iron agar, Oxoid, UK), Ornitin bujon – ODC (Ornithine Decarboxylase Broth, Himedia, Indija), MRVP bujon (MRVP Broth, Oxoid, UK), β-D-glukozidaza (0.1% β-D-glucopyranoside, Sigma-Aldrich, SAD) i Pirazinamidaza agar (Pyrasinamidase agar, Himedia, Indija). Uslovi inkubacije kultura za ove testove su bili pri 25°C, 18-20 h odnosno za pojedine testove minimum 48h.

4.4.4. Serotipizacija *Y. enterocolitica*

Određivanje grupno specifičnog O antigena je izvršeno raspoloživim grupno specifičnim *Y. enterocolitica* O antiserumima O:3; O:5, O:8; i O:9 (IJZ Batut i Statens Serum Institut, Danska) metodom aglutinacije na pločici. Testirane su sveže i prethodno biotipizirane kulture *Y. enterocolitica* sa hranljivog agara (Himedia, Indija) uz obaveznu prethodnu proveru autoaglutinacije (detekcija R forme, engl. *rough form*). Ukoliko je suspenzija kulture na pločici u 0.9% NaCl bila autoaglutinabilna, proglašen je kao "R forma" i tom izolatu nije bilo moguće utvrditi serogrupu. Samo izolati kojima nije detektovana autoaglutinabilnost, "S forma" (engl. *smooth form*) je dalje serotipizovana. Za vizuelizaciju aglutinata prilikom serotipizacije korišćeno je upadajuće svetlo sa tamnom podlogom ispod, a jačina aglutinacije je semikvantitativno označena od 1+, 2+, 3+, 4+ zavisno da li je aglutinirano 25% ili 50% ili 75% ili 100% bakterijskih ćelija.

Nakon potvrde izolati su konzervirani na hranljivom agaru (Himedia, India) pri 4°C i u tripton soja bujonu sa dodatkom 20% glicerola (Himedia, India) pri -70°C.

Tabela 4.4. Biohemijski testovi za definitivnu identifikaciju *Y. enterocolitica* (adaptiran u skladu sa Edwards i Ewing, 1972; Sihvonen i sar., 2009; EFSA, 2009):

Biohemijski test	Biohemijska reakcija					
Identifikacija <i>Y. enterocolitica</i>						
Ureaza (Christensen urea)	+					
Produkcija kiseline i gasa (TSI):						
kosina/dubina TSI	+ /+ (žuto/žuto), osim kod BT 3 varijetet VP-S ⁻ (crveno/žuto)					
H ₂ S	-					
Gas	-					
Pokretljivost (SIM)	+					
Identifikacija biotipa <i>Y. enterocolitica</i>						
	BT 1A	BT 1B	BT 2	BT 3	BT4	BT5
Esteraza	+					
(Tween 80 agar)*	izuzetak -	+	-	-	-	-
Eskulinaza						
(Žuč-Eskulin agar)	+	-	-	-	-	-
Indol (SIM)	+	+	V	-	-	-
D-saharoza						
(produkcija kiseline)	+	+	+	+, izuzetak -	+	+
D-ksiloza						
(produkcija kiseline)	+	+	+	+	-	V
D-trehaloza (produkcija						
kiseline)	+	+	+	+	+	-
L-ramnoza (produkcija kiseline)	-	-	-	-	-	-
D-rafinoza (produkcija kiseline)	-	-	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaza						
(ODC bujon)	+	+	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaza						
(LIA)	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer test (VP)						
(MR-VP bujon sa reagensima						
anaftol i 40% KOH)*	+	+	+	+, izuzetak -	+	(+)
B-D glikozidaza						
(beta-D- glukopiranozid)	+	-	-	-	-	-
Pirazinamidaza						
(Pirazinamidaza agar, svež						
reagens 1ml 1% fero amonijum	+	-	-	-	-	-
sulfat)						
Inkubacija pri 25°C/18-20h; * = Inkubacija minimum 48h; V = varijabilna reakcija; () = usporena reakcija						

4.5. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)

Za ispitivanje genotipa izolati *Y. enterocolitica* zasejani su na tripton soja agar (TSA, Merck, Nemačka) i inkubirani pri 37°C tokom 14-18 h. Nakon inkubacije, pripremljene su ćelijske suspenzije optičke gustine 1,3 - 1,4 (spektrofotometar, 610 nm) prenošenjem izraslih kolonija u epruvete sa puferom za pripremu suspenzije (100mM Tris: 100mM EDTA, pH8). Zatim je dodata proteinaza K (20µl pri 20 mg/ml) u 400 µl svake ćelijske suspenzije. Nakon toga dodato je 400 µl rastopljene 1% SeaKem Gold agaroze (Lonza, Switzerland), u svaku suspenziju *Yersinia*+proteinaza i sve zajedno dodato u kalupe za višekratnu upotrebu koji su se učvrstili pri sobnoj temperaturi 10-15 minuta. Liziranje ćelija urađeno je pomoću lysis buffer/proteinase K master miksa (50mM Tris:50mM EDTA, pH8) + 1% sacrosyl + 25µl proteinase K (25mg/ml) u vodenom kupatilu pri 54-55°C tokom 1,5 - 2 h uz snažno mešanje (175–200rpm). Nakon liziranja, ispiranje je urađeno dva puta u dejonizovanoj vodi i četiri puta u Tris-EDTA puferu, održavajući temperaturu reagenasa pri 54-55°C. Nakon liziranja plagovi su podvrgnuti digestiji koristeći *NotI* enzim fast (50U/lysed plug) (ThermoFisher Scientific, USA) pri 37°C tokom 5 h. Kao DNK marker korišćena je *Salmonella* Braenderup H9812 koja je digestirana pomoću *XbaI* fast enzima (50U/lysed plug) (ThermoFisher Scientific, USA) prema protokolu proizvođača (PulseNet, 2017). Elektroforeza je sprovedena koristeći CHEF-DR II system (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA) u 1% SeaKem Gold agarozu (Lonza, Switzerland) u 0.5% TBE buffer (89 mM Trisbase, 89mMboric acid, 2mM disodium EDTA) na 200 volti i temperaturi od 14°C tokom 27 h sa početnim vremenom impulsa od 2,16 s i završnim vremenom impulsa od 35,38 s. Gelovi su obojeni etidijum bromidom (2 mg/ml u vodi) (Bio-Rad, Hercules,USA) tokom 1 h a snimanje je obavljeno sa UV transluminatorom u Gel Doc XR sistemu (Bio-Rad, USA). Preliminarna analiza obojenog gela izvršena je pomoću GelDoc software (Bio-Rad, USA) a analiza i upoređivanje fragmenata DNK urađena je koristeći FPQuest softvera (Bio-Rad, USA).

4.6. Detekcija gena virulencije *Y. enterocolitica*

Ekstrakcija DNK urađena je iz 24 časovne kulture bakterija inkubisanih na neselektivnom agaru (Plate Count Agar, Himedia, Mumbai, India). Sterilnom ezom suspendovane su pojedinačne kolonije u 200 µl vode i kuvane pri 95°C tokom 15 minuta da bi se ekstrahovala bakterijska DNK, koja je prethodno amplifikovana pomoću prajmera za triplex PCR (Tabela 4.5) (Bancerz-Kisiel i sar., 2012). Elektroforeza PCR produkata je sprovedena koristeći WIDE MINI-SUB elektroforezis sistem (Bio-Rad, USA) u 2% UltraPure agarozu (Invitrogen, USA) u TAE puferu. Korišćena je DNK GeneRuler 100 bp DNA ladder (ThermoFisher Scientific, Lithuania) za određivanje PCR produkata. Gelovi su obojeni etidijum bromidom (2 mg/ml u vodi) (Bio-Rad, USA) tokom 30 min i snimljeni sa UV transluminatorom u Gel Doc XR sistemu (Bio-Rad, USA). Analiza obojenog gela izvršena je pomoću GelDoc software (Bio-Rad, USA).

Tabela 4.5. Sekvence prajmera korišćenih za triplex PCR

Gen	Ime prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina produkta
<i>Ail</i>	<i>Ail</i> -a	5'TGGTTATGCGCAAAGCCATGT3'	356 bp
	<i>Ail</i> -b	5'TGGAAGTGGGTTGAATTGCA 3'	
<i>ystA</i>	<i>yst</i> -a	5'GTCTTCATTTGGAGGATTCGGC 3'	134 bp
	<i>yst</i> -b	5'AATCACTACTGACTTCGGCTGG 3'	
<i>ystB</i>	<i>yst</i> 1	5'TGTCAGCATTTATTCTCAACT 3'	180 bp
	<i>yst</i> 2	5'GCCGATAATGTATCATCAAG 3'	

4.7. Testiranje osetljivosti *Y. enterocolitica* na antimikrobne agense

Za ispitivanje osetljivosti *Y. enterocolitica* na antimikrobne agense korišćena je disk difuziona metoda u skladu sa standardom *Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (CLSI, 2015).

Sterilnim brisem uzeta je kultura *Y. enterocolitica* sa hranljivog agara (Himedia, Indija) i pripremljena suspenzija u 2 ml sterilnog fiziološkog rastvora (API ampule 0,85% NaCl, 2 ml, Biomerieux, Francuska). Suspenzija je homogenizovana vorteksom (Vortex3 IKA, GmbH). Optička gustina suspenzije (0.5 McFarland jedinica) je izmerena denzimatom (Densimat, Biomerieux, Francuska) što je približno 2×10^8 bakterija ml⁻¹.

Suspenzija kulture *Y. enterocolitica*, uzeta je sterilnim brisem, koji nekoliko puta rotiran o unutrašnji zid ampule radi uklanjanja viška tečnosti, a potom je inokulisana podloga Mueller-Hinton agar (Himedia, Indija). Inokulum je nanet na površinu podloge pokretima brisa levo-desno u tri pravca pod uglom od 60° kako bi se posle inkubacije dobio konfluentan rast kultura *Y. enterocolitica*.

Neposredno posle inokulacije podloge, sterilnom pincetom su postavljeni antimikrobni diskovi (BioRad, Francuska; i Bioanalyse, Turska*) po šest na jednu ploču. Korišćeni su sledeći diskovi: ampicilin (Amp 10), hloramfenikol (C 30), sulfonamide* (Sul 300), trimetoprim (Tmp 5), gentamicin (G 10), tetraciklin (Te 30), nalidiksinska kiselina (Na 30), cefotaksim (Ctx 30), ceftazidim (Caz 30), cefoksitin (Fox 30), meropenem (Mem 10), ciprofloksacin (Cip5). Podloge su inkubirane pri temperaturi od 25°C tokom 18-20h. Nakon inkubacije izmereni su dijometri zona inhibicije (≥ 7 mm) ili odsustvo zone inhibicije (=6mm) oko diskova. Merenje zona inhibicije je vršeno uz upadajuću svetlost sa tamnom podlogom ispod ploče sa diskovima. Veličina zone inhibicije za dati antimikrobni agens je određivala interpretativnu kategoriju, S (osetljiv), R (neosetljiv), I (umereno osetljiv) na osnovu standarda *Zone diameter and Minimal Inhibitory Concentration Interpretative Standards for Enterobacteriaceae* (CLSI, 2015). Kontrola kvaliteta metode vršena je sa referentnom kulturom *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.8. Statistička analiza i utvrđivanje faktora rizika

Na osnovu informacija iz upitnika, nezavisne kategorijske varijable su uključene u univarijantnu logističku analizu kako bi se ispitaio pojedinačan uticaj svih ispitivanih faktora na pojavu *Y. enterocolitica* infekcije. Nakon toga, varijable sa značajnošću $p < 0,10$ i manje, iz univarijantnog modela su testirane na kolinearnost i uključene u model multivarijantne logističke regresije. Finalni model služi da identifikuje faktore rizika koji zajedno utiču na pojavu *Y. enterocolitica* u našoj studiji. Hosmer-Lemeshow test je korišćen za procenu ukupne prihvatljivosti logističkih modela. Rezultati su prikazani kao odnos verovatnoće "odds ratio" (OR) sa 95% intervalom poverenja (95% CI). Hi-kvadratni test je upotrebljen radi procene učestalosti *Y. enterocolitica* infekcije unutar nezavisnih kategorijskih varijabli. Statistička obrada rezultata je obavljena korišćenjem SPSS softvera verzije 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. REZULTATI

5.1. Podaci iz lanca hrane i uzorkovanje

Za potrebe ove studije, teritorija Republike Srbije je označena i podeljena na regione, u kojima je i najveća farmska proizvodnja svinja a uključuju Region I – Severno Bački i Južno Bački okrug, Region II – Sremski okrug, Region III – Mačvanski okrug, Region IV – Podunavski i Braničevski okrug. Takođe, označen je još jedan region, Region V, kome pripadaju Toplički i Rasinski okrug, kao i Nišavski u okviru koga su locirane i klanice sa kojih su uzimani uzorci. Uzorci tonzila uzeti su od zaklanih svinja sa tri klanice (A, B i C), lokacijski smeštene na području Nišavskog okruga.

Podaci iz lanca hrane, prikupljeni su od učesnika (farma, prevoznik, klanica) korišćenjem prethodno pripremljene ankete.

Svinje su poticale sa 30 farmi, koje su geografski locirane u 5 regiona (Tabela 4.2, Slika 4.1). Iz Regiona I, uzorkovanjem je obuhvaćeno 4/30 farmi (13,3%); Regiona II, 11/30 farmi (36,7%); Regiona III, 5/30 farmi (16,7%); Regiona IV, 3/30 farmi (10,3%); i Regiona V, 7/30 farmi (23,3%).

U pogledu kapaciteta farmi, farme su podeljene na farme malog kapaciteta sa <150 svinja, srednjeg kapaciteta od 150 do 500 jedinki i velike farme sa >500 svinja. Struktura je bila sledeća: farme malog kapaciteta bile su zastupljene sa 26,7 % (8/30), srednjeg kapaciteta 30% (9/30) i velike farme su činile udeo od 43,3 % (13/30). Kapacitet i raspored farmi po regionima prikazan je u tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Kapacitet i raspored farmi svinja obuhvaćenih uzorkovanjem po regionima

Region	Farma			Ukupno
	mala	srednja	velika	
I	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	4 (13,3%)
II	3 (27,3%)	6 (54,5%)	2 (18,2%)	11 (36,7%)
III	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	5 (16,7%)
IV	-	-	3 (100%)	3 (10,0%)
V	2 (28,6%)	-	5 (71,4%)	7 (23,3%)
Ukupno	8 (26,7 %)	9 (30,0 %)	13 (43,3%)	30 (100 %)

U odnosu na sistem gajenja koji se primenjuje na farmama, farme su za potrebe ove studije podeljene na dva tipa. Tip I - predstavlja farme zatvorenog tipa na kojima se proizvodnja odvija od prašenja do završetka tovljenja tzv. *Farrow-to-finish* sistem. Tip II - predstavlja farme otvorenog tipa koje su specijalizovane za tov svinja koje prasad za tov nabavljaju iz drugih izvora tzv. *All in/All out* ili *Fattening* sistem. Farme u Tip-u I, na kojima se primenjuje zatvoreni sistem (*Farrow-to-finish*) bile su zastupljene u 46,7% (14/30), a 53,3% (16/30) farme u Tip-u II na kojima se primenjuje otvoreni sistem (*All in/All out*, *Fattening*). Tip farmi obuhvaćenih uzorkovanjem po regionima prikazan je u tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Tip farmi obuhvaćenih uzorkovanjem po regionima

Region	Farma		Ukupno
	Tip I	Tip II	
I	1 (25%)	3 (75%)	4 (13,3%)
II	2 (18,2%)	9 (81,8%)	11 (36,7%)
III	3 (60%)	2 (40%)	5 (16,7%)
IV	3 (100%)	0 (0%)	3 (10,0%)
V	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7 (23,3%)
Ukupno	14 (46,7%)	16 (53,3%)	30 (100%)

U odnosu na kapacitet farme, farme u Tip-u I su činile 7,1% malog, 14,3% srednjeg i 78,6% velikog kapaciteta, a kod farmi u Tip-u II farme malog i srednjeg kapaciteta bile su zastupljene sa po 43,8 % i 12,5% velikog kapaciteta. Na svim farmama koristi se suva koncentrovana hrana, a u 7/30 (23,3%) objekata bio je sistem zatvorenog tipa i to na farmama velikog kapaciteta (7/13, 53,8%).

Primena pravila dobre higijenske prakse daje značajan doprinos intenzivnoj proizvodnji. Svest o važnosti ovih pravila je konstatovan na 83 % (25/30) anketiranih farmi, gde su radnici imali obuke u vezi sa principima dobre higijenske prakse. Na 5/30 farmi (16,7%) nisu sprovedene obuke i to u Regionu I (jedna farma srednjeg i dve farme velikog kapaciteta), kao i u Regionu V (dve farme velikog kapaciteta). Primena ovih pravila je ocenjena kroz indikatore: primena biosigurnosnih mera, tip vodnosnabdevanja i tretman vode, nošenje radne odeće i obuće, prisustvo/odsustvo pasa, mačaka i glodara.

Primena biosigurnosnih mera na farmama je ocenjena kroz postojanje dezobarijera u objektu. Konstatovano je da kod 16/30 (53,3%) farmi se poštuju biosigurnosne mere, dok je kod 14/30 (46,7%) utvrđeno odstupanje. Odstupanje je konstatovano na farmama malog (6/8, 75%) odnosno srednjeg kapaciteta (8/9, 88,9%). U objektima u Tip-u I, biosigurnosne mere su primenjene kod 13/14 (92,9%) farmi, dok je odstupanje konstatovano u jednom objektu (7,1%). Situacija je nešto drugačija u objektima u Tip-u II, gde je odsustvo primene biosigurnosnih mera u objektu utvrđeno kod 13/16 (81,3%) a usaglašenost kod 3/16 (18,8%) farmi.

Najveći broj farmi se snabdeva vodom iz sopstvenih izvora (23/30, 76,7%), dok preostali objekti koriste vodu iz gradskog vodovoda (7/30, 23,3%). Tretman i kontrola vode iz sopstvenih izvora primenjuje se kod 8/23 (34,8%) objekta.

Na farmama velikog kapaciteta, radnici uredno nose radnu odeću i obuću (13/13, 100%), dok je odstupanje konstatovano na farmama malog (8/8, 100%) odnosno srednjeg (8/9, 88,9%) kapaciteta.

Prisustvo pasa, mačaka i glodara je utvrđeno na farmama u 25/30 (83,3%), 17/30 (56,7%) i 26/30 (86,7%) objekata sukcesivno. Najčešće odstupanje je konstatovano u objektima malog (8/8, 100%) odnosno srednjeg (8/9, 88,9%) kapaciteta. Uslugu deratizacije i kontrole kućica sa mamcima za kontrolu glodara, nabavilo je 6/30 (20%) farmi, dok su preostale farme ovaj postupak sprovele samostalno (24/30, 80%).

Transport životinja od mesta nabavke (Region I, II, III, IV i V) do klanice (klanica A, B i C, Niški okrug), sproveden je prevoznim sredstvima koja su namenjena za prevoz životinja. U 19/30 (63 %) slučajeva prevozno sredstvo je imalo jednu etažu, dok je u 11/30 (36,7%) slučajeva bio spratni sistem. Trajanje prevoza označeno je kao kraće (<4 h) i duže (>4 h). Kraći prevoz životinja je sproveden u 33,3% (10/30) slučajeva i to sa farmi iz Regiona IV i V, dok je duži prevoz bio zastupljen u 66,7% (20/30) slučajeva iz Regiona I, II i III.

