# MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA SOJEVA Salmonella enterica SEROVAR Gallinarum IZDVOJENIH NA FARMAMA KOKOŠI NESILICA

**Medić, Maja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:880874

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

MAJA MEDIĆ

# MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA SOJEVA *Salmonella enterica* SEROVAR Gallinarum IZDVOJENIH NA FARMAMA KOKOŠI NESILICA

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

ZAVOD ZA BOLESTI PERADI S KLINIKOM

PREDSTOJNIK: izv. prof. dr.sc. Željko Gottstein

MENTOR: izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić
2. doc. dr. sc. Maja Lukač
3. izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

*Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Željku Gottsteinu na podršci i pomoći te stručnom vodstvu tijekom pisanja ovog rada.*

*Zahvaljujem asistentici Liči Lozici, dr. med.vet. na izdvojenom vremenu i strpljenju te pomoći pri izvođenju laboratorijskih postupaka.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima na neizmjernoj ljubavi i podršci tijekom cijelog studija.*

*Zahvaljujem Aleksandri i Niki što su bile uz mene kroz sve godine studiranja.*

# POPIS PRILOGA

## POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz PCR produkata dijela istraživanih uzoraka *S.* Gallinarum na gelu nakon razdvajanja postupkom elektroforeze.

Slika 2. Filogenetsko stablo istraživanih bakterijskih sojeva i preuzetih referentnih sekvenci. Analiza je izvedena korištenjem Maximum Likelihood metode i Jukes-Cantor modela u programu MEGA X.

## POPIS TABLICA

Tablica 1. Podrijetlo uzoraka korištenih u istraživanju.

**SADRŽAJ**

1. UVOD I PREGLED LITERATURE.....1

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA.....4

3. MATERIJALI I METODE.....4

3.1. Uzorci.....4

3.2. Izdvajanje DNK.....6

3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....6

3.4. Gel elektroforeza.....6

3.5. Izolacija i pročišćavanje DNK odsječaka.....7

3.6. Filogenetska analiza.....7

4. REZULTATI.....9

5. RASPRAVA.....10

6. ZAKLJUČCI.....12

7. LITERATURA.....13

8. SAŽETAK.....16

9. SUMMARY.....17

10. ŽIVOTOPIS.....18

## 1. UVOD I PREGLED LITERATURE

Rod *Salmonella* čine dvije vrste, od kojih samo podvrsta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* uzrokuje bolest u toplokrvnih organizama (GAST i PORTER, 2020.). Navedena podvrsta sadrži više od 2500 serovarova, te se za identifikaciju najčešće koriste metode antigenske tipizacije (GAST i PORTER, 2020.). Salmoneloze su jedna od tri najučestalije bakterijske zoonoze u svijetu, uz infekcije bakterijama roda *Campylobacter* spp. i *E. coli* (WHO, 2017.). Infekcije podvrstom *S. enterica* odgovorne su i za bolesti peradi koje uzrokuju značajne ekonomske gubitke na farmama peradi u mnogim zemljama, te zahtijevaju velike izdatke privatnih i javnih službi u testiranju i kontroli bolesti (GAST i PORTER, 2020.). Zaražena jata najvažniji su rezervoar salmonela koje se prenose kontaminiranom hranom na ljude (HSI i sur., 2015.; GREIG i RAVEL, 2009.). Smatra se da su kokošja jaja, te pileće i pureće meso najčešći izvor infekcije (WHO, 2017.; GREIG i RAVEL, 2009.).

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovarovi Gallinarum i Pullorum glavni su uzročnici dviju važnih bolesti peradi- tifusa i puloroze. Serovar Gallinarum je vrsno specifičan, stoga uzrokuje bolest samo kod peradi (SEO i sur., 2019.; SHIVAPRASAD i BARROW, 2013.). Oboljela perad pokazuju znakove teške infekcije sa sistemskim kliničkim znakovima, što može rezultirati visokim stopama mortaliteta i/ili morbiditeta u jatima peradi diljem svijeta (DE CARLI i sur., 2017.). Infekcija može biti i subklinička, pri čemu jedini simptomi mogu biti smanjen unos hrane i depresija (SHIVAPRASAD, 2000.). Tifus je akutna ili kronična septikemijska zarazna bolest kokoši i purana svih dobnih kategorija, no češće obolijevaju odrasle jedinke. Infekcija se širi vertikalnim i horizontalnim putem, a znakovi bolesti su vrlo nespecifični (GAST i PORTER, 2020.). Inkubacija može trajati od 3 do 20 dana, ali i nekoliko mjeseci. Od izraženijih simptoma javljaju se anoreksija, proljev, depresija i dehidracija. Smrt nastupa obično za 5 do

