

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/20



## ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1.Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	V4-1106
<b>Naslov projekta</b>	UGOTAVLJANJE IZVORA IN ŠIRJENJA L. MONOCYTOGENES V REJAH ŽIVALI IN PROIZVODNJI ŽIVIL ZA ZAGOTAVLJANJE VARNE HRANE
<b>Vodja projekta</b>	12682 Irena Zdovc
<b>Naziv težišča v okviru CRP</b>	1.02.02 Ugotavljanje izvora in širjenja L. monocytogenes v prehranski verigi za zagotavljanje varne hrane
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	1671
<b>Cenovni razred</b>	C
<b>Trajanje projekta</b>	10.2011 - 09.2014
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	1027 Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije 3334 NACIONALNI LABORATORIJ ZA ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.05 Zdravstveno varstvo živil živalskega izvora
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	07. Zdravje
<b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>	4 Kmetijske vede 4.03 Veterina

#### 2.Sofinancerji

Sofinancerji	
1.	Naziv
	Naslov

## B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### 3. Povzetek raziskovalnega projekta<sup>1</sup>

SLO

Bakterije iz rodu *Listeria* so ubikvitarni mikroorganizmi, ki so razširjeni povsod v naravi. Glavni rezervoar listerij so zemlja, rastline, krma in voda, lahko pa tudi okužene domače in divje živali ter ljudje. Za ljudi je patogena le *L. monocytogenes*, ki povzroča listeriozo. Odrasli zdravi ljudje zbolijo izjemoma, bolezen pa je pogostejša v dovzetnih populacijah, predvsem pri novorojenčkih in zelo majhnih otrocih, pri starejših ljudeh in ljudeh z oslabiljenim imunskim odzivom. *L. monocytogenes* med vsemi bakterijami, ki se prenašajo s hrano, povzroča največjo obolevnost in smrtnost, poleg tega pa je med vsemi nesporogenimi bakterijami najbolj odporna proti ekstremnim pogojem okolja. Zaradi odpornosti proti nizkim temperaturam, se lahko razmnožuje v vseh fazah hladne verige in pomeni veliko tveganje za kontaminacijo površin in živil.

Za človeka so najbolj nevarna živila, ki so namenjena uživanju brez predhodne termične obdelave. Hrana, ki vsebuje manj kot 100 cfu/g *L. monocytogenes*, sicer za odraslo zdravo populacijo ne pomeni večjega tveganja, vendar lahko ob neprimernem ravnanju z živilom, število bakterij močno naraste in tako živilo postane zdravju škodljivo.

Z namenom izolacije čim večjega števila različnih sevov *L. monocytogenes* smo odvzeli in preiskali 1540 vzorcev različnega izvora: človeka, živali, živil, hrane za živali, naravnega okolja in okolja predelovalne industrije. V okviru tega smo pridobili 203 izolate iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, živil in njihovih surovin, brisov površin in zraka v klavnicah, zemlje in površinskih vod ter gnoja, krme in silaže. Tipizacija izolatov je bila osnova za analizo poti in načinov prenosa *L. monocytogenes*.

Poleg klasičnega načina serotipizacije s komercialnimi antiserumi smo uporabili še genotipizacijski metodi, metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in subtipizacijsko metodo gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE). Domnevali smo, da bodo imele uporabljene tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih tipov, ki se pojavljajo v posameznem okolju, kar bi nam omogočalo identifikacijo prevladujočih tipov. Predvidevali smo tudi, da bodo tipi, ki jih najpogosteje ugotavljamo v živilih, identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh. Ugotovili smo, da sta serotipizacijski metodi primerljivi, a imata kot epidemiološko orodje omejeno vrednost, saj lahko večino kliničnih izolatov *L. monocytogenes* razvrstimo v serološke tipe 1/2a, 1/2b 1/2c ali 4b. Za uspešen epidemiološki nadzor ima večji pomen genotipizacijska metoda PFGE, ki smo jo uporabili za subtipizacijo listerij. Z njo smo uspeli potrditi hipotezo, da bodo imele naše uporabljene tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih podtipov, ki se pojavljajo v okolju. Hipoteze, da bodo podtipi, ki jih najpogosteje odkrijemo v živilih, identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh, pa nismo mogli v celoti potrditi.