Dužina boravka životinja u depou klanice, određena je na osnovu kriterijuma kao kraći (0-3 h) i duži (3-6 h). Kraći boravak životinja u depou zabeležen je u 58,3% (7/12) na klanici A, 83,3% (5/6) klanici B i 33,3% (4/12) na klanici C. Duži boravak životinja u depou, konstatovan je na klanici A u 41,7% (5/12), klanici B u 16,7% (1/6) i klanici C u 66,7% (8/12) slučajeva.

Kao što je naglašeno, uzorkovanje je sprovedeno u 30 serija i uzeto je 960 uzoraka tonzila sa trupova zaklanih svinja. Procentulana zastupljenost uzetih uzoraka po regionima bila je sledeća: Region I, 16,7% (160/960); Region II, 39,4% (378/960); Region III, 15,6% (150/960); Region IV, 11,5% (110/960); i Region V, 16,9% (162/960). Uzorkovanje je sprovedeno tokom četiri sezone (leto, jesen, zima i proleće). Udeo uzoraka po sezonama bio je ujednačen i iznosio je: leto (242/960, 25%), jesen (243/960, 25%), zima (255/960, 27%) i proleće (220/960, 23 %).

5.2. Nalaz *Y. enterocolitica* u uzorcima tonzila

Uzorkovanje je sprovedeno u 30 serija tokom 12 meseci (četiri sezone) i mikrobiološki je ispitano 960 tonzila svinja, koje su poticale iz pet regiona (I, II, III, IV i V). Tokom jednogodišnjeg ispitivanja ukupno je 83,3% serija (25/30) bilo pozitivno na *Y. enterocolitica*.

Od ukupno ispitanih 960 uzoraka tonzila svinja, *Y. enterocolitica* je izolovana iz 100 uzoraka, tako da je ukupna prevalencija iznosila 10,4% (95% CI=8,5-12,3%). Iz tri ispitana uzorka izolovana je *Y. frederiksenii* (0,2%).

Nalaz *Y. enterocolitica* procenjivan je u odnosu na klanicu, tip farme, veličinu farme, region, sezonu, vreme boravka u depou klanice, prisustvo glodara i primenu biosigurnosnih mera. Primenom Hi-kvadratnog testa uočena je statistički značajna razlika u prevalenciji *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja u odnosu na klanicu ($p<0,038$), tip farme ($p<0,009$), region ($p<0,001$), sezonu ($p<0,001$) i vreme provedeno u depou klanice ($p<0,001$).

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po klanicama i tipovima farmi prikazana je u tabeli 5.3. Najveća prevalencija utvrđena je na klanici B i iznosila je 16,8%, dok je na klanici A iznosila 10 % i klanici C 8,9%. Iz navedenog se može zaključiti da je postojala značajna razlika u broju pozitivnih svinja dospelih na klanicu B u odnosu na klanicu A ($p<0,035$) i C ($p<0,013$).

U odnosu na tip farme, može se konstatovati da je prevalencija ovog mikroorganizma bila veća u tonzilama svinja koje su poticale sa farmi Tip II i utvrđena je u 12,7% ispitanih uzoraka,

dok je kod svinja sa farmi Tip I utvrđena u 7,5 %. Posmatrajući klanicu C kao zasebnu celinu, može se uočiti značajan broj pozitivnih svinja prispelih sa farme Tip II u odnosu na Tip I farme ($p<0,031$).

Tabela 5.3. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po klanicama i tipovima farmi

Klanica			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
C	Farma	Tip I	202 (94%)	13 (6%)	215
		Tip II	158 (87,8%)	22 (12,2%)	180
	Ukupno		360 (91,1%)	35 (8,9%)	395
A	Farma	Tip I	182 (91%)	18 (9%)	200
		Tip II	214 (89,2%)	26 (10,8%)	240
	Ukupno		396 (90%)	44 (10%)	440
B	Farma	Tip I	9 (90%)	1 (10%)	10
		Tip II	95 (82,6%)	20 (17,4%)	115
	Ukupno		104 (83,2%)	21 (16,8%)	125
Ukupno	Farma	Tip I	393 (92,5%)	32 (7,5%)	425
		Tip II	467 (87,3%)	68 (12,7%)	535
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po klanicama i regionima prikazana je tabeli 5.4. Na osnovu prikazanih rezultata u tabeli, najveća prevalencija utvrđena je u tonzilama svinja poreklom iz Regiona I (18,8%), dok je najmanja prevalencija zabeležena u Regionu III (6%). Sagledavajući Region I kao područje sa najvećim brojem pozitivnih svinja, značajno manji broj pozitivnih svinja je potvrđen u Regionu II ($p<0,003$), III ($p<0,001$) i V ($p<0,001$). U odnosu na klanicu, najveća prevalencija utvrđena je na klanici B u tonzilama svinja poreklom iz Regiona I (60%) ($p<0,001$).

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po klanicama i vremenu boravka u depou prikazana je u tabeli 5.5. Na osnovu rezultata iz tabele može se zaključiti da se prevalencija povećavala sa dužim boravkom životinja u depou klanice i iznosila je 13,6%, dok je u slučaju kraćeg boravka životinja u depou ovaj procenat niži i iznosi 7,1%. Pojedinačno gledano, u slučaju dužeg boravka životinja u depou, nalaz jersinija u tonzilama svinja je bio najveći na klanici A ($p<0,001$).

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po tipovima farmi i vremenu boravka u depou klanice prikazana je u tabeli 5.6. Analizirajući rezultate iz tabele možemo zaključiti da je prevalencija bila veća kod svinja koje su duže boravile u depou. Nalaz u tonzilama svinja poreklom sa farme u Tip-u I iznosila je 12%, dok je prevalencija kod svinja poreklom sa farme Tip II iznosila 14,7 %. U slučaju kraćeg boravka životinja u depou nalaz jersinija je bio niži i iznosio je 3,9% (farma, Tip I) i 10,2 % (farma, Tip II). Statistički gledano, kod svinja poreklom sa farme Tip I koje su duže boravile u depou uočen je veći nalaz jersinija u tonzilama ($p<0,002$).

Tabela 5.4. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po klanicama i regionima

Klanica			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
C	Region	III	36 (90%)	4 (10%)	40
		II	50 (94,3%)	3 (5,7%)	53
		I	122 (87,1%)	18 (12,9%)	140
		V	133 (93,7%)	9 (6,3%)	142
		IV	19 (95%)	1 (5%)	20
	Ukupno		360 (91,1%)	35 (8,9%)	395
A	Region	III	96 (96%)	4 (4%)	100
		II	214 (89,2%)	26 (10,8%)	240
		I	0 (0%)	0 (0%)	0
		V	10 (100%)	0 (0%)	10
		IV	76 (84,4%)	14 (15,6%)	90
	Ukupno		396 (90%)	44 (10%)	440
B	Region	III	9 (90%)	1 (10%)	10
		II	78 (91,8%)	7 (8,2%)	85
		I	8 (40%)	12 (60%)	20
		V	9 (90%)	1 (10%)	10
		IV	50 (94,3%)	3 (5,7%)	53
	Ukupno		104 (83,2%)	21 (16,8%)	125
Ukupno	Region	III	141 (94%)	9 (6%)	150
		II	342 (90,5%)	36 (9,5%)	378
		I	130 (81,3%)	30 (18,8%)	160
		V	152 (93,8%)	10 (6,2%)	162
		IV	95 (86,4%)	15 (13,6%)	110
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

Tabela 5.5. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po klanicama i vremenu boravka u depou klanice

Klanica			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
C	Depo	0-3h	109 (96,5%)	4 (3,5%)	113
		3-6h	251 (89%)	31 (11%)	282
	Ukupno		360 (91,1%)	35 (8,9%)	395
A	Depo	0-3h	247 (95%)	13 (5%)	260
		3-6h	149 (82,8%)	31 (17,2%)	180
	Ukupno		396 (90%)	44 (10%)	440
B	Depo	0-3h	79 (83,2%)	16 (16,8%)	95
		3-6h	25 (83,3%)	5 (16,7%)	30
	Ukupno		104 (83,2%)	21 (16,8%)	125
Ukupno	Depo	0-3h	435 (92,9%)	33 (7,1%)	468
		3-6h	425 (86,4%)	67 (13,6%)	492
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

Tabela 5.6. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po tipovima farmi i vremenu boravka u depou klanice

Farma			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
Tip I	Depo	0-3h	224 (96,1%)	9 (3,9%)	233
		3-6h	169 (88%)	23 (12%)	192
	Ukupno		393 (92,5%)	32 (7,5%)	425
Tip II	Depo	0-3h	211 (89,8%)	24 (10,2%)	235
		3-6h	256 (85,3%)	44 (14,7%)	300
	Ukupno		467 (87,3%)	68 (12,7%)	535
Ukupno	Depo	0-3h	435 (92,9%)	33 (7,1%)	468
		3-6h	425 (86,4%)	67 (13,6%)	492
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

*Tip I - od prasilišta do tovilišta

Tip II - farma za tov svinja

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po regionima i tipovima farmi prikazana je u tabeli 5.7. U skladu sa dobijenim rezultatima, utvrđena je najveća prevalencija ove bakterije u tonzilama svinja poreklom iz Regiona I, farmi Tip II u 24% ispitanih uzoraka ($p<0,028$). Kod svinja poreklom sa ovog tipa farme, u preostalim regionima (izuzimajući region IV), prevalencija jersinije je utvrđena u 10,2% (Region II), 10% (Region III) i 6% (Region V). Iz regiona IV, uzorkovanjem su obuhvaćene samo svinje koje su poticale sa farme Tip I i nalaz jersija u tonzilama bio je 13,6 %, dok je u preostalim regionima ovaj procenat bio sledeći 10% (Region I), 5,7 % (Region II), 4% (Region III) i 3,9% (Region V).

Tabela 5.7. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po regionima i tipovima farmi

Region			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
III	Farma	Tip I	96 (96%)	4 (4%)	100
		Tip II	45 (90%)	5 (10%)	50
	Ukupno		141 (94%)	9 (6%)	150
II	Farma	Tip I	50 (94,3%)	3 (5,7%)	53
		Tip II	292 (89,8%)	33 (10,2%)	325
	Ukupno		342 (90,5%)	36 (9,5%)	378
I	Farma	Tip I	54 (90%)	6 (10%)	60
		Tip II	76 (76%)	24 (24%)	100
	Ukupno		130 (81,3%)	30 (18,8%)	160
V	Farma	Tip I	98 (96,1%)	4 (3,9%)	102
		Tip II	54 (90%)	6 (10%)	60
	Ukupno		152 (93,8%)	10 (6,2%)	162
IV	Farma	Tip I	95 (86,4%)	15 (13,6%)	110
		Tip II	0 (0%)	0 (0%)	0
	Ukupno		95 (86,4%)	15 (13,6%)	110
Ukupno	Farma	Tip I	393 (92,5%)	32 (7,5%)	425
		Tip II	467 (87,3%)	68 (12,7%)	535
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

*Tip I - od prasilišta do tovilišta

Tip II - farma za tov svinja

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po sezonama i tipovima farmi prikazana je u tabeli 5.8. Najčešći nalaz jersinija utvrđen je tokom zimskih meseci (18%), dok je tokom leta bio najniži (6,2%). Zima kao sezona dala je najveći broj pozitivnih svinja u odnosu na jesen ($p<0,002$), proleće ($p<0,002$), odnosno leto ($p<0,001$). Prevalencija je u svim sezonama bila veća kod svinja koje su poticale sa farmi Tip II (Leto, 6,8%; Jesen, 11,1%; Zima, 26,1% i Proleće, 10%) u odnosu na svinje poreklom sa farme Tip I (Leto, 3,8%; Jesen 1,6%; Zima, 11,4% i Proleće 7,6%). Ispitujući tip farme porekla svinja tokom sezona, utvrđena je veća prevalencija *Y. enterocolitica* kod svinja poreklom sa farme Tipa II tokom zime ($p<0,002$) i jeseni ($p<0,021$) u odnosu na farme Tip I tokom datih sezona.

Tabela 5.8. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po sezonama i tipovima farmi

Sezona			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
Leto	Farma	Tip I	50 (96,2%)	2 (3,8%)	52
		Tip II	117 (93,2%)	13 (6,8%)	190
	Ukupno		227 (93,8%)	15 (6,2%)	242
Jesen	Farma	Tip I	62 (98,4%)	1 (1,6%)	63
		Tip II	160 (88,9%)	20 (11,1%)	180
	Ukupno		222 (91,4%)	21 (8,6%)	243
Zima	Farma	Tip I	124 (88,6%)	16 (11,4%)	140
		Tip II	85 (73,9%)	30 (26,1%)	115
	Ukupno		209 (82%)	46 (18%)	255
Proleće	Farma	Tip I	157 (92,4%)	13 (7,6%)	170
		Tip II	45 (90%)	5 (10%)	50
	Ukupno		202 (91,8%)	18 (8,2%)	220
Ukupno	Farma	Tip I	393 (92,5%)	32 (7,5%)	425
		Tip II	467 (87,3%)	68 (12,7%)	535
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

*Tip I - od prasilišta do tovilista

Tip II - farma za tov svinja

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po sezonama i klanicama prikazana je u tabeli 5.9. Kao što je prethodno navedeno, najčešći nalaz jersinija utvrđen je na klanici B, koja ima i najveći satni kapacitet klanja i iznosi 16,8%, dok je zima kao sezona imala najveću prevalenciju *Y. enterocolitica*, ukupno 18%. U odnosu na sezonu, na klanici B je tokom zimskih meseci prevalencija ovih bakterija bila najveća i iznosila je 28,9%, a na klanicama A i C nalaz je bio niži i iznosio je sukcesivno 15,8% i 15,6%. Tokom letnjih meseci prevalencija ovih bakterija je bila najniža. U odnosu na klanice, tokom letnje sezone prevalencija jersinija je bila na klanici A 10%, zatim klanici B 3,3% i najniža na klanici C 2,2%. Posmatrajući ponaosob klanice tokom sezona, nalaz *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja na klanici A tokom leta je bio nešto veći ($p<0,05$) u odnosu na druge dve klanice.

Tabela 5.9. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po sezonama i klanicama

Sezona			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
Leto	Klanica	C	90 (97,8%)	2 (2,2%)	92
		A	108 (90%)	12 (10%)	120
		B	29 (96,7%)	1 (3,3%)	30
	Ukupno		227 (93,8%)	15 (6,2%)	242
Jesen	Klanica	C	76 (91,6%)	7 (8,4%)	83
		A	121 (93,1%)	9 (6,9%)	130
		B	25 (83,3%)	5 (16,7%)	30
	Ukupno		222 (91,4%)	21 (8,6%)	241
Zima	Klanica	C	76 (84,4%)	14 (15,6%)	90
		A	101 (84,2%)	19 (15,8%)	120
		B	32 (71,1%)	13 (28,9%)	45
	Ukupno		209 (82%)	46 (18%)	255
Proleće	Klanica	C	118 (90,8%)	12 (9,2%)	130
		A	66 (94,3%)	4 (5,7%)	70
		B	18 (90%)	2 (10%)	20
	Ukupno		202 (91,8%)	18 (8,2%)	220
Ukupno	Klanica	C	360 (91,1%)	35 (8,9%)	395
		A	396 (90%)	44 (10%)	440
		B	104 (83,2%)	21 (16,8%)	125
	Ukupno		860 (89,6)	100 (10,4%)	960

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama ispitanih svinja po sezonama i regionu prikazana je u tabeli 5.10. Analizirajući rezultate iz tabele uviđamo da je prevalencija u odnosu na sezonu bila najveća u Regionu I i iznosila je 40% u toku zimskog perioda ($p < 0,001$). U preostalom delu godine, nalaz ovih bakterija u tonzilama zaklanih svinja poreklom iz Regiona I, kretao se u rasponu od 0 – 10 %. Za svinje poreklom iz Regiona IV (13,6%), najčešći nalaz ove bakterije bio je tokom zimske sezone, kao i za Region II (10,9%), a u Regionu V (10%) tokom jesenjih meseci. Kod svinja poreklom iz Regiona III, samo tokom prolećne sezone utvrđeno je prisustvo *Y. enterocolitica* u tonzilama, čija je prevalencija iznosila 8,2%.

Tabela 5.10. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja po sezonama i regionima

Sezona			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
Leto	Region	III	0 (0%)	0 (0%)	0
		II	137 (91,3%)	13 (8,7%)	150
		I	40 (100%)	0 (0%)	40
		V	50 (96,2%)	2 (3,8%)	52
		IV	0 (0%)	0 (0%)	0
	Ukupno		227 (93,8%)	15 (6,2%)	242
Jesen	Region	III	40 (100%)	0 (0%)	40
		II	128 (89,5%)	15 (10,5%)	143
		I	0 (0%)	0 (0%)	0
		V	54 (90%)	6 (10%)	60
		IV	0 (100%)	0 (0%)	0
	Ukupno		222 (91,4%)	21 (8,6%)	243
Zima	Region	III	0 (0%)	0 (0%)	0
		II	49 (89,1%)	6 (10,9%)	55
		I	36 (60%)	24 (40%)	60
		V	29 (96,7%)	1 (3,3%)	30
		IV	95 (86,4%)	15 (13,6%)	110
	Ukupno		209 (82%)	46 (18%)	255
Proleće	Region	III	101 (91,8%)	9 (8,2%)	110
		II	28 (93,3%)	2 (6,7%)	30
		I	54 (90%)	6 (10%)	60
		V	19 (95%)	1 (5%)	20
		IV	0 (0%)	0 (0%)	0
	Ukupno		202 (91,8%)	18 (8,2%)	220
Ukupno	Region	III	141 (94%)	9 (6%)	150
		II	342 (90,5%)	36 (9,5%)	378
		I	130 (81,3%)	30 (18,8%)	160
		V	152 (93,8%)	10 (6,2%)	162
		IV	95 (86,4%)	15 (13,6%)	110
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja u odnosu na tip i veličinu farmi prikazana je u tabeli 5.11. Na osnovu dobijenih rezultata, može se konstatovati da je češći nalaz jersinija na farmama Tip II velikog (>500), srednjeg (150-500) i malog (<150) kapaciteta, u odnosu na farme Tip I, sa tendencijom statističke značajnosti ($p=0,165$). Najveća prevalencija je zabeležena na farmama velikog kapaciteta Tip II i iznosi 15%, a na farmi srednjeg i malog kapaciteta sukcesivno je 11,3% i 13,5%. Na farmama Tip I velikog i srednjeg kapaciteta utvrđen je približno isti nalaz i sukcesivno iznosi 8,3% i 8,6%. Iz obrađenih uzoraka tonzila svinja poreklom sa malih farmi Tip I nije izolovana ova bakterija.