10 dana, te stopa mortaliteta varira 10-93 % (SHIVAPRASAD i BARROW, 2013.). Puloroza je također septikemijska bolest, posebice u mladih ptica, najčešće pilića i purića, koji se inficiraju vertikalno transovarijskim prijenosom. Simptomi su vrlo slični kao i kod tifusa, a stope mortaliteta mogu dosegnuti i 100 %. Pilići izleženi iz zaraženih jaja vale se već bolesni, ili obole nakon 1 do 2 dana. Opisana je i pojava sljepoće, oticanje zglobova, a u nekim slučajevima i šepavost (CVETNIĆ, 2008.). Od patomorfoloških promjena, lezije najčešće zahvaćaju slezenu, jetru i reproduktivni sustav. Slezena je često povećana, dok su na jetri prisutna fokalna žarišta nekroze i fibrinozne naslage. U mladih pilića može se javiti i miokarditis karakteriziran bijelim čvorićima, dok su uslijed kronične infekcije dišnog sustava pluća ispunjena eksudatom. Najčešće su lezije u odrasle peradi karakterizirane atretičnim folikulima, te kazeoznim sadržajem u folikulima i lumenu jajovoda. Degenerirani, diskolorirani folikuli često su pendulirajući, te može doći do njihovog odvajanja i smještanja u stijenku peritoneuma. Takve promjene dovode do razvoja fibrinoznog peritonitisa i perihepatitisa (SHIVAPRASAD i BARROW, 2013.). S obzirom na najveću učestalost promjena u reproduktivnom sustavu, u odrasle peradi obje bolesti se manifestiraju smanjenjem proizvodnje jaja, plodnosti, valivosti, te povećanjem mortaliteta (SHIVAPRASAD, 2000.).

Mnoga istraživanja upozoravaju na porast rezistencije *S.* Gallinarum na fluorokinolone i aminoglikozide (KANG i su., 2010.; SEO i sur., 2019.), koji se i u Hrvatskoj vrlo često koriste u terapiji oboljelih jata. Uz to, zabilježena je i rezistencija na amoksicilin, tetracikline, nitrofurane i sulfonamide (ZIAUL HAQUE i sur., 2021.; SEO i sur., 2019.; PARVEJ i sur., 2016.). Za sada još postoje učinkoviti lijekovi protiv puloroze i tifusa peradi, ali nijedan ne može ukloniti infekciju iz jata (SHIVAPRASAD i BARROW, 2013.). Nesavjesna primjena antibiotika može dovesti do horizontalnog širenja gena za rezistenciju i onemogućiti liječenje i uklanjanje uzročnika iz jata. Tifus i puloroza proširile su se diljem svijeta, te postale

endemične u zemljama s velikom proizvodnjom mesa peradi (SHIVAPRASAD, 2000.). Klinička slika i patomorfološke promjene vrlo često su nespecifične, stoga je postavljanje dijagnoze temeljeno na identifikaciji uzročnika nasađivanjem na hranjive podloge, te identifikaciji pomoću antigenske tipizacije i molekularne karakterizacije. Tradicionalna tipizacija salmonela vrši se na temelju White-Kauffmann-Le Minor metode, kojom se identificiraju somatski i flagelarni antigeni korištenjem specifičnih antiseruma (XIONG i sur. 2016.). S obzirom da je spomenuta metoda dugotrajna i skupocjena, u svakodnevnoj dijagnostici sve češće se koriste molekularne metode. Lančana reakcija polimerazom (eng. polymerase chain reaction, PCR) pokazala je veliki potencijal kao alat za identifikaciju uzročnika zahvaljujući svojoj visokoj specifičnosti i osjetljivosti. PCR metoda jednostavna je i brza tehnika, te se korištenjem specifičnih početnica može primjenjivati za identifkaciju različitih serovara *S. enterica* (KARNS i sur., 2015.). Jedna od takvih PCR metoda temelji se na detekciji *flh*B gena koji je sastavni dio sekrecijskog sustava flagela (MESHCHERYAKOV i sur., 2013.), te ima glavnu ulogu u regulaciji prometa proteina (HIRANO i sur., 1994.). Bakterijske flagele velike su i složene molekule građene s više od 30 različitih proteina. Većina vrsta *Salmonella* sadrži flagele i ima sposobnost pokretljivosti. Međutim, serovari Gallinarum i Pullorum dva su izuzetka jer su pokazali smanjenu pokretljivost i nedostatak flagela (HOLT i CHAUBAL, 1997.). Prema tome, *flhB* gen serovara Gallinarum i Pullorum možda sadrži neke specifičnosti koje se razlikuju od drugih serovara (XIONG i sur., 2016.).