ANG

*Listeria spp.* are ubiquitous microorganisms widespread in nature. Their main reservoirs are soil, plants, feed and water, but also infected domestic and wild animals and humans. The only species pathogenic for humans is *L. monocytogenes* which causes listeriosis. Healthy adults are rarely affected while certain populations, e.g. newborns, small children, aged people and immunocompromised persons, are more prone to disease. *L. monocytogenes* has the highest morbidity and mortality rates among all bacteria causing food-borne infections. In addition, it is the most resistant to extreme environmental conditions among all non-sporogenous bacteria. Due to its resistance to low temperatures it can multiply at all stages of cold chain and therefore represents a high risk for contamination of surfaces and food.

The highest risk for human health is represented by ready to eat food. Food containing less than 100 cfu/g of *L. monocytogenes* is not considered as a major risk for healthy adult population. However, inadequate treatment of food may lead to increased numbers of *L. monocytogenes*.

With the aim of the isolation of as many different strains of *L. monocytogenes* were taken analysed 1540 samples of different origins: human, animal, food, animal feed, the natural environment and environmental industries. In this context, we obtained 203 isolates from clinical samples of human and animal foodstuffs and food raw materials, swab surfaces and air in slaughterhouses, soil, surface water and manure, fodder and silage. Typing of the isolates was the basis for the analysis of routes and modes of transmission of *L. monocytogenes*.

To achieve this we used the traditional methods of serotyping, together with genotyping methods (PCR, PFGE). We hypothesized that the methods used will have sufficient power to determine the differentiation of different types that occur in a particular environment, which would allow us to identify any dominant types. We also assumed that the types that are most often found in foods are identical to the ones that most often cause clinical disease in humans. We found that the serotyping methods are comparable, but are both of limited value as an epidemiological tool, since the majority of clinical isolates of *L. monocytogenes* can be classified into serological types 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b. The genotyping method PFGE that we used to subtype *Listeria* was much better suited for a successful epidemiological surveillance. With it we were able to verify the hypothesis that our typing methods used will have sufficient power to determine the differentiation of different subtypes that occur in the environment. We were however unable to fully confirm the hypothesis that the subtypes most frequently detected in foods are identical to those that most often cause clinical disease in humans.

#### 4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu<sup>2</sup>

Osnovni namen naše raziskave je bil dobiti vpogled v problematiko listerioze na več različnih nivojih (okolje, živali, živila in ljudje). Izolati *L. monocytogenes*, ki smo jih pridobili pri proučevanju specifičnih okolij, so nam primarno služili za izvajanje ukrepov znotraj teh sistemov. Tipizacija in subtipizacija vseh tako pridobljenih izolatov pa nam je razkrila širše epizootiološke oz. epidemiološke zakonitosti širjenja *L. monocytogenes* med različnimi sistemi.

Uspelo nam je pridobiti izolate *L. monocytogenes* iz vseh rizičnih oz. najpogostejših mest, kjer listerije lahko vstopajo v prehransko verigo in povzročajo okužbe pri ljudeh. Spremljali in analizirali smo okužbe živali in ugotavljali poti prenosa *L. monocytogenes* iz primarne proizvodnje živali v predelavo živil. V obratih živilske industrije smo sistematično vzorčili in preiskovali kritična mesta, kjer lahko prihaja do zunanje in notranje kontaminacije obratov. Preiskovali smo vzorce v predelavi rdečega mesa, perutninskega mesa, mlečnih in ribjih izdelkov ter različnih živilsko predelovalnih obratov. Evidentirali smo najpogosteje kontaminirana živila in izvedli potrebne dodatne preiskave živil.

Iz 1540 vzorcev smo pridobili 203 izolate bakterije *L. monocytogenes*, ki smo jih dodali že obstoječi arhivski zbirki. Med izolati smo glede na poreklo izbrali 185 sevov *L. monocytogenes* in jih serotipizirali s klasično serološko metodo in z verižno reakcijo s polimerazo ter subtipizirali z metodo pulzne gelske elektroforeze. Namerno smo izbrali seve *L. monocytogenes*, ki so bili izolirani iz petih različnih okolij.