Tabela 5.11. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja u odnosu na tip i veličinu farme

Farma			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
Tip I	Veličina farme	<150	40 (100%)	0 (0%)	40
		150-500	64 (91,4%)	6 (8,6%)	70
		>500	289 (91,7%)	26 (8,3%)	315
	Ukupno		393 (92,5%)	32 (7,5%)	425
Tip II	Veličina farme	<150	186 (86,5%)	29 (13,5%)	215
		150-500	213 (88,8%)	27 (11,3%)	240
		>500	68 (85%)	12 (15%)	80
	Ukupno		467 (87,3%)	68 (12,7%)	535
Ukupno	Veličina farme	<150	226 (88,6%)	29 (11,4%)	255
		150-500	277 (89,4%)	33 (10,6%)	310
		>500	357 (90,4%)	38 (9,6%)	395
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

*Tip I - od prasilišta do tovilišta

Tip II - farma za tov svinja

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama u odnosu na tip farme i kontrolu glodara prikazana je u tabeli 5.12. Kontrola glodara u primarnom sektoru je od velikog značaja za održavanje higijene na farmi i sprečavanja potencijalne kontaminacije. Veća prevalencija ovih bakterija je utvrđena na farmama Tip I gde se ne sprovodi kontrola glodara ($p<0,017$). Prevalencija je konstatovana na nivou od 10,9%, u odnosu na isti tip farmi gde se deratizacija sprovodi, sa prevalencijom od 4,7%.

Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja u odnosu na tip farme i primenu biosigurnosnih mera prikazana je u tabeli 5.13. Primena biosigurnosnih mera na farmama je osnova dobre proizvođačke i higijenske prakse. Uvidom u dobijene rezultate, može se videti da je nalaz ovih bakterija utvrđen kako na farmama u Tip-u I tako i na farmama u Tip-u II iako se na istim primenjuju biosigurnosne mere. Obrađen je relativno mali broj uzoraka svinja (10) sa farmi Tip I na kojima se ne primenjuju biosigurnosne mere.

Tabela 5.12. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja
odnosu na tip farme i kontrolu glodara

Farma			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
Tip I	Kontrola glodara	Ne	172 (89,1%)	21 (10,9%)	193
		Da	221 (95,3%)	11 (4,7%)	232
	Ukupno		393 (92,5%)	32 (7,5%)	425
Tip II	Kontrola glodara	Ne	68 (85%)	12 (15%)	80
		Da	399 (87,7%)	56 (12,3%)	455
	Ukupno		467 (87,3%)	68 (12,7%)	535
Ukupno	Kontrola glodara	Ne	240 (87,9%)	33 (12,1%)	273
		Da	620 (90,2%)	67 (9,8%)	687
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

*Tip I - od prasilišta do tovilišta

Tip II - farma za tov svinja

Tabela 5.13. Prevalencija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja
u odnosu na tip farme i primenu biosigurnosnih mera

Farma			Broj negativnih svinja (%)	Broj pozitivnih svinja (%)	Ukupno
Tip I	Biosigurnosne mere	Ne	10 (100%)	0 (0%)	10
		Da	383 (92,3%)	32 (7,7%)	415
	Ukupno		393 (92,5%)	32 (7,5%)	425
Tip II	Biosigurnosne mere	Ne	363 (87,5%)	52 (12,5%)	415
		Da	104 (86,7%)	16 (13,3%)	120
	Ukupno		467 (87,3%)	68 (12,7%)	535
Ukupno	Biosigurnosne mere	Ne	373 (87,8%)	52 (12,2%)	425
		Da	487 (91%)	48 (9%)	535
	Ukupno		860 (89,6%)	100 (10,4%)	960

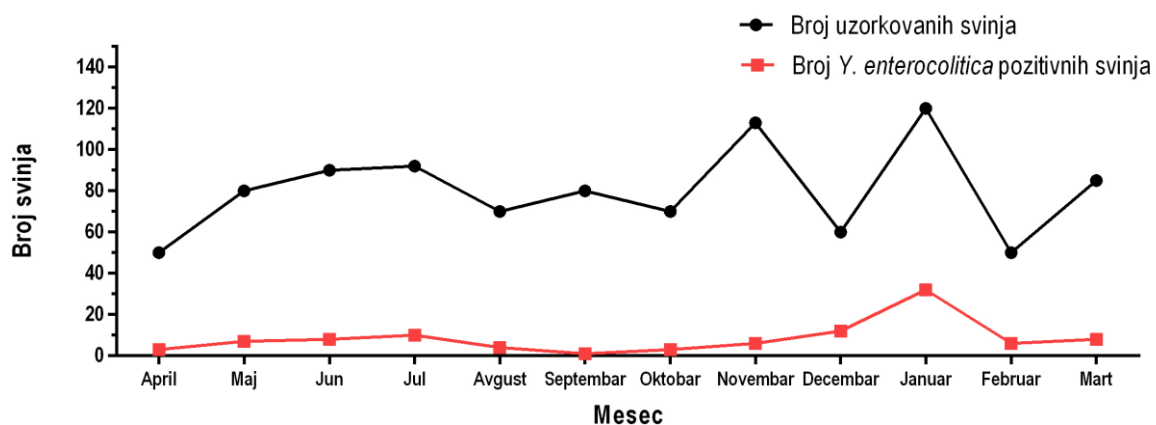
*Tip I - od prasilišta do tovilišta

Tip II - farma za tov svinja

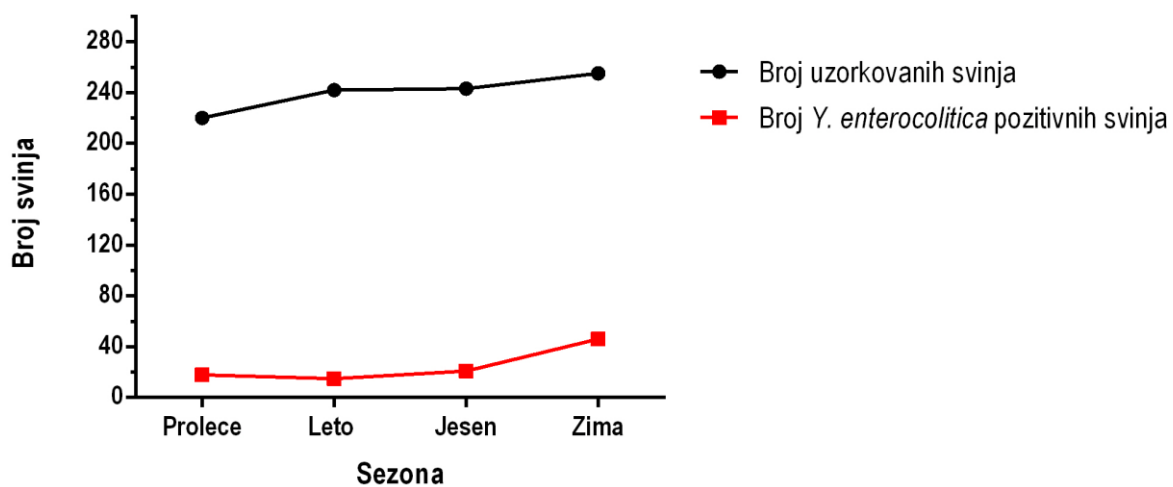
Uzorkovanje je sprovedeno tokom 12 meseci i obuhvaćene su sve sezone. Broj uzorkovanih i pozitivnih serija uzorkovanja, broj ispitanih i pozitivnih uzorka tonzila sa prevalencijom na *Y. enterocolitica* po mesecima prikazana je u tabeli 5.14. Broj uzorkovanih i broj pozitivnih svinja na *Y. enterocolitica* tokom 12 meseci i sezonama prikazan je sukcesivno na grafikonu 5.1 i 5.2. Istraživanje preseka infekcije *Y. enterocolitica* sprovedeno je na 960 svinja, uzorkovanih iz 30 serija, poreklom sa 14 farmi Tip I i 16 farmi Tip II. Veličina serije se kretala od 11 do 158 svinja, a broj uzorkovanih svinja je varirao od 10 do 60 po seriji. Posmatrajući seriju kao celu jedinicu uzorkovanja, prevalencija pozitivnih svinja unutar serije za farme Tip I kretala se od 2,5 do 20% (Grafikon 5.3a), dok je za farme Tip II od 2,5 do 60% (Grafikon 5.3b). Ukupno je 83,3% serija bilo pozitivno na *Y. enterocolitica*.

Tabela 5.14. Broj uzorkovanih/pozitivnih serija uzorkovanja, broj ispitanih i pozitivnih uzorka na *Y. enterocolitica* tokom 12 meseci

Mesec	Broj uzorkovanih serija	Broj pozitivnih serija	Broj uzorkovanih svinja	Broj pozitivnih svinja	Prevalencija (%)
April	3	2	50	3	6,00
Maj	3	2	80	7	8,75
Jun	2	2	90	8	8,89
Jul	3	3	92	10	10,87
Avgust	2	2	70	4	5,71
Septembar	2	1	80	1	1,25
Oktobar	2	1	70	3	4,29
Novembar	3	2	113	6	5,31
Decembar	2	2	60	12	20,00
Januar	3	3	120	32	26,67
Februar	2	2	50	6	12,00
Mart	3	3	85	8	9,41
Ukupno	30	25	960	100	10,42

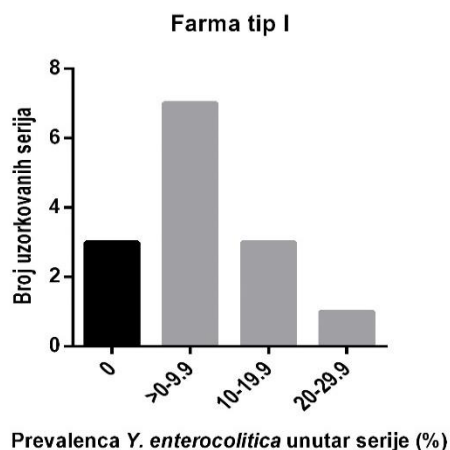


Grafikon 5.1.
Broj uzorkovanih i broj pozitivnih svinja
na *Y. enterocolitica* tokom 12 meseci

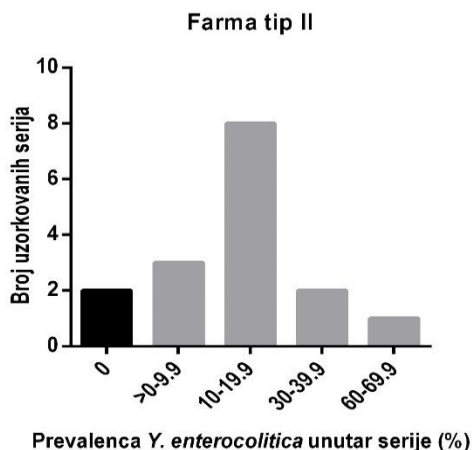


Grafikon 5.2.
Broj uzorkovanih svinja i broj pozitivnih svinja
na *Y. enterocolitica* po sezonama

a)



b)

**Grafikon 5.3.**

Distribucija prevalencije *Y. enterocolitica*
unutar serija svinja poreklom od: farme Tip I (a) i farme Tip II (b)

5.3. Rezultati fenotipizacije (bioserotipizacije) izolata *Y. enterocolitica*

Od uzorkovanih 960 svinja ukupno je 100 svinja bilo pozitivno na prisustvo *Y. enterocolitica*. Kao najčešći bioserotip utvrđen je BT4/O:3 koji ima udeo od 79 % u odnosu na broj pozitivnih uzoraka. Kod 5 % uzoraka, izolovani su saharoza negativni izolati BT4/O:3 koji su označeni kao BT4 S-/O:3. Pored ovih, udeo preostalih izolovanih bioserotipova bio je sledeći: BT2/O:5,27 (3%); BT3/O:3 (5%); BT1B (1%); kao i nepatogeni soj BT1A (7%).

Rezultati distribucije *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja u odnosu na utvrđeni bioserotip po ispitivanim karakteristikama prikazani su u tabeli 5.15. Iz priložene tabele možemo videti da je na klanici B kao i u regionima I i V kod svih pozitivnih svinja (100%) izolovana je *Y. enterocolitica* BT4/O:3, dok je najmanji procenat svinja koje su inficirane sa *Y. enterocolitica* BT4/O:3 bio na klanici A (56,8%), gde su u začajnom procentu izolovani i drugi bioserotipovi.

Tabela 5.15. Distribucija *Y. enterocolitica* u tonzilama svinja
u odnosu na utvrđeni bioserotip po ispitivanim karakteristikama

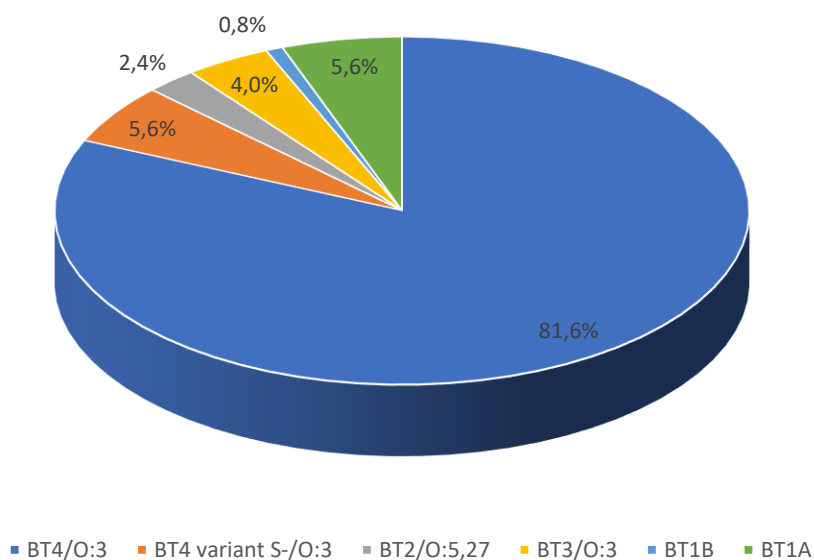
	BT4/O:3 (%)	BT4 S- /O:3 (%)	BT2/O:5,27 (%)	BT3/O:3 (%)	BT1B (%)	1A (%)	Ukupno
Farma							
Tip I	23 (71,9%)	0 (0%)	3 (9,4%)	1 (3,1%)	0 (0%)	5 (15,6%)	32
Tip II	56 (82,4%)	5 (7,4%)	0 (0%)	4 (5,9%)	1 (1,5%)	2 (2,9%)	68
Veličina farme							
<150	25 (86,2%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (10,3%)	0 (0%)	1 (3,4%)	29
150-500	25 (75,8%)	5 (15,2%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)	33
>500	29 (76,3%)	0 (0%)	3 (7,9%)	1 (2,6%)	0 (0%)	5 (13,2%)	38
Klanica							
C	33 (94,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (5,7%)	35
A	25 (56,8%)	5 (11,4%)	3 (6,8%)	5 (11,4%)	1 (2,3%)	5 (11,4%)	44
B	21 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	21
Depo							
0-3h	25 (75,8%)	5 (15,2%)	3 (9,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	33
3-6h	54 (84,6%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (7,5%)	1 (1,5%)	7 (10,4%)	67
Region							
III	6 (66,7%)	0 (0%)	3 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	9
II	22 (61,1%)	5 (13,9%)	0 (0%)	4 (11,1%)	1 (2,8%)	4 (11,1%)	36
I	30 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	30
V	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10
IV	11 (73,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,7%)	0 (0%)	3 (20%)	15
Sezona							
Leto	10 (66,7%)	5 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	15
Jesen	18 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	21
Zima	38 (82,6%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (8,7%)	0 (0%)	4 (8,7%)	46
Proleće	13 (72,2%)	0 (0%)	3 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (11,1%)	18
Ukupno	79 (79%)	5 (5%)	3 (3%)	5 (5%)	1 (1%)	7 (7%)	100

5.4. Distribucija izolata *Y. enterocolitica* u odnosu na bioserotip

U sprovedenom ispitivanju, od 100 pozitivnih svinja, izolovano je ukupno 125 izolata *Y. enterocolitica* (iz pojedinih uzoraka ispitano je više sumnjivih kolonija). Bioserotipizacijom je utvrđeno šest različitih bioserotipova koji su izloveni iz tonzila zaklanih svinja. Podaci o broju i procentualnoj zastupljenosti izolovanih bioserotipova prikazani su u tabeli 5.16 i grafikonu 5.4.

Tabela 5.16 Incidencija bioserotipova *Y. enterocolitica* izolovanih iz tonzila svinja

Bioserotip	Broj izolata	%
BT4/O:3	102	81,6
BT4 S-/O:3	7	5,6
BT2/O:5,27	3	2,4
BT3/O:3	5	4
BT1B	1	0,8
BT1A	7	5,6
Ukupno	125	100



Grafikon 5.4.
Procentualna zastupljenost bioserotipova
Y. enterocolitica izolovanih iz tonzila svinja

Rezultati bioserotipizacije izolata *Y. enterocolitica* ukazuju da je iz uzoraka tonzila svinja najčešće izolovan bioserotip BT4/O:3 (81,6%). Takođe utvrđeni su i saharoza negativni izolati BT4 S-/O:3 u 5,6% slučajeva, izolovani iz uzoraka tonzila svinja poreklom samo sa jedne farme. Ista situacija je konstatovana i u slučaju nalaza BT2/O:5,27, odnosno BT1B, koji su izolovani iz tonzila svinja koje su poticale samo sa jedne farme. Kada je u pitanju BT3/O:3, ovaj bioserotip utvrđen je kod svinja koje su poticale sa tri različite farme, odnosno BT1A, koji je izolovan iz tonzila svinja koje su poticale sa 5 različitih farmi.

5.5. Rezultati ispitivanja gena virulencije *Y. enterocolitica*

Ispitivanje na prisustvo gena virulencije (*ail*, *ystA*, *ystB*), urađeno je sa 58 izolata *Y. enterocolitica* BT4/O:3, zatim pet izolata BT4 S-/O:3 i tri izolata BT1A. Izolati su odabrani tako da obuhvataju sve farme sa kojih potiču inficirane životinje. Rezultati ispitivanja gena virulencije prikazani su u tabeli 5.17.