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Hipoteza ovog istraživanja je da će se filogenetskom analizom sekvenci *flhB* gena dobiti uvid u heterogenost sojeva na farmama i njihovo moguće zajedničko podrijetlo.

Cilj rada je filogenetski analizirati i usporediti sojeve bakterije *Salmonella enterica* serovar Gallinarum na temelju sekvenci *flhB* gena.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Uzorci

U istraživanju su korištene čiste kulture 35 sojeva bakterije *Salmonella enterica* serovar Gallinarum iz zbirke Zavoda za bolesti peradi s klinikom. Sojevi su prethodno dobiveni izdvajanjem iz različitih organa lešina kokoši nesilica dostavljenih na patomorfološku pretragu u razdoblju od 2018. do 2020. godine. Za istraživanje je odabran jedan soj po kokoši. Svi uzorci su čuvani u Brain Heart Infusion bujonu (Oxoid, Basingstoke, Ujedinjeno Kraljevstvo) s dodatkom 50 %-tnog glicerola (Fagron Hrvatska d.o.o., Donja Zelina, Hrvatska) pri temperaturi od -20 ºC. Podrijetlo uzoraka opisano je u Tablici 1.

Tablica 1. Podrijetlo uzoraka korištenih u istraživanju.

| Farma | Jato | Dob (tj.) | Uzorak | Organ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 44 | 570 | jetra |
| | | | 573 | jetra |
| | | | 574 | jetra |
| | | | 576 | jetra |
| | | | 577 | jetra |
| | | | 581 | jetra |
| | 2 | -* | 996 | jetra |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | 1003 | jetra |
| | | | 1006 | jetra |
| | | | 1010 | peritoneum |
| | 3 | - | 1140 | jetra |
| | | | 1143 | peritoneum |
| | | | 1144 | jetra |
| | | | 1222 | jetra |
| | 4 | - | 1649 | folikuli |
| | | | 1650 | folikuli |
| | | | 1651 | folikuli |
| | | | 1652 | jetra |
| 2 | 5 | - | 1106 | folikuli |
| | | | 1107 | folikuli |
| | | | 1108 | folikuli |
| | | | 1109 | folikuli |
| | | | 1110 | jetra |
| | 6 | - | 1618 | jetra |
| | | | 1619 | jetra |
| | | | 1620 | jetra |
| | | | 1621 | jetra |
| | | | 1626 | jetra |
| | 7 | 23 | 1729 | jetra |
| | | | 1730 | jetra |
| | | | 1731 | jetra |
| | | | 1733 | jetra |
| | | | 1734 | jetra |
| 3 | 8 | 44 | 1719 | jetra |
| | | | 1723 | jetra |