Največ izolatov *L. monocytogenes* smo pridobili iz vzorcev živil (64). Iz vzorcev živali smo pridobili 40 izolatov, iz vzorcev naravnega okolja 27, iz vzorcev klavnic pa 26 izolatov *L. monocytogenes*. Iz humanih vzorcev smo uspeli pridobiti 28 izolatov *L. monocytogenes*.

S pomočjo klasične serotipizacije nismo uspeli determinirati večje raznolikosti med 185 izolati *L. monocytogenes*, saj so izolati pripadali le štirim serološkim tipom: 1/2a (64,3 %), 4b (23,8 %), 1/2b (10,3 %) in 1/2c (1,6 %). Večina izolatov je pripadala serotipoma 1/2a in serotipu 4b, ki sta poleg serotipa 1/2b ugotovljena pri večini sporadičnih primerov in izbruhov listerioze po svetu. Serotipe 1/2a, 1/2b in 4b smo odkrili pri izolatih iz vseh petih okolij. Serotip 1/2c pa je bil prisoten le pri živilskih in humanih izolatih.

V vseh okoljih je bilo največ izolatov serotipa 1/2a, ki je izstopal predvsem med izolati iz klavnic ter živalskih in živilskih izolatih. Iz kliničnih vzorcev humanega izvora in iz vzorcev naravnega okolja pa je bilo število serotipov 1/2a in 4b bolj izenačeno, vseeno pa je prevladoval serotip 1/2a. V številnih novejših študijah so opazili, da se pri humanih kliničnih vzorcih vse pogosteje pojavlja serotip 1/2a in, da le ta počasi zamenjuje serotip 4b. Razlog za to je lahko dejstvo, da postaja sepsa pogostejša klinična oblika listerioze kot meningoencefalitis. Iz krvi pa pogosteje izoliramo serotipa 1/2a in 1/2b kot 4b. Pri vseh serotipiziranih izolatih *L. monocytogenes* je bilo dobro ujemanje seroloških tipov ugotovljenih s klasično serotipizacijo in z metodo PCR. Z izvedbo klasične serotipizacije nismo imeli nobenih težav, čeprav je znano, da je metoda dokaj subjektivna in da so v preteklosti ugotovili, da lahko pride med laboratoriji do številnih razlik v rezultatih. Glede na to, da je metoda PCR bistveno hitrejša in hkrati tudi bolj objektivna kot metoda klasične serotipizacije, bi lahko ta

počasi zamenjala klasično metodo.

Subtipizacijska metoda PFGE omogoča bistveno bolj občutljivo razlikovanje med posameznimi izolati *L. monocytogenes*. Z njo smo lahko ugotovili večjo raznolikost, porazdelitev in ekološko pripadnost bakterije *L. monocytogenes* v različnih okoljih, predvsem pa povezanost izolatov v primerih izbruhov. Rezultate smo analizirali s pomočjo računalniškega programa BioNumerics, ki omogoča medsebojno primerjavo pulzotipov in izdelavo dendrogramov. Naš kriterij za razvrščanje izolatov v podtipe je bila 80 % skladnost med pulzotipi.

Nekatere pulzozkupine so bile dokaj homologne glede prevladujočega serotipa in vrste okolja. V pulzozkupini **A**, ki je vključevala največje število izolatov (26) in 16 podtipov, so bili prisotni izolati *L. monocytogenes* iz vzorcev tkiva živali, živil, naravnega okolja, klavnic in človeškega tkiva. Prevladovali so izolati iz tkiv živali in iz živil. Izolati so pripadali serološki skupini 4b in 1/2b.

V pulzozkupini **B**, ki je vključevala 25 izolatov, so bili zajeti izolati iz vseh okolij, z izjemo humanih izolatov. Vsi izolati so imeli enak serotip 1/2a. Prevladovali pa so živalski in živilski izolati. Pulzozkupina **C** je vključevala 18 izolatov, od tega jih je bilo 11 iz vzorcev živil in vsi so imeli enak serotip (1/2a). Pulzozkupina **D** je edina, kjer so bili vključeni izolati kar treh različnih seroloških tipov, večina 4b, po en izolat pa 1/2a in 1/2b. Pulzozkupina je vključevala izolate iz vseh okolij razen živil. Pulzozkupine **E**, **F** in **G** so vključevale po 13, 12 in 11 izolatov in v vsaki so močno prevladovali izolati iz enega okolja. V pulzozkupini E so bili izolati *L. monocytogenes* iz klavnic, v primeru pulzozkupine F izolati iz živil, v pulzozkupini G pa izolati iz živalskega tkiva.