Tabela 5.17. Rezultati ispitivanja gena virulencije odabranih bioserotipova *Y. enterocolitica*

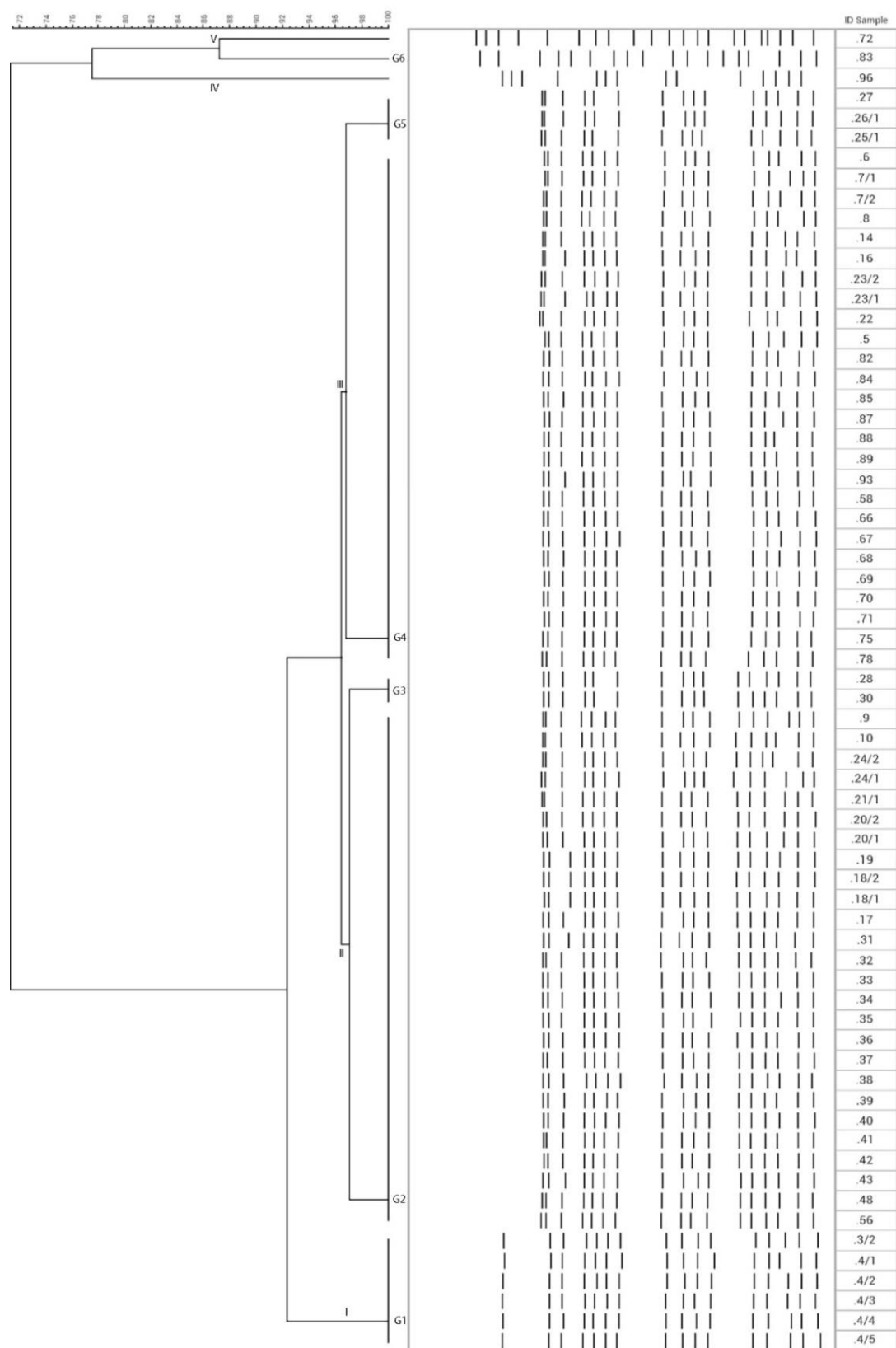
Bioserotip	Broj ispitanih izolata	Geni virulencije		
		<i>ail</i>	<i>ystA</i>	<i>ystB</i>
BT4/O:3	58	+	+	-
BT4 S-/O:3	5	+	+	-
BT1A	3	-	-	+

Svih 58 ispitivanih izolata *Y. enterocolitica* BT4/O:3 i pet izolata BT4 S-/O:3 sadržalo je *ail* i *ystA* gen dok su bili negativni na prisustvo *ystB* gena. Sva tri ispitana izolata BT1A sadržalo je *ystB* gen dok su bili negativni na prisustvo *ail* i *ystA* gena.

5.6. Rezultati genotipizacije izolata *Y. enterocolitica* izolovanih iz tonzila svinja

Rezultati PFGE analize prikazani su na slici 5.1. Koristeći PFGE, pomoću *NotI* enzima, izvršena je genotipizacija 63 izolata *Y. enterocolitica* BT4/O:3 (uključujući i pet izolata BT4 S-/O:3), kao i tri izolata BT1A (slika 5.1). Analizirajući podatke PFGE profila, kod 63 izolata *Y. enterocolitica* BT4/O:3 (koji uključuju i pet izolata BT4 S-/O:3) utvrđeno je pet različitih genotipova (G1-G5), sa zajedničkim identičnim genetskim profilima (100% sličnosti) unutar svakog genotipa. Prikazani sojevi su grupisani u tri klastera sa sličnošću od 92%. Izolati iz klastera I pripadali su svinjama koje potiču sa farmi Tip I, dok sojevi klastera II i III potiču sa oba tipa farmi. Sa druge strane kod tri ispitana soja BT1A uočen je samo jedan genotip (G6), podeljen na klastere IV i V koji su imali različit genetski profil. Izolati iz klastera V potiču sa farmi Tip I, dok jedan izolat koji pripada klasteru IV potiče sa farme Tip II.

Najčešći genotip je G2, izolovan iz uzoraka tonzila od 22 svinje (26 izolata), koje su poticale sa 12 različitih farmi, uzorkovane u sve tri klanice. Genotip G3 izolovan je iz tonzila svinja od 23 svinje (26 izolata), poreklom sa osam različitih farmi, uzorkovane u sve tri klanice. Genotip G1 izolovan je iz dva uzorka (6 izolata), a poreklo životinja je bilo samo sa jedne farme, uzorkovane samo na jednoj klanici. Kao i u prethodnom slučaju, genotip G4 je izolovan iz tri uzorka, a genotip G5 iz dva uzorka, a životinje poreklom samo sa jedne farme, uzorkovane na jednoj klanici. Izolati *Y. enterocolitica* BT4 S-/O:3 pripadali su genotipovima G4 i G5 i poreklom su sa jedne farme.



Slika 5.1.

PFGE obrasci i glavne grupacije dobijene nakon digestije *NotI* restrikcionim enzimom 63 izolata *Y. enterocolitica* BT4/O:3 i BT4 S-/O:3, kao i 3 izolata BT1A izolovanih iz tonzila svinja

5.7. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih bioserotipova *Y. enterocolitica* na antimikrobne agense disk-difuzionom metodom

Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 125 izolata *Y. enterocolitica*, od toga 102 izolata BT4/O:3, sedam izolata BT4 S-/O:3, sedam izolata BT1A, pet izolata BT3:O3, tri izolata BT2 O:5,27 i jedan izolat BT1B.

Svi bioserotipizovani i genotipizovani izolati *Y. enterocolitica* ispitani su na osetljivost na antimikrobne agense, a obrasci njihove rezistencije prikazani su u tabeli 5.18. Svih 125 izolata je bilo osetljivo na cefotaksim, ceftazidim, meropenem, gentamicin, trimetoprim i sulfonamid. Svi izolati su bili rezistentni na ampicilin.

Posmatrajući bioserotip BT4/O:3, može se videti da izolati iz klastera II i III pokazuju obrasce rezistencije na više lekova. 86 izolata BT4/O:3 je bilo rezistentno samo na ampicilin, dok je 9 izolata pokazalo zajednički obrazac rezistencije za ampicilin i nalidiksinsku kiselinu, a sedam izolata je imalo zajednički obrazac rezistencije za ampicilin, hloramfenikol, tetracikline i nalidiksinsku kiselinu. Posmatrajući bioserotip BT4 S-/O:3 može se videti da je sedam izolata pokazalo obrasce rezistencije na ampicilin i nalidiksinsku kiselinu. Jedan izolat BT1A koji potiče sa farme Tip II bio je otporan na ampicilin i cefoksitin.

Tabela 5.18. *Y. enterocolitica* (bioserotip i genotip) i rezistentnost na antimikrobne agense

Rezistencija	Bioserotip						Ukupno (%)	Genotip						Ukupno (%)
	4/O:3	4 S-/O:3	2/O:5,27	3/O:3	1B	1A		G1	G2	G3	G4	G5	G6	
Amp	86	-	3	5	1	6	101 (80,8)	6	22	-	24	-	2	54 (81,8)
AmpNa	9	7	-	-	-	-	16 (12,8)	-	-	2	1	3	-	6 (9,1)
AmpFox	-	-	-	-	-	1	1 (0,8)	-	-	-	-	-	1	1 (1,5)
AmpCTeNa	7	-	-	-	-	-	7 (5,6)	-	4	-	1	-	-	5 (7,6)
Ukupno	102	7	3	5	1	7	125 (100)	6	26	2	26	3	3	66 (100)

* Amp: ampicilin, Na: nalidiksinska kiselina, Fox: cefoxitin, C: chloramfenikol, Te: tetraciklini.

U tabeli 5.19 prikazani su rezultati osetljivosti na antimikrobne agense *Y. enterocolitica* u odnosu na ispitivane karakteristike a uključuju tip i veličinu farme, klanicu, dužinu boravka u depou, region i sezonu. Analizirajući rezultate iz priložene tabele može se zaključiti da su svi izolati poreklom od svinja sa farmi Tip I bili rezistentni samo na ampicilin, dok se poreklom sa farmi Tip II uočavaju obrasce rezistencije na više antibiotika. Takođe, izolati poreklom od svinja koje potiču sa farmi velikog kapaciteta (>500), bili su rezistentni samo na ampicilin za razliku od izolata jerisnija poreklom od svinja sa malih i srednjih farmi. Daljom analizom uočava se da su izolati od svinja poreklom iz regiona I i V bili rezistentni samo na ampicilin, za razliku od izolata poreklom od svinja iz drugih regiona koji su pokazivali obrasce rezistencije na više različitih antimikrobnih agenasa.

Tabela 5.19. Rezistentnost *Y. enterocolitica* na antimikrobne agense
prema ispitivanim karakteristikama

	Amp	AmpNa	AmpFox	AmpCTeNa	Ukupno
Farma					
Tip I	32 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	32
Tip II	47 (69,1%)	14 (20,6%)	1 (1,5%)	6 (8,8%)	68
Veličina farme					
<150	19 (65,5%)	5 (17,2%)	1 (3,4%)	4 (13,8%)	29
150-500	22 (66,7%)	9 (27,3%)	0 (0%)	2 (6,1%)	33
>500	38 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	38
Klanica					
C	27 (77,1%)	4 (11,4%)	0 (0%)	4 (11,4%)	35
A	32 (72,7%)	9 (20,5%)	1 (2,3%)	2 (4,5%)	44
B	20 (95,2%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0 (0%)	21
Depo					
0-3h	27 (81,8%)	6 (18,2%)	0 (0%)	0 (0%)	33
3-6h	52 (77,6%)	8 (11,9%)	1 (1,5%)	6 (9%)	67
Region					
III	5 (55,6%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (44,4%)	9
II	23 (63,9%)	10 (27,9%)	1 (2,8%)	2 (5,6%)	36
I	30 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	30
V	6 (60%)	4 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	10
IV	15 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	15
Sezona					
Leto	6 (40%)	9 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	15
Jesen	15 (71,4%)	4 (19%)	0 (0%)	2 (9,5%)	21
Zima	44 (95,7%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)	0 (0%)	46
Proleće	14 (77,8%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (22,2%)	18
Ukupno	79 (79%)	14 (14%)	1 (1%)	6 (6%)	100

*Amp: ampicilin, Na: nalidiksinska kiselina, Fox: cefoxitin, C: chloramfenikol, Te: tetraciklin.

5.8. Analiza faktora rizika

Ispitane karakteristike modelom univarijantne logističke regresije koje se odnose na fazu pre i za vreme klanja prikazane su u tabeli 5.20. Utvrđeno je da su tip farme, kapacitet klanice, dužina boravka u stočnom depou, region i sezona povezani sa pojavom i distribucijom infekcije *Y. enterocolitica*. Ovi pomenuti faktori rizika su istovremeno uključeni u model multivarijantne analize da bi se utvrdio njihov relativni doprinos u vezi sa prevalencijom *Y. enterocolitica* uzimajući u obzir prilagođavanje njihovih efekata (Tabela 5.21). Uočen je dvostruko povećan rizik od infekcije kod svinja koje potiču sa farmi Tip II (farme za tov svinja) u poređenju sa farmama Tip I (farme zatvorenog tipa, od prašenja do kraja tova) ($p < 0,001$). Povećani rizik od infekcije postoji i za produženo vreme boravka u depou klanice u odnosu na kraće vreme zadržavanja na nivou klanice ($p < 0,035$). Što se tiče sezona, utvrđena je skoro četvorostruka verovatnoća infekcije svinja tokom zimske sezone u poređenju sa drugim godišnjim dobima ($p < 0,001$).

Tabela 5.20. Infekcija *Y. enterocolitica* prema ispitivanim karakteristikama u sistemu proizvodnje svinja u Srbiji - model univarijantne logističke regresije

Faktor	n	Prevalenca (%)	95% IP	OR	95% IP	P-vrednost
Farma						
Tip I	425	7,5	5,0-10,0	1,00		0,01
Tip II	535	12,7	9,9-15,5	1,79	1,15-2,78	
Veličina farme						
>500	395	9,6	6,7-12,5	1,00		0,765
<150	255	11,4	7,5-15,2	1,21	0,72-2,01	
150-500	310	10,6	7,2-14,1	1,12	0,68-1,83	
Biosigurnosne mere						
Ne	425	12,2	9,1-15,3	1,00		0,101
Da	535	9,0	6,5-11,4	0,71	0,47-1,07	
Kontrola glodara						
Ne	273	12,1	8,2-15,9	1,00		0,286
Da	687	9,8	7,5-12,0	0,79	0,51-1,22	
Vodosnadbjevanje						
Vodovodni sistem	240	10,1	6,2-13,8	1,00		0,626
Bunari	720	11,3	8,9-13,6	1,12	0,70-1,79	
Kontrola vode						
Ne	333	11,7	8,3-15,2	1,00		0,339
Da	627	9,7	7,4-12,0	0,81	0,53-1,24	
Dužina transporta						
<4h	272	9,2	5,8-12,6	1,00		0,435
>4h	688	10,9	8,6-13,2	1,21	0,75-1,95	
Transportno vozilo						
Spratni tip	283	8,8	5,5-12,1	1,00		0,300
Jedan nivo	677	11,1	8,7-13,4	1,29	0,80-2,07	
Tip klanice						
C	395	8,9	6,1-11,7	1,00		0,042
A	440	10,0	7,2-12,8	1,14	0,72-1,82	
B	125	16,8	10,2-23,3	2,08	1,16-3,72	
Boravak u depou						
0-3h	468	7,1	4,7-9,4	1,00		0,001
3-6h	492	13,6	10,6-16,7	2,08	1,34-3,22	
Region						
III	150	6,0	2,2-9,8	1,00		0,001
II	378	9,5	6,6-12,5	1,65	0,77-3,51	
I	160	18,8	12,7-24,8	3,62	1,65-7,90	
V	162	6,2	2,5-9,9	1,03	0,41-2,61	
IV	110	13,6	7,2-20,0	2,47	1,04-5,88	
Sezona						
Leto	242	6,2	3,2-9,2	1,00		0,001
Jesen	243	8,6	5,1-12,2	1,43	0,72-2,85	
Zima	255	18,0	13,3-22,8	3,33	1,81-6,14	
Proleće	220	8,2	4,6-11,8	1,35	0,66-2,74	
Ukupno	960	10,4	8,5-12,3			

*IP - interval poverenja, OR - *odds ratio*

Tabela 5.21. Faktori rizika za prisustvo *Y. enterocolitica* infekcije kod svinja u Srbiji - model multivarijantne analize

Faktor	Korigovani OR	95% IP	P-vrednost
Farma			
Tip I	1,00		
Tip II	2,31	1,41-3,79	0,001
Boravak u depou			
0-3h	1,00		
3-6h	1,63	1,04-2,58	0,035
Sezona			
Leto	1,00		
Jesen	1,33	0,66-2,67	0,424
Zima	3,85	2,01-7,36	0,001
Proleće	1,86	0,86-4,03	0,114

*IP - interval poverenja,
OR - *odds ratio*

6. DISKUSIJA

Ova studija je prvo celogodišnje istraživanje patogenih bioserotipova *Y. enterocolitica* kod svinja na liniji klanja u Srbiji. Sprovedena je na uzorcima svinja poreklom sa geografskih područja na kojima se prema podacima Republičkog zavoda za statistiku gaji ukupno 1.865.244 svinja u 2017. godini (RZS 2018) što čini 64% celokupne proizvodnje svinja u Srbiji. Studija uključuje uzorke od 960 svinja uzorkovanih u 30 serija na tri klanice. Dobijeni rezultati su ujedno i prvi dostupni podaci iz epidemiološke studije o *Y. enterocolitica* izolovane od svinja na liniji klanja u Srbiji.

Prosečna starost svinja obuhvaćenih istraživanjem bila je između 6 i 6,5 meseci što odgovara periodu kada se najveća prevalencija *Y. enterocolitica* može naći u tonzilama svinja prilikom klanja (Rahikainen i sar., 2016; Bucher i sar., 2008). Fokus istraživanja bio je prvenstveno na bioserotipovima koji su patogeni za ljude. Dizajnirana je robusna šema uzorkovanja, a precizan broj svinja za uzorkovanje po seriji bio je zasnovan na očekivanoj prevalenciji od 50%, sa intervalom poverenja od 95% i prihvaćenom greškom od 10%.

Srbija je realtivno mala država koja se nalazi u jugoistočnoj Evropi, sa dugom tradicijom u proizvodnji mesa i proizvoda od mesa (Karabasil i sar., 2018). Najviše se konzumira i proizvodi meso svinja, a zatim živine i goveda (RZS, 2018). U Srbiji je u 2017. godini gajeno ukupno 2.911.000, od toga 2.079.000 je zaklano na klanicama u Srbiji, a prosečna masa zaklanih svinja iznosila je 99 kg. Ukupna proizvodnja mesa svinja u našoj zemlji za 2017. godinu iznosila je 307.000 tona (RZS, 2018).

Prema podacima Privredne komore Srbije, domaći potrošač u proseku godišnje konzumira 14,5 kg mesa svinja (PKS, 2017). Imajući u vidu činjenicu da je meso svinja najzastupljenije u Srbiji, a s obzirom na nepostojanje podataka u vezi nalaza *Y. enterocolitica* kod svinja/mesu svinja u Srbiji, neophodno je bilo utvrditi nalaz i prevalenciju, a zatim i izvršiti karakterizaciju izolata u odnosu na bioserotip, prisustvo gena virulencije, genetsku različitost i osetljivost na antimikrobne agense, kao potencijalnog rizika za bezbednost hrane, te proceniti i faktore rizika koji utiču na povećanje prevalencije ovog mikroorganizma.

U sprovedenom istraživanju, ukupna prevalencija *Y. enterocolitica* kod svinja iznosila je 10,4%, što je manje nego u drugim studijama sprovedenim u zemljama Evropske unije: 13,7% u Francuskoj (Fondrevez i sar., 2014), 15% na Sardiniji (Fois i sar., 2018), 17,7% (Bonardi i sar., 2013) do 27,4% u Italiji (Bonardi i sar., 2016) i 25,1% u Belgiji (Van Damme i sar., 2015). Na nivo varijacije u stepenu infekcije u prijavljenim studijama mogu u velikoj meri uticati različiti menadžment sistemi na farmama, nivo biosigurnosti, higijenska praksa u svim fazama proizvodnje, metodologija uzorkovanja, kao i metode izolacije i identifikacije ispitivanog

patogenog mikroorganizma (Zdolec i Kiš, 2021). Uzimajući u obzir poreklo životinja i farme za tov svinja, koje su predložene kao epidemiološki indikator (EFSA, 2011), kod farmi označenih kao Tip II (otvoreni tip farmi) prevalencija jersinija je bila 12,7%, u odnosu na farme zatvorenog tipa Tip I (koje same proizvode prasad za tov) na kojima je prevalencija bila niža i iznosila je 7,5 %. Pored *Y. enterocolitica*, izolovana je i *Y. frederiksenii* u 0,2% slučajeva. Lucero-Estrada i sar., (2020) opisuju čestu izolaciju drugih vrsta *Yersinia* spp. kao što su *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* i *Y. kristensenii* u uzorcima poreklom od životinja i hrane. Nalazi *Y. frederiksenii* u našoj studiji, kao i različitih bioserotipova *Y. enterocolitica*, jasno ukazuju da se kod svinja javljaju i druge vrste jersinija, kao i različiti bioserotipovi, pa je neophodno sprovesti potpuna ispitivanja kako bi se precizno identifikovali izolati i utvrdila njihova patogenost.