*****nepoznato

### 3.2. Izdvajanje DNK

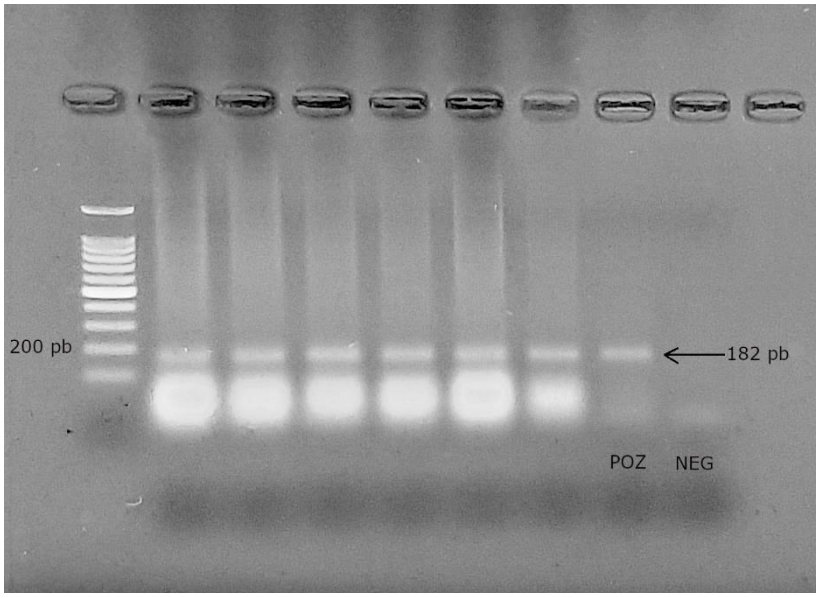
Odabrani sojevi nasađeni su na Nutrient agar (Oxoid, Basingstoke, Ujedinjeno Kraljevstvo) i Brilliant Green agar (Oxoid, Basingstoke, Ujedinjeno Kraljevstvo), te inkubirani aerobno 24 sata pri temperaturi od 37 ºC. Čiste kulture korištene su za izdvajanje DNK pomoću Chelex 100 (BioRad, Hercules, SAD) prema uputama proizvođača.

### 3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

U svakoj PCR reakciji korištene su specifične uzvodne (flhB-F: 5'-TTC GCG ACG AAT TTA AAG AGA GCG AAG-3') i nizvodne (flhB-R: 5'-CAG CGT TTA AGC TGC CAG ACC CAG GCC-3') početnice. Reakcijska smjesa sastojala se od 25 µl GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, SAD), 2 µl svake početnice, 5 µl DNK i 16 µl vode slobodne od nukleaza (Promega, Madison, SAD), te je ukupan volumen iznosio 50 µl. PCR reakcije izvedene su prema protokolu XIONG i sur. (2016.): aktivacija na 95 ºC 5 min, zatim 40 ciklusa: denaturacija na 95 ºC 45 sek, vezanje na 59 ºC 45 sek i elongacija na 72 ºC kroz 1 min.

### 3.4. Gel elektroforeza

Dobiveni PCR produkti vizualizirani su na 1%-tnom agaroznom gelu (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, SAD) primjenom Midori Green Advance boje (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Njemačka). Razdvajanje se izvodilo 45 minuta na 80 V i 60 mA, te je očekivana veličina umnožaka bila 182 pb (Slika 1).




Slika 1. Prikaz PCR produkata dijela istraživanih uzoraka *S.* Gallinarum na gelu nakon razdvajanja postupkom elektroforeze.

### 3.5. Izolacija i pročišćavanje DNK odsječaka

Izolacija i pročišćavanje DNK odsječaka iz agaroznog gela izvedeno je prema uputama proizvođača korištenjem ReliaPrep™ DNA Clean-up Concentration System (Promega, Madison, SAD) kita za prva 24 uzorka, te GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, SAD) za preostalih 11 uzoraka. Koncentracija DNK u svakom uzorku određena je korištenjem BioDrop uređaja (Biodrop Ltd., Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), nakon čega su uzorci sekvencirani Sangerovom (dideoksi) metodom (Macrogen Inc., Amsterdam, Nizozemska).