Druga značajna patogena vrsta iz roda *Yersinia* spp. koja može izazvati oboljenje ljudi jeste *Y. pseudotuberculosis*. Na Novom Zelandu 2014 godine prijavljena je velika epidemija prouzorkovana sa *Y. pseudotuberculosis* gde je bilo 220 laboratorijski potvrđenih slučajeva (Williamson i sar., 2016). U toku ove studije nije utvrđena patogena *Y. pseudotuberculosis* za razliku od studije koja je sprovedena u Švajcarskoj gde je kod divljih svinja utvrđeno 35% *Y. enterocolitica* i 20% *Y. pseudotuberculosis* (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2009) dok je u drugoj studiji kod domaćih svinja u Engleskoj *Y. pseudotuberculosis* otkrivena kod 18% domaćih tovnih svinja (Ortiz Martínez i sar., 2010). Potencijalni nalaz *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* kod divljih svinja u Srbiji može biti predmet nekih daljih istraživanja.

Od ukupno 100 pozitivnih svinja, bioserotipizacija je urađena na 125 izolata *Y. enterocolitica*. Najčešće izolovani bioserotip bio je BT4/O:3, koji je imao udeo od 81,6% (odnosno 102 izolata od 79 svinja). Činjenica da su sve pozitivne svinje na klanici B kao i pozitivne svinje poreklom iz regiona I i IV bile inficirane isključivo biotipom BT4/O:3 ukazuje na tvrdnju da je ovaj biotip najučestaliji nalaz kod svinja što je potvrđeno i u drugoj studiji gde je BT4/O:3 takođe određen kao dominantan bioserotip koji čini 70,2% od ukupnog broja izolovanih *Y. enterocolitica* na Sardiniji (Fois i sar., 2018). Naši nalazi su u saglasnosti sa izveštajem Evropske agencije za bezbednost hrane koja navodi da je BT4/O:3 i najčešće prijavljen kao uzročnik oboljenja kod ljudi (EFSA i ECDC, 2018).

Od ukupnog broja izolovanih *Y. enterocolitica*, 5,6% je bilo saharoza negativno (BT4 S-/O:3), ukupno 7 izolata je izolovano od 5 svinja poreklom sa jedne farme Tip II, što je manje nego u drugoj studiji u kojoj je izolovano 25,6% saharoza negativnih *Y. enterocolitica* BT4/O:3 (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2002). Nalaz saharoza negativnih izolata samo na jednoj farmi u jednom regionu ukazuju na usko ograničenu prostornu cirkulaciju ovih biotipova što je dobro sa aspekta kontrole ovog patogenog soja. Fermentacija saharoze je biohemijski test koji se koristi za razlikovanje patogenih od nepatogenih biotipova *Y. enterocolitica*. Kompletno biohemijsko ispitivanje je neophodno kako bi se razlikovale nepatogene vrste *Yersinia* kao što je *Y. kristensenii* koja daje negativnu reakciju fermentacije saharoze. Razliku je moguće napraviti na osnovu Voges Proskauer reakcije koja je pozitivna i testa Pirazinamidaze koja je negativna kod patogenih biotipova *Y. enterocolitica*. Ranije se smatralo da saharoza negativni izolati *Y. enterocolitica* BT4/O:3 nisu patogeni zbog nedostatka jasnih dokaza u izazivanju oboljenja kod ljudi, zbog čega su i ovi izolati ispitani na prisustvo gena virulencije i genotipizacije. Samim tim, nalaz gena virulencije *ail* i *ystA* ne isključuje potencijalnu patogenost ovih izolata pa je precizna identifikacija neophodna prilikom dokazivanja patogenosti i procene rizika po zdravlje ljudi od *Y. enterocolitica* BT4 S-/O:3 što je u saglasnosti sa tvrdnjama Fredriksson-Ahomaa i sar., (2002).

Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA i ECDC, 2018) navodi da su pored *Y. enterocolitica* BT4/O:3 i bioserotipovi BT2/O:9 i BT2/O:5,27 takođe često prijavljeni kao uzročnici bolesti kod ljudi. U našoj studiji BT2/O:5,27 činili su 2,4 % izolata *Y. enterocolitica*, što je manje nego u poređenju sa podacima iz drugih studija. Prevalencija ovog bioserotipa bila je 26% u Engleskoj (Martínez i sar., 2010) i 14,9% na Sardiniji (Fois i sar., 2018). Bioserotip BT3/O:3 u našoj studiji, činio je 4%. Prema istraživanjima McNally i sar. (2004) pored bioserotipa BT4/O:3, u uzorcima poreklom od svinja, često se mogu naći i drugi bioserotipovi kao što su BT2/O:9 i BT2/O:5,27. Biotip 1B utvrđen je u uzorku tonzila poreklom od jedne životinje, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Savin i sar., 2018). U 2017. godini opisan je jedan slučaj infekcije kod pacijenata sa *Y. enterocolitica* BT1B, a budući da ovaj biotip ima potencijal za sistemsko širenje, može predstavljati ozbiljnu pretnju po javno zdravlje (Savin i sar., 2018). Biotip 1A, opisan je kao apatogen i imao je udeo od 5,6% od ukupnog broja izolata. Uvidom u rezultate Foisa i sar. (2018), autori navode da su izolovali ovaj biotip samo u uzorcima poreklom od prasadi, ali ne i iz uzoraka poreklom od tovnih svinja na liniji klanja.

Patogenost *Y. enterocolitica* povezana je sa prisustvom plazmida virulencije *pYV*, prisustvom gena povezanih sa invazijskim hromozomima kao što su *ail* i *inv* i prisustvom *ystA* gena odgovornog za proizvodnju enterotoksina (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2000a). Određivanje patogenosti na osnovu plazmidnih markera je nepouzdana dijagnostička metoda koja često dovodi do lažno negativnih rezultata usled gubitka plazmida virulencije *pYV* tokom dugotrajnog skladištenja i čestih pasaža izolata (Bancerz-Kisiel i sar., 2018). Zbog toga su u sklopu naših istaživanja, za procenu virulentnosti, određivani *ail*, *ystA*, i *ystB* gen.

Ispitivanjem gena virulencije u izolatima *Y. enterocolitica* BT4/O:3 uključujući i izolate *Y. enterocolitica* BT4 S-/O:3, utvrđeno je da 100% izolata nose *ail* i *ystA* gen, ali ni jedan od ovih izolata nije sadržao *ystB* gen. Naši rezultati su u saglasnosti sa drugim autorima, koji su utvrdili da je *ail* gen prisutan u svim ispitanim BT4/O:3 izolatima (Schneeberger i sar., 2015). Prema rezultatima Foisa i sar. (2018) *ail* negativni izolati BT4/O:3 utvrđeni u 15% slučajeva. *Y. enterocolitica* BT1A ne sadrži *pYV* plazmid niti gene povezane sa virulencijom, tako da se ne smatraju patogenim za čoveka (Singh i Viridi, 2004). U našoj studiji izolati BT1A nisu sadržali gene *ail* ili *ystA*, ali su sadržali *ystB* gen koji kodira proizvodnju biološki aktivnog enterotoksina *ystB*. Ovaj nalaz je u skladu sa drugim studijama (Fois i sar., 2018; Peruzy i sar., 2017).

Y. enterocolitica BT1A često je izolovana kod pacijenata u Finskoj koji su imali dugotrajne probleme sa povraćanjem. Pokazalo se da je infekcija sa BT1A uporna i dugotrajna pošto je izolovana u intervalima od 20 dana. Kao značajni faktori rizika za pojavu infekcija sa BT1A procenjeni su uveženo voće i bobice, kao i jela u restoranima i kafeterijama za razliku od infekcija sa BT4/O:3 gde su glavni rizični faktori nedovoljno termički obrađeno ili sirovo meso svinja (Leila, 2014). Ovo govori u prilog činjenici da se patogenost *Y. enterocolitica* BT1A ne može u potpunosti isključiti zbog produkcije biološki aktivnog enterotoksina *ystB* koji izaziva povraćanje, a čiju proizvodnju kodira *ystB* gen čije smo prisustvo utvrdili kod ovih izolata. Zbog svega ovoga predloženo je da se sojevi *Y. enterocolitica* BT1A definišu kao oportunistički patogeni sojevi koji izazivaju infekcije onda kada je oslabljen imunitet domaćina (Batzilla i sar. 2011).

Karakterizacija sojeva *Y. enterocolitica* BT4/O:3 urađena je uz pomoć PFGE analize koja je pokazala nizak stepen genetske raznovrsnosti među *Y. enterocolitica* BT4/O:3 izolatima, klasifikovanih u 3 klastera sa 5 povezanih genotipova. Izuzimajući klaster I preostala 4 genotipa potiču sa oba tipa farmi i sa sve tri različite klanice, što ukazuje na visoku genetsku stabilnost i prostornu cirkulaciju patogenog mikroorganizma. Utvrđeno je da je moguće na jednoj

farmi naći više različitih genotipova, kao i da postoje slučajevi gde je jedan genotip specifičan samo za jednu farmu. Dva dominantna genotipa G2 i G3 pronađeni su kod velikog broja svinja sa različitih farmi, što ukazuje da su široko rasprostranjeni i nisu ograničeni na određenu farmu. Iste rezultate dobili su i drugi autori koji su otkrili dva dominantna genotipa na više različitih farmi (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2007). Razlog ovako velike rasprostranjenosti genotipova G2 i G3 je verovatno isto ili ograničeno poreklo genetskog materijala, ili isto poreklo prasadi za tov s obzirom da većina farmi kupuje prasad za tov koju kasnije isporučuju klanicama. Utvrdili smo da je genotip G1 bio specifičan samo za jednu farmu i izolovan je samo u jednoj seriji uzorkovanja, dok su G4 i G5 pronađeni zajedno samo na jednoj farmi u jednoj seriji uzorkovanja. Naši rezultati slični su rezultatima drugih autora koji su takođe utvrdili da je moguće jedan genotip pronaći na više različitih farmi, kao i da postoje genotipovi koji su specifični samo za jednu farmu (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2010).

Istraživanjem koje su sprovedi Fredriksson-Ahomaa i sar. (2001a) utvrđeno je postojanje istih genotipova u uzorcima inficiranih ljudi i u uzorcima poreklom od svinja, što govori u prilog tvrdnji da je meso svinja najčešći vektor infekcije ljudi. Naši rezultati su bili slični onima dobijenim u Švajcarskoj (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2007), koji su identifikovali 6 genotipova *Y. enterocolitica* BT4/O:3 iz ispitanih 69 uzoraka tonzila svinja. Prema istraživanjima u Nemačkoj, utvrđeno je 18 genotipova poreklom iz uzoraka tonzila (54), a u Finskoj 22 genotipa poreklom iz 74 ispitana uzorka tonzila svinja (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2003a). Izolati *Y. enterocolitica* BT4 S-/O:3 pripadaju genotipovima G4 i G5 i poreklom su od svinja sa iste farme. *NotI* PFGE obrasci izolata BT4 S-/O:3 pokazali su veliku međusobnu sličnost. Razlika u odnosu na saharoza pozitivne izolate BT4/O:3 bila je u jednom obrascu/bendu pa prema Tenover i sar. (1995) nema značajne klonske razlike. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se ustanovile genetske veze između sojeva *Y. enterocolitica* poreklom od ljudi odnosno svinja, kako bi se jasno definisale svinje kao rezervoari jersinioze ljudi. Pretpostavlja se da neki sojevi mogu biti genetski vrlo srodni (ista genetska loza), ali da razlika može ipak postojati, kao posledica određenih funkcionalnih promena u genomu (Tenover i sar., 1995).

Upotreba antibiotika kao promotera rasta devedesetih godina prošloga veka, doprinela je razvoju rezistencije prema antimikrobnim lekovima. Danska je prva zemlja koja je 1995. godine zabranila upotrebu antibiotika kao promotera rasta dok je Evropska unija tek 2006. godine konačno zabranila upotrebu svih antibiotika kao promotera rasta (EU, 2003). U Srbiji ova praksa je takođe zabranjena odgovarajućim propisima, međutim široka i nekontrolisana upotreba antibiotika u terapiji svinja doprinosi sve češćoj pojavi antimikrobne rezistencije na farmama svinja. Komplikovani način primene antibiotika kod životinja na farmama, neracionalna upotreba antibiotika često i bez laboratorijskog nalaza i antibiograma, kao i često subdoziranje ili prekomerna upotreba antibiotika dodatno pogoršava ionako lošu situaciju u pogledu rezistencije bakterija na antimikrobne agense.

U našoj studiji svi ispitivani izolati *Y. enterocolitica* bili su osetljivi na ceftazidim, cefotaksim, gentamicin, meropenem, sulfonamid i trimetoprim. Ceftazidim i cefotaksim pripadaju grupi cefalosporina treće generacije, i zapravo su lekovi koje Svetska zdravstvena organizacija preporučuje u terapiji infekcija *Y. enterocolitica* (Fàbrega i Vila, 2012). Detekcija izolata *Y. enterocolitica* BT4/O:3 otpornih na nalidiksinsku kiselinu, tetracikline i hloramfenikol na farmama za tov može biti povezana sa nekontrolisanom upotrebom antibiotika, što uz visok selektivni pritisak na mikrobiotu dovodi do širenja rezistencije na više lekova (Martins i sar., 2018; Van Boeckel i sar., 2015). Rezistencija na nalidiksinsku kiselinu je ranije već opisana u Švajcarskoj (Fredriksson Ahomaa i sar., 2012b). Pošto je sistemska aplikacija hloramfenikola

zabranjena, upotreba analoga (tiamfenikol i florfenikol) može biti razlog za potencijalnu pojavu korezistencije (Bonardi i sar., 2014; Harada i sar., 2006). Preparati tiamfenikola i florfenikola se vrlo često koriste u terapiji respiratornih infekcija svinja. Uzrok antimikrobne rezistencije na hloramfenikol je najverovatnije poreklom od konjugovanog plazmida. Naime, eksperimenti konjugacije su pokazali da se rezistentni plazmid može lako preneti između sojeva *Y. enterocolitica* (Sihvonen i sar., 2011). Generalno, kada izuzmemo rezistenciju na ampicilin, u našoj studiji nivo rezistencije značajno je manji nego u drugim studijama, ali su obrasci rezistencije bili slični (Bonardi i sar., 2016). Za razliku od ostalih bioserotipova (BT2/O:5,27; BT3/O:3; BT1B) koji su bili rezistentni samo na ampicilin, jedino je BT1A pored ampicilina pokazao rezistenciju i na cefoxitin.

Činjenica da su izolati *Y. enterocolitica* BT4/O:3 poreklom sa farmi Tip I bili rezistentni samo na ampicilin, što se smatra prirodnom otpornošću, dovodi nas do zaključka da zatvoreni sistemi u kojima nema mešanja životinja iz drugih izvora značajno doprinose manjem razvoju rezistencije prema antimikrobnim lekovima. Sve pozitivne svinje koje su bile poreklom sa velikih farmi (>500) pokazale su obrazac rezistencije samo prema ampicilinu što nam ukazuje na to da veliki sistemi verovatno primenjuju mere kontrolisane upotrebe antibiotika čime doprinose smanjenju antimikrobne rezistencije. Analizirajući podatke o rezistenciji svinja po regionima utvrđeno je da su sve svinje iz regiona I i V bile rezistentne samo na ampicilin. Visoka učestalost rezistencije na ampicilin je dobro poznata činjenica, jer se *Y. enterocolitica* smatra prirodno otpornom na ampicilin i na prvu generaciju cefalosporina (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2011). Otpornost na beta laktamske antibiotike (ampicilin i cefalosporini prve generacije) omogućena je prisustvom hromozomskih gena *blaA* i *blaB* koji imaju sposobnost da kodiraju proizvodnju beta laktamaza (Bolton, 2013).

U cilju utvrđivanja faktora rizika koji su u vezi sa fazom pre klanja i fazom klanja korišćen je standardizovani upitnik koji je popunjavan za svaku seriju uzorkovanja. Procenjavani su mogući uticaji farmskog sistema (otvoreni tip, zatvoreni tip), kapaciteta farme, primene biosigurnosnih mera na farmama, načina vodosnadbavanja i kontrole vode, zatim kontrole glodara, vremena i tipa transporta, dužine boravka u depou klanice, kapaciteta klanice, regiona i sezone uzorkovanja. Sagledavanjem svih ovih faktora primenom metoda univarijantne i multivarijantne logističke regresije, omogućeno je precizno definisanje faktora rizika od značaja. Poznavanje faktora rizika omogućiće efektivno i efikasno upravljanje aktivnostima radi njihovog smanjenja ili eliminacije, a sve sa ciljem unapređenja bezbednosti hrane i javnog zdravlja.

Uzorkovane svinje bile su poreklom sa 30 farmi i svaka farma predstavljala je jednu seriju, tako da je ukupno bilo 30 serija uzorkovanja. Posmatrajući serije uzorkovanja svinja kao epidemiološku jedinicu (EFSA, 2011), u našoj studiji je bilo 83,3% pozitivnih serija. U drugim studijama otkriven je znatno manji procenat pozitivnih serija svinja (Bonardi i sar., 2016; Fondrevez i sar., 2014; Vanantwerpen i sar., 2014). Visok procenat pozitivnih serija u našoj studiji sugerise široko rasprostranjenu stopu infekcije serije sa *Y. enterocolitica* (Vanantwerpen i sar., 2014). Bonardi i sar., (2016) nisu otkrili značajnu razliku u prevalenciji između različitih tipova farmi. U našoj studiji prevalencija na farmama Tip I (farme zatvorenog tipa) se kretala u rasponu od 2,5% do 20%, dok je na farmama Tip II (farme otvorenog tipa) prevalencija bila od 2,5% do 60%. Dobijeni rezultati su slični sa rezultatim u drugim studijama (Vanantwerpen i sar., 2014; Gürtler i sar. 2005). Ukupno posmatrano, prevalencija na farmama Tip I je bila 7,5% što je značajno manje u odnosu na farme Tip II gde je prevalencija iznosila 12,7%.

Iz ovoga možemo zaključiti da su svinje poreklom sa farmi Tip II (farme za tov) bile inficirane više nego dvostruko od onih sa farmi Tip I ($p < 0,001$). Tako velike razlike u prevalenciji svinja pozitivnih na *Y. enterocolitica* ukazuju na postojanje različitih nespecifičnih uslova na farmama koji mogu pogodovati širenju *Y. enterocolitica*. Jedno od objašnjenja se može pripisati adekvatnom upravljanju farmama zatvorenog tipa, posebno u pogledu nabavke prasadi i kompletnog sistema proizvodnje. Prasad u svom početnom periodu razvoja mogu biti značajni asimptomatski prenosioci *Y. enterocolitica* što, uz nabavku iz različitih izvora, stvara mogućnost za širenje infekcije na farmama za tov (Virtanen i sar., 2012). Smanjenje prevelancije na farmama porekla svinja je od velike važnosti, posebno kada imamo u vidu činjenicu da visoka prevalencija patogenih *Y. enterocolitica* na nivou farme može dovesti do visoke stope kontaminacije trupova na klanici (Laukkanen i sar., 2009).