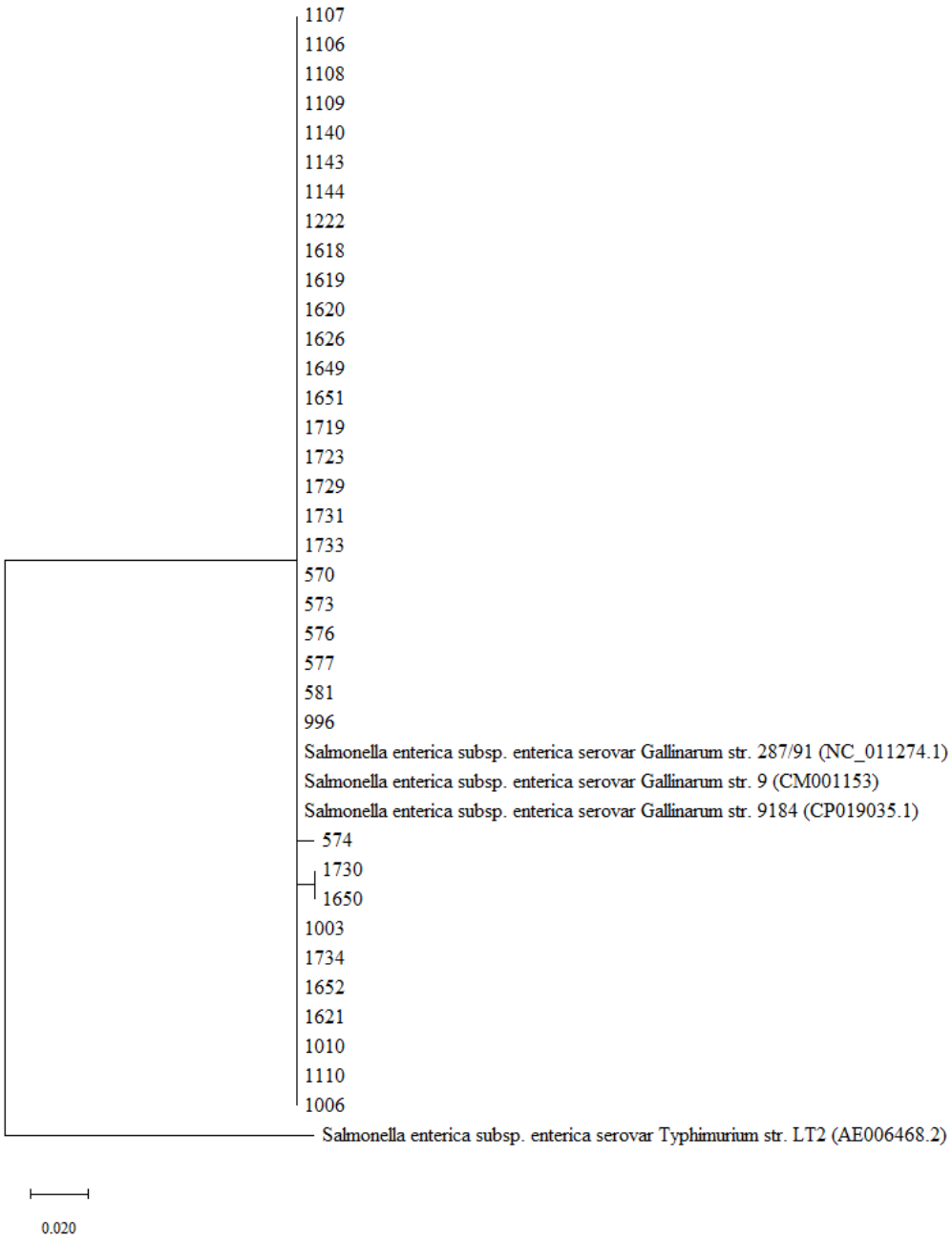
### 3.6. Filogenetska analiza

Dobivene sekvence obrađene su korištenjem programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3. (HALL, 1999.), nakon čega su sravnjene i dalje analizirane programom

Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) 10.0.5. (KUMAR i sur., 2018.). Filogenetska analiza sekvenci izvedena je Maximum Likelihood metodom i Jukes-Cantor modelom (JUKES i CANTOR, 1969.). Sekvence dostupne u bazi podataka GenBank-National Center for Biotechnology Information (NCBI), s oznakama CM001153, CP019035, NC_011274 i AE006468.2, korištene su kao referentne sekvence i outgrupa za izradu filogenetskog stabla.

## 4. REZULTATI

Rezultati filogenetske analize pokazali su izrazito visoku genetsku srodnost istraživanih sojeva (Slika 2), i međusobno i u odnosu na kontrolne sojeve, što ukazuje na nemogućnost praćenja heterogenosti sojeva na temelju sekvence *flhB* gena.




Slika 2. Filogenetsko stablo istraživanih bakterijskih sojeva i preuzetih referentnih sekvenci. Analiza je izvedena korištenjem Maximum Likelihood metode i Jukes-Cantor modela u programu MEGA X.

## 5. RASPRAVA

Salmoneloze su jedna od najčešćih bolesti koje se prenose hranom u ljudi (WHO, 2017.). Izvor tih bolesti je meso peradi, i to najviše piletina i puretina, zbog velike konzumacije tog mesa. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum uzrokuje bolest samo u peradi, ali se zbog novih smjernica k slobodnom držanju peradi sve češće javlja i na velikim proizvodnim sustavima. Naročito je česta na farmama konzumnih nesilica, jer pozitivan nalaz zakonski ne podliježe poduzimanju mjera suzbijanja, te takve farme postaju rezervoari u slučaju loših biosigurnosnih i zoohigijenskih mjera. Sve češće se objavljuju i pohranjuju novije sekvence bakterija, a korištenje komparativne genske analize postaje sve češće analizom novijih serovar-specifičnih gena (ZHAI i sur., 2014). *flhB* genu serovara Gallinarum odgovornom za tvorbu flagela nedostaje dio što je dovelo do gubitka mogućnosti kretanja bakterija, pa se temeljem dokaza kraćeg PCR produkta može razlikovati od drugih pokretljivih sojeva (XIONG, 2016). No, u ovom istraživanju analizirali smo sojeve serovara Gallinarum, da bi utvrdili da li se oni mogu međusobno razlikovati na temelju sekvenci *flhB* gena. Rezultati pokazuju da su sojevi veoma slični te su samo četiri, od ukupno 35 analiziranih sojeva, genetski različiti. S obzirom na funkciju i poziciju, istraživani gen se ne nalazi u varijabilnoj regiji genoma, stoga ne podliježe čestim mutacijama koje bi dovele do promjena u sekvenci i omogućile korištenje navedenog gena u istraživanju heterogenosti sojeva. Zbog pripadanja skupini konzerviranih gena, *flhB* gen moguće je koristiti za razlikovanje za perad specifičnih sojeva od ostalih serovara s flagelama, ali ne i za razlikovanje pojedinih sojeva unutar istog serovara.

ZHOU i suradnici (2020.) razvili su metodu za detekciju *S.* Gallinarum na temelju *cigR* gena koji kod biovarova *Gallinarum* i *Pullorum* ima deleciju koja omogućava razlikovanje od drugih serovara. Sličnu metodu razvili su XU i suradnici (2018.), koji su proveli istraživanje na temelju detekcije *ipaJ* gena i dokazali da je to brza, točna i pogodna metoda detekcije sojeva *S.* Pullorum i to sa 99,08 % osjetljivosti. Uz to, navedeni gen se može koristiti i za razlikovanje *S.*

Gallinarum i Pullorum. Iako nijedna od spomenutih metoda nije korištena za razlikovanje sojeva unutar serovara, možda bi filogenetska analiza kombinacijom više specifičnih gena, poglavito varijabilnih, pokazala bolje rezultate.

Zbog spomenutog širenja sojeva serovara Galinarum na farmama nesilica, na kojima može uzrokovati značajne gubitke uslijed mortaliteta i pada nesivosti, iznimno je važno moći dokazati navedene sojeve te ih lako razlikovati od ostalih serovara. No, također je važno razviti jednostavne metode detekcije i razlikovanja salmonela unutar serovara kako bi detaljno mogli pratiti i kontrolirati njihovo širenje na i između farmi, kao i gena zaslužnih za antimikrobnu rezistenciju između različitih serovara i bakterijskih vrsta.

## 6. ZAKLJUČCI

- Rezultati filogenetske analize pokazuju veliku sličnost između sojeva, te je teško procijeniti njihovu heterogenost.
- Zbog konzerviranosti *flhB* gena istraživanje genetske raznolikosti sojeva bakterije *Salmonella enterica* serovar Gallinarum je nepouzdano te može koristiti isključivo za brzo razlikovanje od drugih serovara.