Analizirajući podatke o uticaju veličine farme na prevalenciju utvrdili smo da je bila nešto veća na farmama malog kapaciteta (<150) i iznosila je 11,4%, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Nedovoljno razvijena infrastruktura na malim farmama koja uslovljava držanje različitih kategorija svinja u istim objektima, uobičajno nizak nivo biosigurnosih mera i mali broj radnika koji opslužuju različite kategorije su najverovatniji razlog za češći nalaz na farmama manjeg kapaciteta.

Po prijemu u klanicu, klanje svinja mora biti obavljeno što pre bez nepotrebnog odlaganja, osim ako je životinjama potrebno obezbediti određeno vreme odmora pre klanja radi njihove dobrobiti i zaštite. Takođe, u cilju obezbeđenja kontinuiteta procesa klanja ponekad je potrebno životinje zadržati u depou klanice. Odmor životinja u depo klanice je značajan kako bi se životinje oporavile od prethodnih stresnih situacija kao što su utovar, transport i istovar koji mogu negativno uticati na kvalitet mesa. Sa druge strane duže zadržavanje životinja, može doprineti lošijem kvalitetu mesa usled nastajanja telesnih povreda na koži, dolazi do gubitka na težini trupa, a posebno je značajna unakrasna kontaminacija patogenim mikroorganizmima koji se izlučuju putem fecesa.

U našoj studiji otkrili smo da se povećan rizik od infekcije javlja kod svinja koje su boravile duže od 3h u depou klanice ($p < 0,035$). Prevalencija kod tih svinja je bila 13,6% dok je kod svinja koje su boravile kraće vreme ($<3h$) iznosila 7,1%. Ovo je naročito bilo izraženo u klanici A gde je prevalencija u slučaju dužeg boravka u depou klanice iznosila 17,2 %, što odgovara činjenici da je klanica A srednjeg kapaciteta u čijem depou dolazi do intenzivnijeg kontakta među svinjama. Posmatrano u odnosu na tip farme, sasvim je bila očekivana veća prevalencija kod svinja poreklom sa farmi Tip II u slučaju dužeg boravka i iznosila je 14,7%. Izlučivanje *Y. enterocolitica* putem fecesa od strane asimptomatskih životinja, sa visokim udelom pozitivnih serija svinja kao što je utvrđeno u našoj studiji, kao i mogućnosti kontaminacije sa prethodno neočišćenih površina sa kojima životinje dolaze u kontakt, pružaju priliku za brzu infekciju (Monack i sar., 1997). Posebno, kada se uzme u obzir činjenica da patogenezu *Y. enterocolitica* započinje unošenjem kontaminirane hrane i vode i obuhvata prijanjanje bakterija i translokaciju preko M ćelija koje pokrivaju limfoidne folikule tankog creva (Monack i sar., 1997). U prilog ovome govori činjenica da se *Y. enterocolitica* može naći u limfnim čvorovima i slepom crevu nakon samo 3h od oralne infekcije (Bonardi i sar., 2016; Virtanen i sar., 2012).

Vreme zadržavanja u depou klanice može imati i uticaj na kvalitet mesa zaklanih svinja. Čobanović i sar. (2016) utvrdili su da kraći boravak svinja u depou klanice ($<1h$) dovodi do povećanja koncentracije glukoze i laktata usled ubrzanih postmortalnih promena što nastaje kao posledica delovanja akutnog stresa na svinje pre klanja. U uslovima stresa smanjen je dotok krvi u mišiće pa se razvijaju anaerobni procesi razlaganja glikogena zbog čega dolazi do

povećanja temperature mesa nakon klanja i snižavanja pH vrednosti mesa. Sve ovo negativno utiče na kvalitet mesa pojavom bledog, mekog i vodenastog mesa. Sa druge strane kod svinja koje se duže boravile u depou (>3h) utvrđene su manje koncentracije glukoze i laktata pa samim tim pojava bledog mekog i vodenastog mesa je smanjena, ali dolazi do povećanja učestalosti nalaza tamnog, čvrstog i suvog mesa. Takođe, kod dužeg boravka učestaliji je i nalaz telesnih povreda (Čobanović, 2018).

Vreme zadržavanja u depou klanice nije precizno definisano važećim propisima, već se period odmora određuje u vezi sa situacijom. Iz navedenih razloga potrebno je naći optimalno vreme koje će omogućiti životinjama potreban odmor u cilju dobijanja kvalitetnog mesa a sa druge strane smanjiće se nivo unakrasne kontaminacije patogenim mikroorganizmima. Iz tog razloga procenjuje se da bi optimalno vreme boravka u depou iznosilo od 2 do 4h (Zhen i sar., 2013). Preporuka je da se površine u depou klanice redovno čiste i dezinfikuju posle svakog praženjenja, kao i da se izbegava mešanje svinja sa različitim farmi. Uzimajući u obzir navedene činjenice, mogućnost unakrasne kontaminacije i infekcije/kontaminacije životinja, produženi boravak životinja u depou može imati štetne posledice sa aspekta stepena infekcije i neadekvatne higijenske prakse koje mogu povećati rizik od kontaminacije na nivou linije klanja. U cilju sprečavanja unakrasne kontaminacije između životinja sa različitim farmi preporučuje se da se prethodno izvrši kategorizacija rizika na farmama svinja u odnosu na infekciju *Y. enterocolitica*. Na taj način, veterinar koji radi na klanici imao bi podatke o riziku od *Y. enterocolitica* i mogao bi blagovremeno preduzeti mere za smanjenje unakrasne kontaminacije u smislu odvojenog klanja svinja sa rizičnih farmi, odvajanja glave pre rasecanja trupa, laboratorijske analize, upotrebe mesa isključivo za proizvodnju termički obrađenih proizvoda, mere dezinfekcije i dekontaminacije.

U tom pogledu, mikrobiološko ispitivanje tonzila, kao metoda za kategorizaciju rizika na farmi u odnosu na infekciju *Y. enterocolitica* može biti ograničeno zbog dobrobiti i zaštite životinja na farmama. Jedno od rešenja je serološko ispitivanje za dugoročnu kategorizaciju farmi i praćenje sojeva *Y. enterocolitica* u klanicama visokog rizika po ukupnoj karakterizaciji, koje je predloženo kao model umerenih troškova i koristi. Sa druge strane, poznato je da infekcija svinja nastaje nakon prva dva meseca života pri čemu dolazi do stvaranja antitela. Ovaj serološki odgovor ostaje dugo prisutan u organizmu pa na klanje vrlo često dolaze svinje koje su serološki pozitivne, dok je stvarni nalaz *Y. enterocolitica* kod ovih svinja u znatno nižem procentu (Nesbakken i sar., 2006; Von Altröck i sar., 2006). U prilog ovome govori studija koju su sprovedli Bonardi i sar., (2016) u Italiji gde je istovremeno na uzorcima tonzila urađeno bakteriološko ispitivanje, a na uzorcima mesnog soka dijafragme istih svinja sprovedeno serološko ispitivanje. Rezultati ove studije dali su 27,4% pozitivnih uzoraka tonzila na *Y. enterocolitica* BT4/O:3 i 56,1% seropozitivnih uzoraka mesnog soka. Istovremeno 17 seronegativnih svinja je bilo pozitivno na nalaz *Y. enterocolitica* (ispitani uzorci tonzila), što ukazuje na skorašnju infekciju svinja i potvrđuje hipotezu da infekcija svinja može nastati i u fazama utovara, transporta i istovara ili za vreme boravka u depou klanice. Zbog toga bi kombinacija serološkog ispitivanja na farmama i bakteriološkog ispitivanja na klanicama bila idelano rešenje za kategorizaciju farmi i procenu rizika. Dalji tok istraživanja treba fokusirati na *cost-benefit* analizi, radi uključivanja različitih metodoloških pristupa od farme do klanice u cilju sveobuhvatnijeg ispitivanja patogenih mikroorganizama.

U našem istraživanju faktor rizika za infekciju svinja, pored farmi za tov svinja i produženog perioda boravka u depou, uključuje i zimsku sezonu. Utvrđena je skoro četvorostruka verovatnoća infekcije svinja tokom zime u odnosu na druga godišnja doba ($p<0,001$). Utvrdili smo da je u odnosu na sezonu najveća prevalencija u toku zimskih meseci, kada je broj pozitivnih uzoraka bio 46/255 (18,04 %). Najveći broj pozitivnih uzoraka u jednoj seriji bio je u januaru mesecu 32/120 (26,67 %). U ovom periodu su spoljašnje temperature niže nego u ostalim periodima godine pa se može pretpostaviti da je nalaz veći usled delovanja niskih spoljašnjih temperatura, zbog čega su svinje u pokušaju da se zagreju zbijene jedne uz druge pri čemu dolazi do veće mogućnosti unakrasne infekcije. Takođe i drugi autori su utvrdili da je veća prevalencija u toku hladnijih meseci, kao i stopa izolacije ovih bakterija (Weber i Knapp, 1981, Bonardi i sar., 2016). Ovo je možda jedan od razloga veće prevalencije u zemljama sa hladnijom klimom kao što su Finska, Estonija, Letonija i dr. Nasuprot tome, visok nivo prevalencije *Y. enterocolitica* zabeležen je i u Južnoj Evropi, tačnije u Španiji (93%) (Ortiz Martínez i sar., 2011). Naročito visok nalaz u toku zimske sezone, bio je izražen kod svinja poreklom iz regiona I i iznosio je 40%. U Regionu I, uzgoj svinja predstavlja veoma razvijenu granu stočarstva, gde se svinje gaje u intenzivnim uslovima što uz delovanja više nepovoljnih faktora kao što su duži transport i niske spoljašnje temperature ima za rezultat i veću prevalenciju. Studije adaptacije psihotrofnih mikroorganizama na niže temperature, posebno u pogledu transkripcionih i translacionih mehanizama preživljavanja su neophodne za bolju kontrolu patogenih mikroorganizama u savremenom pristupu bezbedne hrane (Li i sar., 2020).

Univarijantnom logističkom regresijom utvrdili smo da region sa koga potiču svinje može imati značajan uticaj na prevalenciju. Najčešći nalaz jerisnija (18,8%) zabeležen je u Regionu I u odnosu na prosečnu prevalenciju po regionima od 10,8% sa statističkom značajnošću od ($p<0,001$). U ovom regionu je proizvodnja svinja veoma razvijena grana stočarstva gde se ukupno gaji oko 755.000 svinja što čini 26% celokupne proizvodnje svinja u Srbiji (RZS, 2018). Najčešće su u pitanju veliki farmski sistemi, uglavnom otvorenog tipa, gde se prasad neretko uvoze za potrebe tova, pa je i to jedan od razloga češćeg nalaza ovog mikroorganizma u navedenom regionu.

U Severnom delu Srbije, dobro je razvijena tradicionalna proizvodnja proizvoda od mesa kao što su: Sremski kulen, Sremska šunka, Lemeški kulen, Petrovska klobasa i dr. (Karabasil i sar., 2018). Proizvodnja tradicionalnih proizvoda, podrazumeva upotrebu nekoliko različitih postupka konzervisanja među kojima su najčešći soljenje, sušenje, dimljenje i fermentacija. Kombinacija različitih metoda konzervisanja uz poštovanje primene dobre proizvođačke i dobre higijenske prakse trebalo bi da u potpunosti osiguraju bezbednost ovih proizvoda (Ducic i sar., 2014).

Kada razmatramo činjenicu ovako visokog nalaza *Y. enterocolitica* u Regionu I, moramo uzeti u obzir i dužinu transporta svinja koji je za ove regione bio najduži >4h. U slučaju dužeg transporta (>4h) prevalencija je bila veća (10,9%) u odnosu na kraći transport (<4h) gde je iznosila 9,2%. Utvrđeno je da uticaj transporta na nalaz *Y. enterocolitica* nije bio statistički značajan ($p=0,435$) ali ga ne možemo u potpunosti zanemariti, naročito kada uzmemo u obzir činjenicu da stresni događaji, kao što je npr. transport, doprinose intenzivnijem međusobnom kontaktu pri čemu se stvara veća mogućnost za unakrasnu infekciju i kontaminaciju. Za transport svinja u našoj studiji korišćeni su specijalizovani kamioni sa podnom površinom u jednom ili dva nivoa ali je utvrđeno da vrsta transportnog sredstva (spratni ili jedan nivo) nema statistički značajan uticaj na prevalenciju ($p=0,300$). Od ranije je poznato da se neke svinje mogu inficirati tokom transporta (Fukushima i sar., 1990). Skjerve i sar., (1998) utvrdili

su da transportna sredstva (sopstveni kamioni klanica) mogu uticati na veći nivo nalaza *Y. enterocolitica*, međutim to u našoj studiji nije bio slučaj. Verovatno je da postupci temeljnog pranja i dezinfekcije kamiona na klanicama imaju uticaj na manju verovatnoću pojave unakrasne kontaminacije tokom transporta pa samim tim i na manju prevalenciju.

Fredriksson-Ahomaa i sar., (2000b) pronašli su značajnu razliku u prevalenciji između klanica koja može biti posledica postojanja različitih postupaka klanja, različitih higijenskih mera i različitog porekla primljenih svinja. U našoj studiji prevalencija je bila najveća na klanici B (16,8%) čiji je satni kapacitet klanja bio najveći (100 svinja/h). Uticaj kapaciteta klanice na ukupnu prevalenciju u našoj studiji univarijantnom statističkom analizom pokazao se kao statistički značajan ($p=0,042$). Međutim uključivanjem ovog faktora u model multivarijantne logističke regresije ovaj faktor nije bio od značaja za prevalenciju. Van Damme i sar., (2015) su takođe utvrdili da je nalaz jersinija bio veći na klanicama velikog kapaciteta. Analizirajući rezultate u odnosu na druge ispitivane karakteristike kao što su sezona, region i tip farme utvrđeno je da je u svim slučajevima prevalencija bila najveća na klanici B. Veći nalaz u klanici većeg kapaciteta može biti povezana sa većim brojem farmi sa kojih se dobavljaju svinje tokom dana i samim tim postoji i veći rizik od unakrasne kontaminacije tokom smeštaja u depou klanice ukoliko dolazi do mešanja svinja sa različitih farmi. Veći kapacitet klanice zahteva i veći broj ljudi koji obrađuje trupove što može dovesti do veće verovatnoće unakrasne kontaminacije.

Postoji mogućnost da kontaminacija trupova nastane i u samoj klanici. Naime utvrđeno je da površine u klanici često mogu biti kontaminirane. Dokazano je prisustvo *Y. enterocolitica* na testeri za rasecanje trupova, na kukama za kačenje iznutrica, na noževima i sl. (Fredriksson-Ahomaa, 2001b).

Na našim klanicama glava se ne odvaja od trupa već se električnom testerom raseca na polovinu u jednom potezu zajedno sa trupom pa prilikom rasecanja trupa testera dolazi u kontakt sa tonzilama i jezikom. Imajući u vidu da su bakterije pronađane na tonzilama, rasecanje trupova električnom testerom, zasecnje limfnih čvorova i dalja manipulacija glavom može biti preduslov za dalje širenje i kontaminaciju na mnogo većem broju trupova u klanici. Ovu hipotezu dodatno potvrđuje činjenica da su patogene *Y. enterocolitica* u ranijim studijama utvrđene na testeri za rasecanje trupova (Laukkanen i sar., 2010). Postupci sterilizacije testere toplom vodom između rasecanja dva trupa mogu doprineti smanjenju nalaza jersinija na klanici. Opšte je poznato je da higijenske mere za smanjenje rizika od kontaminacije patogenim bakterijama uključuju između ostalog podvezivanje i zaštitu rektuma plastičnom kesom odmah posle odvajanja od prirodnih veza. Međutim, u cilju smanjenja početne kontaminacije *Y. enterocolitica*, značajnu ulogu imalo bi i odvajanje glave od trupa pre rasecanje glave i razdvajanja jezika kako bi se sprečila unakrasna kontaminacija sa *Y. enterocolitica* koja se nalazi na tonzilama i unutrašnjim površinama obraza. Iz tog razloga bi u budućem periodu obuke radnika trebalo da obuhvataju i poglavlja o pravilnom rukovanju tonzilama svinja i odvajanju glave od trupa pre rasecanja. Prema važećim propisima u okviru post mortem inspekcije mesa obavezan je pregled i zasecanje mandibularnih limfnih čvorova. Činjenica da se infekcija *Y. enterocolitica* širi limfnim putevima, zasecanje limfnih čvorova može predstavljati rizik od dalje unakrasne kontaminacije. U cilju smanjenja rizika od unakrasne kontaminacije zasecanjem limfnih čvorova, preporuka je da veterinar na liniji klanja bude upoznat sa statusom gazdinstva porekla svinja u smislu da li je slobodno ili ne od *Y. enterocolitica* što bi bilo utvrđeno prethodnim monitoringom.

Voda može imati značajnu ulogu kao izvor infekcije ili kao sredstvo prenosa infektivnih agenasa. U prilog tome govore i dokazi o nalazu *Y. enterocolitica* u vodi za piće u pojilicama na farmama svinja (Pilon i sar., 2000). U našoj studiji na svega 7 farmi se koristi voda iz gradskog vodovoda, preostale farme (23) se snabdevaju vodom iz sopstvenih izvora (bunari). Nalaz *Y. enterocolitica* u uzorcima tonzila svinja poreklom sa farmi koje koriste vodu iz sopstvenih izvora bila je neznatno veća (11,3%) u odnosu na farme koje koriste vodu iz gradskog vodovoda (10,1%), te samim tim nije utvrđena statistički značajna razlika ($p=0,626$). Od 23 farme koje koriste vodu iz sopstvenih bunara, samo je osam farmi primenjivalo mere za kontrolu kvaliteta vode (laboratorijske analize). Ovaj parametar, takođe nije bio statistički značajan za nalaz jersinija ($p=0,339$). Za razliku od naših rezultata, u ranijim studijama utvrđena je značajno manja prevalencija *Y. enterocolitica* na farmama koje koriste vodu iz gradskog vodovodnog sistema (Virtanen i sar., 2011).

Procenu nivoa biosigurnosnih mera definisali smo u odnosu na prisustvo/odsustvo dezinfekcionih barijera na ulazu u farmu svinja. Dezinfekcione barijere na ulazu farme utvrđene su na 16 farmi od ukupno 30 ispitanih farmi. Nalaz jersinija je bio manji na farmama koje su imale dezinfekcione barijere (9%) u odnosu na farme na kojima to nije bio slučaj (12,2%). Univarijantnom statističkom analizom postojanje dezinfekcionih barijera nije bilo statistički značajno ($p=0,101$), što su takođe u ranijoj studiji utvrdili Virtanen i sar., (2011). Za razliku od naših rezultata Skjerve i sar., (1998) su utvrdili da dezinfekcione barijere značajno doprinose smanjenju nalaza *Y. enterocolitica* na farmama svinja. Primena biosigurnosnih mera ima svoj značaj za kontrolu unosa patogenih uzročnika i važan segment jeste provera efikasnosti dezinfekcionih barijera, zatim priprema i svežina dezinfekcionih rastvora, vrsta korišćenih dezinfekcionih sredstava kao i njihova koncentracija.