## 7. LITERATURA


1. CVETNIĆ, S. (2008): Bijela griža pilića (puluroza) i tifus peradi. Bakterijske i gljivične bolesti životinja, Medicinska naklada, Zagreb, pp. 161-166.
2. DE CARLI, S., T. GRÄF, D. KIPPER, F. K. M. LEHMAN, N. ZANETTI, F. MABONI, SIQUEIRA, S. CIBULSKI, A. S, KAZANTZI FONSECA, N. IKUTA, V. R. LUNGE (2017): Molecular and phylogenetic analyses of *Salmonella* Gallinarum trace the origin and diversification of recent outbreaks of fowl typhoid in poultry farms. Vet. Microbiol. 212, 80-86.
3. GAST, R. K., R. E. PORTER Jr. (2020): *Salmonella* infection. In: Diseases of Poultry 14th ed. (D. E. Swayne, Ed.), Wiley-Blackwell, New Jersey, pp. 719-753.
4. GREIG, J. D., A. RAVEL (2009): Analysis of foodborne outbreak dana reported internationally or source attribution. Int. J. Food Microbiol. 130, 77-87.
5. HALL, T. A. (1999): Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 40, 95-98.
6. HIRANO, T., S. YAMAGUCHI, K. OOSAWA, S. AIZAWA (1994): Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 176, 5439–5449.
7. HOLT, P. S., L. H. CHAUBAL (1997): Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in Salmonella pullorum cultures, J. Clin. Microbiol. 35, 1016–1020.
8. HSI, D. J., E. D. EBEL, M. S. WILLIAMS, N. J. GOLDEN, W. D. SCHLOSSER (2015): Comparing foodborne illness risks among meat commodities in the United States. Food Control, 54, 353-359.
9. JUKES, T. H., C. R. CANTOR (1969): Evolution of protein molecules. In: Mammalian Protein Metabolism (H. N. Munro, Ed.), Academic Press, New York, pp. 21-132.

10. KANG, M. S., A. KIM, B. Y. JUNG, M. HER, W. JEONG, Y. M. CHO, J. Y. OH, Y. J. LEE, J. H. KWON, Y. K. KWON (2010): Characterization of antimicrobial resistance of recent Salmonella enterica serovar Gallinarum isolates from chickens in South Korea. Avian Pathol. 39(3), 201-205.
11. KARNS, J. S., B. J. HALEY, J. A. VAN KESSEL (2015): Improvements to a PCR-based serogrouping scheme for *Salmonella enterica* from dairy farm samples, J. Food Prot. 78, 1182–1185
12. KUMAR, S., G. STECHER, M. LI, C. KNYAZ, K. TAMURA (2018): MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35, 1547-1549.
13. MESHCHERYAKOV, V.A., C. S. BARKER, A.S. KOSTYUKOVA, F. A. SAMATEY (2013): Function of FlhB, a membrane protein implicated in the bacterial flagellar type III secretion system. PLoS ONE. 8(7), 1-13.
14. SEO, K. W., J. J. KIM, I. P. MO, Y. J. LEE (2019): Molecular characteristic of antimicrobial resistance of Salmonella Gallinarum isolates from chickens in Korea, 2014 to 2018. Poult. Sci. 98(11), 5416-5423.
15. SHIVAPRASAD, H. L. (2000): Fowl typhoid and pullorum disease. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 19(2), 405-424.
16. SHIVAPRASAD, H. L., P. A. BARROW (2013): Pullorum disease and fowl typhoid. In: Diseases of Poultry 13th ed. (D. E. Swayne, Ed.), Wiley-Blackwell, New Jersey, pp. 678-693.
17. WHO Regional Office for Europe (2017): The burden of foodborne diseases in the WHO European region. (https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/402989/50607-WHO-Food-Safety-publicationV4_Web.pdf)

18. XIONG, D., L. SONG, S. GENS, J. TAO, S. AN, Z. PAN, X. JIAO (2016): One-step PCR detection of Salmonella Pullorum/Gallinarum using a novel target: the flagellar biosynthesis gene flhB. Front. Microbiol. 7, 1863-1869.
19. XU, L., Z. LIU, Y. LI, C. YIN, Y. HU, X. XIE, Q. LI, X. JIAO (2018): A rapid method to identify Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Pullorum using a specific target gene ipaJ. Avian Pathol. 47(3), 238-244.
20. ZHAI, L., X. KONG, Z. LU, F. LV, C. ZHANG, X. BIE (2014): Detection of Salmonella enterica serovar Dublin by polymerase chain reaction in multiplex format. J. Microbiol. Methods. 100, 52-57.
21. ZHOU, Y.-Y., X.-I. KANG, C. MENG, D. XIONG, Y. XU, S.-Z. G., Z.-M. PAN, X.-A. JIAO (2020): Multiplex PCR assay based on the cigR gene for detection of Salmonella spp. and Salmonella Pulllorum/Gallinarum identification. Poul. Sci. 99(11), 5991-5998.

**MAJA MEDIĆ**

**Molekularna karakterizacija sojeva *Salmonella enterica* serovar Gallinarum izdvojenih na farmama kokoši nesilica**

## 8. SAŽETAK

Salmoneloze peradi jedna su od najčešćih bolesti na svijetu, koje se prenose hranom. No, one uzrokovane serovarom Gallinarum mogu prouzročiti velike ekonomske štete i gubitke isključivo u peradi. Zbog novih smjernica u proizvodnji peradi k slobodnom držanju na otvorenom, učestalost zaraze serovarom Gallinarum se povećava diljem svijeta. Može biti česta u jatima konzumnih nesilica koja mogu predstavljati rezervoar ovog patogena. Stoga je bitno provoditi redovitu kontrola te brzo i jednostavno moći dokazati i tipizirati patogen. U identifikaciji uzročnika, danas se najviše koristi molekularna metoda lančane reakcije polimerazom (PCR). U ovom radu proveli smo istraživanje na temelju *flhB* gena kako bi mogli dokazati patogen i pratiti njegovu heterogenost koristeći kombinaciju PCR metode i analize sekvenci njezinog produkta. Rezultati ukazuju na malu varijabilnost *flhB* gena među sojevima i nemogućnost praćenja heterogenosti sojeva na farmama temeljem sekvenci ovog gena. Zbog konzerviranosti *flhB* gena moguće ga je uspješno koristiti isključivo za razlikovanje od ostalih serovara salmonela.

**Ključne riječi:** *Salmonella*, Gallinarum, perad, PCR, *flhB*

**MAJA MEDIĆ**

**Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum isolated on laying hen farms**

## 9. SUMMARY

Salmonellosis is one of the most common food-borne diseases worldwide. However, infections caused by serotype Gallinarum cause problems only in poultry, and can lead to great economic losses. Due to novel guidelines for poultry husbandry that lead to free-range production, the infection with *S.* Gallinarum is becoming more frequent. It is often present on laying hen farms, which act as reservoirs of this pathogen. For that reason, it is very important to do regular monitoring and be able to quickly detect and identify the pathogen. Nowadays, polymerase chain reaction (PCR) is most frequently used for identification of the causative agent. In this study, we identified and compared *S.* Gallinarum strains based on the *flhB* gene, in order to investigate the variability of the strains. The research was done using the PCR method and phylogenetic analysis of the obtained *flhB* sequences. The results show that *flhB* gene is not variable enough to detect the heterogenicity of the studied strains on farms. Since it is highly conserved, it can be used only to differentiate *S.* Gallinarum from other serotypes.

**Key words:** *Salmonella*, Gallinarum, poultry, PCR, *flhB*

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15. veljače 1995. godine u Zagrebu. U rujnu 2001. godine upisala sam 1. razred OŠ Gustava Krkleca u Zagrebu. Obrazovanje nastavljam u 2. gimnaziji u Zagrebu, koju sam upisala u rujnu 2009. godine.

Fakultetsko obrazovanje započela sam u listopadu 2013. godine, kada sam upisala 1. godinu na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. Apsolvirala sam 2021. godine. Tijekom studija radila sam na više studentskih poslova, koliko su mi to dopuštale fakultetske obaveze. Akademske godine 2018./2019. bila sam predstavnica studenata 5. godine. U dvanaestom semestru odradila sam stručno – terensku praksu u veterinarskoj ambulanti Miki – vet i na taj način dobila uvid u rad sa kućnim ljubimcima te stekla određeno iskustvo u tom području veterinarske struke.

Govorim engleski i španjolski jezik.