Velike količine raznovrsnih hraniva čine farme svinja idealnim staništem za divlje glodare, poput miševa i pacova. Od ranije je poznato da divlji glodari mogu imati ulogu rezervoara ili prenosioca patogenih mikroorganizama te njihovo stalno prisustvo na farmama svinja opravdava bojazan da mogu imati ulogu u širenju infekcije *Y. enterocolitica*. Ovu sumnju opravdava nalaz patogenih biotipova *Y. enterocolitica* kod miševa i pacova na farmama svinja za razliku od glodara koji su ulovljeni na nekim drugim lokacijama (Backhans i sar., 2011). Zbog toga se u cilju smanjenja prevalencije, kako infekcije *Y. enterocolitica* tako i drugih uzročnika, preporučuje redovno sprovođenje mera sistemske deratizacije od strane ovlašćenih i sertifikovanih institucija. U našoj studiji profesionalne mere kontrole glodara i deratizacije sprovedene su na svega šest farmi, dok se na preostalim farmama koriste *in-house* metode (mamci, mačke). Prevalencija na farmama na kojima se ne primenjuju mere profesionalne deratizacije bila je veća (12,1%) u odnosu na farme na kojima se primenjuju (9,8%), ali ova razlika nije bila statistički značajna ($p=0,286$). Sa druge strane, često prisustvo mačaka na farmama, bilo je povezano i sa nalazom pozitivnih životinja na farmama. Utvrđeno je da mačke mogu biti nosioci *Y. enterocolitica* BT4/O:3 pa se pretpostavlja da mogu imati određeni značaj kao rezervoari i prenosioci infekcije (Hurvell, 1981).

Utvrđeno je da se patogene *Y. enterocolitica* često mogu naći u usitnjenom mesu svinja. Ferl i sar., (2020) utvrdili su da je 22,6% uzoraka usitnjenog mesa svinja bilo kontaminirano sa *Y. enterocolitica*. Ovako visok nalaz je verovatno posledica upotrebe mesa poreklom sa regije glave i obraza za proizvodnju usitnjenog mesa. Nalaz *Y. enterocolitica* u mesu čak i u malom broju može predstavljati faktor rizika po potrošače zbog toga što *Y. enterocolitica* pripada grupi bakterija koje imaju sposobnost da se razmnožavaju i pri niskim temperaturama. Skladištenjem mesa svinja u hladnom lancu, olakšava se rast ovih bakterija usled inhibicije

rasta mezofilnih bakterija (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2001c). Činjenica da su navike potrošača u Srbiji takve da se meso svinja konzumira samo posle termičke obrade a da je *Y. enterocolitica* termolabilan mikroorganizam, može se pretpostaviti da je mogući način infekcije putem unakrasne kontaminacije u slučaju kada se koristi isti pribor i ista radna površina za sveže i termički obrađeno meso. Primera radi, u Nemačkoj postoji tradicionalni specijalitet mlevenog mesa svinja sa lukom i biberom koje se konzumira u sirovom stanju što predstavlja dodatni rizik od nastanka infekcije *Y. enterocolitica*. Takođe, zbog sposobnosti rasta pri nižim temperaturama, postoji mogućnost unakrasne kontaminacije prilikom korišćenja frižidera za sveže i termički obrađeno meso kao i za drugu hranu koja se konzumira bez prethodne termičke obrade.

U cilju produženja roka trajanja i što dužeg očuvanja originalnih senzornih osobina mesa i svežine u poslednje vreme su sve češće u upotrebi kako vakum pakovanja tako i pakovanja sa modifikovanom atmosferom gasova, pri čemu se kao gasovi najčešće upotrebljavaju ugljendioksid i azot. Istraživanje koje je sprovedeno na usitnjenom mesu svinja pokazuje da i pored upotrebe pakovanja sa modifikovanom atmosferom gasova dolazi do porasta broja *Y. enterocolitica* u mesu tokom skladištenja pri temperaturi frižidera (Ivanović, 2014).

Nalaz ovako velikog broja svinja inficiranih sa *Y. enterocolitica* BT4/O:3, mogućnost dalje unakrasne kontaminacije tokom klanja i prerade mesa i mogućnost razmnožavanja pri niskim temperaturama tokom skladištenja predstavlja rizik po javno zdravlje, zbog čega je važno posebnu pažnju usmeriti na uslove higijene klanja kao i na rukovanje delovima trupa kao što je glava, zatim tonzile i jezik svinja. Dobro poznavanje izvora i puteva kontaminacije *Y. enterocolitica* je od velikog značaja za sprečavanje bolesti prenosivih hranom.

Pored mera koje se primenjuju na klanici, važno je posebnu pažnju obratiti i na smanjenje početne kontaminacije na farmama porekla. Zahvaljujući dobijenim rezultatima i poznavanju faktora rizika u lancu proizvodnje mesa svinja, doprineće se boljem razumevanju značaja primene principa dobre higijenske prakse, što sveukupno ima za cilj smanjenje nalaza *Y. enterocolitica* u krajnjem proizvodu. U cilju očuvanja javnog zdravlja, dobijeni rezultati ukazuju na potrebu podizanja svesti o značaju nalaza *Y. enterocolitica* u mesu svinja i daljem razvoju programa kontrole ovog patogenog mikroorganizma na farmama kao važnu meru upravljanja ovim rizikom, sa ciljem smanjenja odnosno eliminacije u lancu proizvodnje mesa svinja.

7. ZAKLJUČCI

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

- Uzorkovanje je sprovedeno u 30 serija na tri klanice (Region V). Uzeto je 960 uzoraka tonzila sa trupova zaklanih svinja. Procentulana zastupljenost uzetih uzoraka po regionima bila je sledeća: Region I (Severno Bački i Južno Bački okrug), 16,7%; Region II (Sremski okrug), 39,4%; Region III (Mačvanski okrug), 15,6%; Region IV (Podunavski i Braničevski okrug), 11,5%; i Region V (Toplički, Rasinski i Nišavski okrug), 16,9%. Udeo uzoraka po sezonama bio je ujednačen i iznosio je: leto (25%), jesen (25%), zima (27%) i proleće (23 %);
- Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, ukupno je 83,3% (25/30) serija uzorkovanja bilo pozitivno na *Y. enterocolitica*. Od ukupno ispitanih 960 uzoraka tonzila svinja, *Y. enterocolitica* je izolovana iz 100 uzoraka, tako da je ukupna prevalencija iznosila 10,4% (95% CI=8,5-12,3%). Najveća prevalencija utvrđena je na klanici B i iznosila je 16,8%, dok je na klanici A iznosila 10% i klanici C 8,9%. Utvrđeno je da je Region I područje sa najvećim brojem pozitivnih svinja, a značajno manji broj potvrđen je u Regionu II ($p<0,003$), III ($p<0,001$) i V ($p<0,001$);
- Kao najčešći bioserotip utvrđen je BT4/O:3 koji ima udeo od 79 % u odnosu na broj pozitivnih uzoraka. Kod 5 % uzoraka, izolovani su saharoza negativni izolati BT4 S-/O:3. Udeo preostalih izolovanih bioserotipova bio je sledeći: BT2/O:5,27 (3%); BT3/O:3 (5%); BT1B (1%); kao i nepatogeni soj BT1A (7%). Svi ispitani izolati (125) bili su osetljivi na cefotaksim, ceftazidim, meropenem, gentamicin, trimethoprim, sulfonamid, dok je sledeći obrazac rezistencije utvrđen, samo na ampicilin (80,8%), ampicilin i nalidiksinsku kiselinu (12,8%), zatim na ampicilin, nalidiksinsku kiselinu, hloramfenikol i tetracikline (5,6%) i ampicilin i cefoksitin (0,8).
- Svi ispitani izolati *Y. enterocolitica* BT4/O:3 i BT4S-/O:3 sadržali su *ail* i *ystA* gen dok su bili negativni na prisustvo *ystB* gena.

- Analizirajući podatke PFGE profila *Y. enterocolitica* BT4/O:3 i BT4 S-/O:3, utvrđeno je pet različitih genotipova (G1-G5), sa zajedničkim identičnim genetskim profilima (100% sličnosti) unutar svakog genotipa;
- Analizom faktora rizika uočen je dvostruko povećan rizik od infekcije kod svinja koje potiču sa farmi Tip II (farme za tov svinja) u poređenju sa farmama Tip I (farme zatvorenog tipa, od prašenja do kraja tova) ($p < 0,001$). Povećani rizik od infekcije postoji i za produženo vreme boravka u depou klanice ($> 3h$) u odnosu na kraće (0-3h) vreme zadržavanja na nivou klanice ($p < 0,035$), što se tiče sezone, utvrđena je skoro četvorostruka verovatnoća infekcije svinja tokom zimske sezone u poređenju sa drugim godišnjim dobima ($p < 0,001$).

8. LITERATURA

- Andersen, J. K. (1988). Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with humanpathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.* 7: 193-202.
- Backhans, A., Fellström, C., and Lambertz, S. T. (2011). Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in small wild rodents. *Epidemiology & Infection*, 139(8), 1230–1238. Cambridge Core. <https://doi.org/10.1017/S0950268810002463>
- Bancerz-Kisiel, A., Pieczywek, M., Łada, P., & Szweda, W. (2018). The Most Important Virulence Markers of *Yersinia enterocolitica* and Their Role during Infection. *Genes*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/genes9050235>
- Bancerz-Kisiel, A., Szczurba-Turek, A., Lipczyńska, K., Stenzel, T., & Szweda, W. (2012). Bioserotypes and Virulence Markers of *Yersinia enterocolitica* Strains Isolated from Mallards (*Anas platyrhynchos*) and Pheasants (*Phasianus colchicus*). *Journal of Food Protection*, 75(12), 2219–2222. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-214>
- Batzilla, J., Heesemann, J., & Rakin, A. (2011). The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(7), 556–561. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.05.002>
- Bent Zachary W. and Young Glenn M. (2010). Contribution of BlaA and BlaB β -Lactamases to Antibiotic Susceptibility of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), 4000–4002. <https://doi.org/10.1128/AAC.01754-09>
- Black RE, Jackson RJ, Tsai T, Medvesky M, Shayegani M, Feeley JC, MacLeod KI, Wakelee AM. (1978). Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N Engl J Med.* 1978 Jan 12;298(2):76-9. doi: 10.1056/NEJM197801122980204
- Blagojevic, B., and Antic, D. (2014). Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses. *Food Control*, 36(1), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.018>

- Blagojevic, B., Nesbakken, T., Alvseike, O., Vågsholm, I., Antic, D., Johler, S., Houf, K., Meemken, D., Nastasijevic, I., Vieira Pinto, M., Antunovic, B., Georgiev, M., & Alban, L. (2021). Drivers, opportunities, and challenges of the European risk-based meat safety assurance system. *Food Control*, 124, 107870. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107870>
- Bolton D.J., Ivory C. and McDowell D. (2013). A small study of *Yersinia enterocolitica* in pigs from birth to carcass and characterization of porcine and human strains. *Food Control* 33: 521–524
- Bolton, D. J., Ivory, C., & McDowell, D. (2013). Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in pork slaughter plant scald tank water. *Meat Science*, 95(3), 668–671. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.034>
- Bonardi, S., Alpighiani, I., Pongolini, S., Morganti, M., Tagliabue, S., Bacci, C., & Brindani, F. (2014). Detection, enumeration and characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in pig tonsils at slaughter in Northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.005>
- Bonardi, S., Bassi, L., Brindani, F., D’Incau, M., Barco, L., Carra, E., & Pongolini, S. (2013). Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2), 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.012>
- Bonardi, S., Bruini, I., D’Incau, M., Van Damme, I., Carniel, E., Brémont, S., Cavallini, P., Tagliabue, S., & Brindani, F. (2016). Detection, seroprevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pig tonsils in Northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 235, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.033>
- Borch E, Nesbakken T, Christensen H. (1996). Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int J Food Microbiol.* 30(1-2):9-25. doi: 10.1016/0168-1605(96)00988-9
- Bottone EJ. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev.* Apr;10(2):257-76. doi: 10.1128/CMR.10.2.257
- Bottone EJ. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect.* 1999 Apr;1(4):323-33. doi: 10.1016/s1286-4579(99)80028-8
- Bottone, E. J. (2015). *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an Enduring Human Pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter*, 37(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2014.12.003>
- Bucher M, Meyer C, Grötzbach B, Wacheck S, Stolle A, Fredriksson-Ahomaa M. (2008). Epidemiological data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000-2006. *Foodborne Pathog Dis.*, 5(3):273-80. doi: 10.1089/fpd.2007.0076

- Buncic, S., Alban, L., & Blagojevic, B. (2019). From traditional meat inspection to development of meat safety assurance programs in pig abattoirs – The European situation. *Food Control*, 106, 106705. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.06.031>
- Chlebicz, Agnieszka, and Katarzyna Śliżewska. (2018). "Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review" *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, no. 5: 863. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>
- CLSI, (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Cocolin L. & Comi G. (2005). Use of a culture-independent molecular method to study the ecology of *Yersinia* spp. in food. *Int J Food Microbiol.* 2005 Nov 15;105(1):71-82. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.006
- Čobanović, N. (2018). Pre-mortem uslovi i kvalitet mesa svinja. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
- Čobanović, N., Karabasil, N., Stajković, S., Ilić, N., Suvajdžić, B., Petrović, M., & Teodorović, V. (2016). The Influence of Pre-Mortem Conditions on Pale, Soft and Exudative (PSE) and Dark, Firm and Dry (DFD) Pork Meat. *Acta Veterinaria*, 66(2), 172–186. <https://doi.org/10.1515/acve-2016-0015>
- Ducic, M., Blagojevic, B., Markov, S., Velicanski, A., & Buncic, S. (2014). General patterns of background microbiota and selected bacterial pathogens during production of fermented sausages in Serbia. *Food Control*, 43, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.026>
- ECDC (2019). European Centre for Disease Prevention and Control. Yersiniosis. In: ECDC Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC
- Edwards P. R. & Ewing W. H. (1972). Identification of enterobacteriaceae (6. pr). Burgess Publ.
- EFSA (2009). European Food Safety Authority. Technical specifications for harmonised national surveys of *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs on request of EFSA. *EFSA Journal* 2009; 7(11):1374. [23 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2009.1374.
- EFSA and ECDC. (2021a). European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021; 19(12):6971, 324 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- EFSA and ECDC (2021b). European Food Safety uthority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021;19(2):6406, 286 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

- EFSA and ECDC (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12), e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- EFSA and ECDC. (2018). European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), e05500. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- EFSA and ECDC. (2019). European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926, 276 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- EFSA, (2007). European Food Safety Authority. Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA J.* 5, 595. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.595>
- EFSA, (2011). European Food Safety Authority. Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for public health hazards to be covered by meat inspection of swine. *EFSA Journal*, 9(10), 2371. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2371>
- EU (2003). European Union, Regulation (EC) No 1831/2003 of the European parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union*, L 268/29
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2012). *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.07.017>
- Fearnley C, On SL, Kokotovic B, Manning G, Cheasty T, Newell DG. (2005). Application of fluorescent amplified fragment length polymorphism for comparison of human and animal isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Sep;71(9):4960-5. doi: 10.1128/AEM.71.9.4960-4965.2005
- Ferl, M., Mäde, D. & Braun, P.G. (2020). Combined molecular biological and microbiological detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in spiced ground pork, meat for production of ground pork and raw sausages. *J Consum Prot Food Saf*, 15, 27–35. <https://doi.org/10.1007/s00003-019-01257-x>
- Fois F, Piras F, Torpdahl M, Mazza R, Ladu D, Consolati SG, Spanu C, Scarano C, De Santis EPL. (2018). Prevalence, bioserotyping and antibiotic resistance of pathogenic *Yersinia enterocolitica* detected in pigs at slaughter in Sardinia. *Int J Food Microbiol.* 20;283:1-6. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.010
- Fondrevez M, Minvielle B, Labbé A, Houdayer C, Rose N, Esnault E, Denis M. (2014). Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. *Int J Food Microbiol.* 17;174:56-62. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.027

- Fosse J, Seegers H, Magras C. (2008). Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. *Vet Res.* 2008 Jan-Feb;39(1):1. doi: 10.1051/vetres:2007039
- Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs CF. (2005). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov.* 2005 Nov 25;2:10. doi: 10.1186/1742-5573-2-10
- Fredriksson-Ahomaa M, Bucher M, Hank C, Stolle A, Korkeala H. (2001c). High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem. *Syst Appl Microbiol.* 2001 Nov;24(3):457-63. doi: 10.1078/0723-2020-00055
- Fredriksson-Ahomaa M, Cernela N, Hächler H, Stephan R. (2012b). *Yersinia enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001-2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31(7):1543-50. doi: 10.1007/s10096-011-1476-7
- Fredriksson-Ahomaa M, Hallanvuo S, Korte T, Siitonen A, Korkeala H. (2001a) Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine sources. *Epidemiol Infect.* 127(1):37-47. doi: 10.1017/s0950268801005611
- Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. (2003b). Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin Microbiol Rev.* 16(2):220-9. doi: 10.1128/CMR.16.2.220-229.2003
- Fredriksson-Ahomaa M, Meyer C, Bonke R, Stüber E, Wacheck S. (2010). Characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolates from tonsils of Bavarian slaughter pigs. *Lett Appl Microbiol.* 50(4):412-8. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02816.x
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. (2006a). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Aug;47(3):315-29. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00095.x
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Siitonen A, Korkeala H. (2006b). Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O : 3 originate mainly from pigs. *J Med Microbiol.* 2006 Jun;55(Pt 6):747-749. doi: 10.1099/jmm.0.46523-0
- Fredriksson-Ahomaa, M. (2001b). Molecular epidemiology of *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica*. Doctoral dissertation, University of Helsinki. <http://urn.fi/URN:ISBN:951-45-9988-8>
- Fredriksson-Ahomaa, M., Björkroth, J., Hielm, S., & Korkeala, H. (2000b). Prevalence and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils from different slaughterhouses. *Food Microbiology*, 17(1), 93–101. <https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0288>
- Fredriksson-Ahomaa, M., Korte, T., & Korkeala, H. (2000a). Contamination of Carcasses, Offals, and the Environment with *yadA*-Positive *Yersinia enterocolitica* in a Pig

- Slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, 63(1), 31–35. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.1.31>
- Fredriksson-Ahomaa, M., Murros-Kontinen, A., Säde, E., Puolanne, E., & Björkroth, J. (2012a). High number of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in cold-stored modified atmosphere-packed pig cheek meat. *International Journal of Food Microbiology*, 155(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.021>
- Fredriksson-Ahomaa, M., Niskanen, T., Bucher, M., Korte, T., Stolle, A., & Korkeala, H. (2003a). Different *Yersinia enterocolitica* 4:O3 Genotypes Found in Pig Tonsils in Southern Germany and Finland. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 132–137. <https://doi.org/10.1078/072320203322337425>
- Fredriksson-Ahomaa, M., Niskanen, T., Neubauer, H., Laukkanen, R., & Korkeala, H. (2002). Characterisation of sucrose-negative *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolates recovered from pig tonsils. *International Journal of Food Microbiology*, 75(1), 19–25. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00746-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00746-2)
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., & Stephan, R. (2007). Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.050>
- Fredriksson-Ahomaa, M., Wacheck, S., Bonke, R., & Stephan, R. (2011). Different Enteropathogenic *Yersinia* Strains Found in Wild Boars and Domestic Pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(6), 733–737. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0711>
- Fredriksson-Ahomaa, M., Wacheck, S., Koenig, M., Stolle, A., & Stephan, R. (2009). Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 135(3), 199–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.019>
- Fukushima H, Nakamura R, Ito Y, Saito K, Tsubokura M, Otsuki K. (1983). Ecological studies of *Yersinia enterocolitica*. I. Dissemination of *Y. enterocolitica* in pigs. *Vet Microbiol.* 8(5):469-83. doi: 10.1016/0378-1135(83)90041-x
- Fukushima, H., Maruyama, K., Omori, I., Ito, K., Iorihara, M., 1990. Contamination of pigs with *Yersinia* at the slaughter house. *Fleischwirtschaft* 70, 1300–1302
- Grant T, Bennett-Wood V, Robins-Browne RM. (1998). Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. *Infect Immun.* 1998 Mar;66(3):1113-20. doi: 10.1128/IAI.66.3.1113-1120.1998
- Gürtler, M., Alter, T., Kasimir, S., Linnebur, M., & Fehlhaber, K. (2005). Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Fattening Pigs. *Journal of Food Protection*, 68(4), 850–854. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.4.850>

- Harada, K., Asai, T., Kojima, A., Ishihara, K., & Takahashi, T. (2006). Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs, *American Journal of Veterinary Research*, 67(2), 230-235. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.2.230>
- Hayashidani H, Ishiyama Y, Okatani TA, Yoshida S, Ishikawa M, Kato Y, Ohtomo Y, Saito M, Horisaka T, Kaneko K, Ogawa M. (2003). Molecular genetic typing of *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 isolated in Japan. *Adv Exp Med Biol*. 529:363-5. doi: 10.1007/0-306-48416-1_72
- Hurvell, B. (1981). Zoonotic *Yersinia enterocolitica*: host range, clinical manifestations and transmission between animals and man. In: Botone, E.J. (Ed.), *Yersinia enterocolitica*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 145–149
- Ivanović S. Jelena (2014). Ispitivanje uticaja različitih načina pakovanja na rast *Y. enterocolitica* u mesu svinja. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine
- IZJS (2014). Zdravstveno statistički godišnjak Republike Srbije 2014. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija
- IZJS (2015). Zdravstveno statistički godišnjak Republike Srbije 2015. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija
- IZJS (2016). Zdravstveno statistički godišnjak Republike Srbije 2016. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija
- IZJS (2017). Zdravstveno statistički godišnjak Republike Srbije 2017. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija
- IZJS (2018). Zdravstveno statistički godišnjak Republike Srbije 2018. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija
- IZJS (2019). Zdravstveno statistički godišnjak Republike Srbije 2019. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija
- IZJS (2020). Zdravstveno statistički godišnjak Republike Srbije 2020. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija
- IZJS (2022). Zdravstveno statistički godišnjak Republike Srbije 2021. Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“. Beograd, Srbija. ISSN 2217-3714 (Online)
- Karabasil, N., Bošković, T., Tomašević, I., Vasilev, D., Dimitrijević, M., Katanić, N., & Antić, D. (2018). Production of traditional meat products in small and micro establishments in Serbia: Current status and future perspectives. *Acta Veterinaria*, 68(4), 373–390. Scopus. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0031>
- Keet, E.E., *Yersinia enterocolitica* septicemia. (1974). Source of infection and incubation period identified. *N. Y. State, J Med*, 74(12): p. 2226-30

- Kim Tae-Jong, Young Briana M., & Young Glenn M. (2008). Effect of Flagellar Mutations on *Yersinia enterocolitica* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5466–5474. <https://doi.org/10.1128/AEM.00222-08>
- Koronkiewicz, A.E.D.-K., K. Markiewicz, A. Wojciechowska, E. Zmuda and W. Dabrowski. (2004). Game animals as carriers of enteric pathogens. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis Scientia Alimentaria*, 238: p. 79–84
- Korte T, Fredriksson-Ahomaa M, Niskanen T, Korkeala H. (2004). Low prevalence of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in sows. *Foodborne Pathog Dis.* 1(1):45-52. doi: 10.1089/153531404772914455
- Latiful Bari, M. Anwar Hossain, Kenji Isshiki, Dike Ukuku. (2011). Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. *Journal of Pathogens*, vol. 2011, Article ID 420732, 13 pages, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/420732>
- Laukkanen R, Ranta J, Dong X, Hakkinen M, Martínez PO, Lundén J, Johansson T, Korkeala H. (2010). Reduction of enteropathogenic *Yersinia* in the pig slaughterhouse by using bagging of the rectum. *J Food Prot.* 2010 Dec;73(12):2161-8. doi: 10.4315/0362-028x-73.12.2161
- Laukkanen, R., Martínez, P. O., Siekkinen, K.-M., Ranta, J., Maijala, R., & Korkeala, H. (2009). Contamination of Carcasses with Human Pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 Originates from Pigs Infected on Farms. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(6), 681–688. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0265>
- Leila M Sihvonen. (2014). Clinical Isolates of *Yersinia enterocolitica* in Finland - Identification and Epidemiology. National Institute for Health and Welfare (THL). Research 117. 145 pages. Helsinki, Finland
- Li, C., Murugaiyan, J., Thomas, C., Alter, T., & Riedel, C. (2020). Isolate Specific Cold Response of *Yersinia enterocolitica* in Transcriptional, Proteomic, and Membrane Physiological Changes. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.03037>
- Lucero-Estrada, C., Favier, G. I., & Escudero, M. E. (2020). An overview of *Yersinia enterocolitica* and related species in samples of different origin from San Luis, Argentina. *Food Microbiology*, 86, 103345. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103345>
- Lukinmaa, S., Nakari, U.-M., Eklund, M. And Siitonen, A. (2004), Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS*, 112: 908-929. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1213.x>
- Martins, B. T. F., Azevedo, E. C. de, Yamatogi, R. S., Call, D. R., & Nero, L. A. (2021). Persistence of *Yersinia enterocolitica* bio-serotype 4/O:3 in a pork production chain in Minas Gerais, Brazil. *Food Microbiology*, 94, 103660. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103660>

- Martins, B. T. F., Botelho, C. V., Silva, D. A. L., Lanna, F. G. P. A., Grossi, J. L., Campos-Galvão, M. E. M., Yamatogi, R. S., Falcão, J. P., Bersot, L. dos S., & Nero, L. A. (2018). *Yersinia enterocolitica* in a Brazilian pork production chain: Tracking of contamination routes, virulence and antimicrobial resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 276, 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.028>
- McNally, A., Cheasty, T., Fearnley, C., Dalziel, R. W., Paiba, G. A., Manning, G., & Newell, D. G. (2004). Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999–2000. *Letters in Applied Microbiology*, 39(1), 103–108. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01548.x>
- Monack DM, Mecsas J, Ghorri N, Falkow S. (1997). *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16;94(19):10385-90. doi: 10.1073/pnas.94.19.10385
- Nesbakken T, Eckner K, Høidal HK, Røtterud OJ. (2003). Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. *Int J Food Microbiol*. 15;80(3):231-40. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00165-4
- Nesbakken, T., Eckner, K., Røtterud, O.-J., (2008). The effect of blast chilling on occurrence of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* compared to *Campylobacter* spp. and numbers of hygienic indicators on pig carcasses. *Int. J. Food Microbiol*. 123, 130–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.011>
- Nesbakken, T., Iversen, T., Eckner, K., Lium, B., (2006). Testing of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig herds based on the natural dynamic of infection. *Int. J. Food Microbiol*. 111, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.019>
- Neubauer H, Aleksic S, Hensel A, Finke EJ, Meyer H. (2000). *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol*.;290(1):61-4. doi: 10.1016/S1438-4221(00)80107-1
- Nielsen B, Heisel C, Wingstrand A. (1996). Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O:3 in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol*.;48(3-4):293-303. doi: 10.1016/0378-1135(95)00147-6
- Ortiz Martínez, P., Fredriksson-Ahomaa, M., Pallotti, A., Rosmini, R., Houf, K., Korkeala, H., (2011). Variation in the Prevalence of Enteropathogenic *Yersinia* in Slaughter Pigs from Belgium, Italy, and Spain. *Foodborne Pathog. Dis*. 8, 445–450. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0461>
- Ortiz Martínez, P., Mylona, S., Drake, I., Fredriksson-Ahomaa, M., Korkeala, H., & Corry, J. E. L. (2010). Wide variety of bioserotypes of enteropathogenic *Yersinia* in tonsils of English pigs at slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1), 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.006>

- Peruzy, M.F., Murru, N., Perugini, A.G., Capuano, F., Delibato, E., Mercogliano, R., Korkeala, H., Proroga, Y.T.R., (2017). Evaluation of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains using SYBR Green real-time PCR. *Food Microbiol.* 65, 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.004>
- Pilon J, Higgins R, Quessy S. (2000). Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* in swine herds in Quebec. *Canadian Veterinary Journal*; 41: 383–387
- PKS, (2017). E- Bilten, Udruženje za stočarstvo i preradu stočarskih proizvoda. Privredna komora Srbije (drugi kvartal, april – jun 2017), preuzeto sa: <https://usluge.pks.rs/portal/publikacije/441>
- PulseNet, (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, available at: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>
- Rabson AR, Hallett AF, Koornhof HJ. (1975). Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J Infect Dis.*;131(4):447-51. doi: 10.1093/infdis/131.4.447
- Rahikainen Ibañez T, Laukkanen-Ninios R, Hakkinen M, Johansson T, Vilar M, Korkeala H. (2016). Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Finnish Slaughter Pigs. *J Food Prot.*;79(4):677-81. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-389
- Rakin, A.; Garzetti, D.; Bouabe, H.; Sprague, L.D. (2015). *Yersinia enterocolitica*. In *Molecular Medical Microbiology*, 2nd ed.; Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., Schwartzman, J., Eds.; Academic Press: London, UK; Waltham, MA, USA; San Diego, CA, USA, Chapter 73; pp. 1319–1344
- RZS 2018. Statistički godišnjak republike Srbije (poglavlje Poljoprivreda). Republički zavod za statistiku 2018.
- Savin, C., Le Guern, A.-S., Lefranc, M., Brémont, S., Carniel, E., Pizarro-Cerdá, J., 2018. Isolation of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1B strain in France, and evaluation of its genetic relatedness to other European and North American biotype 1B strains. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0123-0>
- Schiemann DA. (1979). Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can J Microbiol.*;25(11):1298-1304. doi: 10.1139/m79-205
- Schleifstein J, Coleman M.B. (1939) An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and Past. Pseudotuberculosis, and pathogenic for man. *N.Y. State J Med.*; 39:1749–53.
- Schneeberger, M., Brodard, I., Overesch, G., (2015). Virulence-associated gene pattern of porcine and human *Yersinia enterocolitica* biotype 4 isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 198, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.029>

- Schoch CL, Ciufu S, Domrachev M, Hottel CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). Jan 1;2020:baaa062. doi: 10.1093/database/baaa062
- Shayegani M, Morse D, DeForge I, Root T, Parsons LM, Maupin PS. (1983). Microbiology of a major foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8. J Clin Microbiol. Jan;17(1):35-40. doi: 10.1128/jcm.17.1.35-40.1983
- Sihvonen LM, Haukka K, Kuusi M, Virtanen MJ, Siitonen A; YE study group. (2009) *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like species in clinical stool specimens of humans: identification and prevalence of bio/serotypes in Finland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Jul;28(7):757-65. doi: 10.1007/s10096-008-0696-y
- Sihvonen LM, Toivonen S, Haukka K, Kuusi M, Skurnik M, Siitonen A. (2011). Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility patterns in discrimination of sporadic and outbreak-related strains of *Yersinia enterocolitica*. BMC Microbiol. 25;11:42. doi: 10.1186/1471-2180-11-42
- Singh, I., Viridi, J.S., (2004). Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. J. Med. Microbiol. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45527-0>
- Skjerve E, Lium B, Nielsen B, Nesbakken T. (1998). Control of *Yersinia enterocolitica* in pigs at herd level. Int J Food Microbiol. Dec 22;45(3):195-203. doi: 10.1016/s0168-1605(98)00162-7
- SRPS EN ISO 10273:2017. Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje patogene *Yersinia enterocolitica*. Institut za standardizaciju Srbije. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- SRPS CEN ISO/TS 18867:2016. Mikrobiologija lanca hrane — Lančana reakcija polimeraze (PCR) za otkrivanje patogenih mikroorganizama u hrani — Otkrivanje patogenih *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis*
- D. Weagant D.S. (ret.) and P. Feng. (2017). Bacteriological Analytical Manual (BAM) Main Page, Chapter 8: *Yersinia enterocolitica*. U.S Food and Drug. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-8-yersinia-enterocolitica>
- Stern, N.J., Pierson, M.D., Kotula, A.W., (1980). Growth and competitive nature of *Yersinia enterocolitica* in whole milk. J. Food Sci. 45, 972–974
- Tennant SM, Grant TH, Robins-Browne RM. (2003). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 Sep 22;38(2):127-37. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00180-9

- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-9. doi: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995
- Urbano-Márquez A, Estruch R, Agustí A, Jimenez De Anta MT, Ribalta T, Grau JM, Rozman C. Infectious endocarditis due to *Yersinia enterocolitica*. *J Infect Dis.* 1983 Nov;148(5):940. doi: 10.1093/infdis/148.5.940
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Damme, I., Berkvens, D., Botteldoorn, N., Dierick, K., Wits, J., Pochet, B., & De Zutter, L. (2013). Evaluation of the ISO 10273:2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat. *Food microbiology*, 36(2), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.007>
- Van Damme, I., Berkvens, D., Vanantwerpen, G., Baré, J., Houf, K., Wauters, G., & De Zutter, L. (2015). Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with enteropathogenic *Yersinia* spp.: Distribution, quantification and identification of risk factors. *International journal of food microbiology*, 204, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.016>
- Van Damme, I., Habib, I., & De Zutter, L. (2010). *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. *Food Microbiology*, 27, 158–161. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.011>
- Vanantwerpen G, Van Damme I, De Zutter L, Houf K. (2014). Within-batch prevalence and quantification of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in tonsils of pigs at slaughter. *Vet Microbiol.* 14;169(3-4):223-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.12.019
- Vilar MJ, Virtanen S, Laukkanen-Ninios R, Korkeala H. (2015). Bayesian modelling to identify the risk factors for *Yersinia enterocolitica* contamination of pork carcasses and pluck sets in slaughterhouses. *Int J Food Microbiol.* Mar 16;197:53-7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.020
- Virtanen S, Salonen L, Laukkanen-Ninios R, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. (2012). Piglets are a source of pathogenic *Yersinia enterocolitica* on fattening-pig farms. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Apr;78(8):3000-3. doi: 10.1128/AEM.07805-11
- Virtanen, S., Salonen, L., Laukkanen, R., Hakkinen, M., & Korkeala, H. (2011). Factors related to the prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* on pig farms. *Epidemiology & Infection*, 139(12), 1919-1927. doi:10.1017/S0950268810003018
- Von Altrock A, Louis AL, Rösler U, Alter T, Beyerbach M, Kreienbrock L and Waldmann KH, (2006). The bacteriological and serological prevalence of *Campylobacter* spp. and

- Yersinia enterocolitica* in fattening pig herds in Lower Saxony. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 119 (9-10), 391-399.
- Wauters, G., Kandolo, K., & Janssens, M. (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contributions to microbiology and immunology*, 9, 14–21.
- Weber, A., and Knapp W. (1981). Detection of *Yersinia* and *Yersinia pseudotuberculosis* in faecal samples of healthy slaughter pigs in relation to season. *Zentralbl. Vet. Med. B* 28:407-413.
- Williamson DA, Baines SL, Carter GP, da Silva AG, Ren X, Sherwood J, Dufour M, Schultz MB, French NP, Seemann T, Stinear TP, Howden BP. (2016). Genomic Insights into a Sustained National Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Biol Evol.* Dec 1;8(12):3806-3814. doi: 10.1093/gbe/evw285
- Zdolec, N., & Kiš, M. (2021). Meat Safety from Farm to Slaughter—Risk-Based Control of *Yersinia enterocolitica* and *Toxoplasma gondii*. *Processes*, 9(5), 815. <https://doi.org/10.3390/pr9050815>
- Zhen S, Liu Y, Li X, Ge K, Chen H, Li C, Ren F. (2013). Effects of lairage time on welfare indicators, energy metabolism and meat quality of pigs in Beijing. *Meat Sci.* 2013 Feb;93(2):287-91. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.09.008
- Zielińska, D.; Ołdak, A.; Rzepkowska, A.; Kołożyn-Krajewska, D. (2015). Psychotrofy w chłodniczym przechowywaniu żywności. *Przem. Spoż.* 1, 18–22

BIOGRAFIJA

Miloš Arsić je rođen 26.8.1990. godine u Leskovcu. Osnovnu školu završio je u Bojniku, a srednju Poljoprivrednu školu smer veterinarski tehničar u Leskovcu. Prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2009/2010. godine. Integrisane osnovne i master akademske studije završio je jula 2015. godine. U periodu od 1.9.2015. do 31.8.2016. pripravnički staž obavljao je Veterinarskom specijalističkom institutu „Niš“ u Nišu. Od 1.09.2016. zaposlen je u Veterinarskom specijalističkom institutu „Niš“ na mestu višeg stručnog saradnika za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje. Doktorske akademske studije na Fakultetu Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2015/2016. godine. U junu 2016. godine završio je specijalizaciju iz oblasti mikrobiologije namirnica na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. U toku 2017. godine postavljen je na mesto saradnika za sistem menadžmenta kvalitetom. Početkom 2020. godine priključuje se Službi za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku Veterinarskog specijalističkog instituta „Niš“ i aktivno učestvuje na poslovima dijagnostikovanja virusa SARS-CoV2. Kao prvi autor ili koautor do sada je objavio dva rada u časopisima od međunarodnog značaja. Kao prvi autor ili koautor objavio je više radova na skupovima od nacionalnog značaja. Član je Veterinarske komore Srbije i Srpskog veterinarskog društva.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora **Miloš N. Arsić**

Broj indeksa **14/7**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**„IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA SOJEVA YERSINIA ENTEROCOLITICA
KOD SVINJA NA LINIJI KLANJA“**

- 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.

U Beogradu, _____

Potpis doktoradna

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Miloš N. Arsić**

Broj indeksa **14/7**

Studijski program **Doktorske akademske studije**

Naslov rada **„IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA SOJEVA YERSINIA ENTEROCOLITICA KOD SVINJA NA LINIJI KLANJA“**

Mentor 1: **Dr Neđeljko Karabasil, redovni profesor**

Mentor 2: **Dr Ljubiša Šarić, viši naučni saradnik**

Potpisani **Miloš N. Arsić,**

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.

U Beogradu, _____

Potpis doktoranda

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

**„IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA SOJEVA YERSINIA ENTEROCOLITICA KOD SVINJA NA LINIJI
KLANJA“**

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 poledini lista).

U Beogradu, _____

Potpis doktoranda

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