Na podlagi PFGE smo izolate razvrstili v filogenetske linije oz. skupine. V filogenetsko skupino I so uvrstili izolate s serotipi 1/2b, 3b, 4b, 4d in 4e, v filogenetsko skupino II pa izolate s serotipi 1/2a, 1/2c in 3a. Redko pa so prisotni izolati 4a in 4c, ki sodijo v filogenetsko skupino III.

Za PFGE uporabljali restriksijske encime *ApaI* treh različnih proizvajalcev in ugotovili, da to lahko vpliva na kvaliteto *ApaI* podtipov *L. monocytogenes*, kar smo opisali v posebnem prispevku.

Iz analize dendrograma PFGE sicer težko sklepamo o bistvenih povezavah med podtipi *L. monocytogenes* iz različnih okolij. V primerih listerioze pri živalih in ljudeh v Sloveniji smo z metodo PFGE lahko potrdili ali ovrgli identičnost povzročitelja, kar potrjuje našo hipotezo, da bodo imele uporabljene tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih podtipov, ki se pojavljajo v okolju. Problem se pojavi le v primerih, ko so izolati zelo podobni (vendar ne enaki) in je interpretacija odvisna od kriterijev, ki jih določimo za razlikovanje med izolati.

Na podlagi subtipizacije s PFGE smo ugotovili veliko raznolikost izolatov, ki pa so bili le v posameznih primerih značilni za določeno vrsto vzorca, zato hipoteze, da bodo podtipi, ki jih najpogosteje odkrijemo v živilih identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh, nismo mogli v celoti potrditi. Verjetno je razlog tudi v tem, da so bili številni izolati *L. monocytogenes* krajevno in časovno precej oddaljeni, pri številnih pa so nam manjkali tudi ključni epidemiološki podatki. Za potrditev te hipoteze bi bila potrebna skrbno načrtovana epidemiološka študija, ki bi zajela vse tipe vzorcev v določenem časovnem obdobju, kar pa bi bistveno povečalo stroške študije.

V analizo smo vključili tudi sedem izolatov *L. monocytogenes* iz surovega mleka. Kljub temu, da so bili izolati istega izvora, so se uvrstili v dve pulzozkupini, znotraj vsake pa so imeli izolati identičen restriksijski vzorec. V pulzozkupino B smo poleg izolatov iz surovega mleka uvrstili še sedem izolatov *L. monocytogenes* iz mleka krav ene izmed slovenskih kmetij. Štirje izmed teh izolatov so imeli enak restriksijski vzorec kot izolati iz surovega mleka, z ostalimi tremi pa je bila sorodnost 96,8 %. Zaradi tega obstaja velika verjetnost, da je izvor vseh vzorcev mleka isti. Vsi izolati so imeli tudi enak serotip (1/2a).

Med živilske izolate smo vključili tudi tiste, pri katerih smo predvidevali, da bodo imeli enak oz. zelo podoben restriksijski vzorec. Takih je bilo osem vzorcev mesnega pripravka istega proizvajalca. Vsi izolati so spadali v isto pulzozkupino (B), vendar pa med seboj niso bili popolnoma identični. Pet izolatov je imelo enak restriksijski vzorec, in le ta se je v 96,8 % ujema še z izolatom iz mešanega mletega mesa. Obstaja možnost, da je tudi mešano meso izviralno od istega proizvajalca. Ostali trije so imeli enak restriksijski vzorec kot izolat iz tkiva bezgavk srne. Slednje je nekoliko nenavadno, saj nismo našli nobene povezave med izolati. Analizirali smo tudi dva izolata iz mesnih pripravkov istega proizvajalca, ki nista imela identičnih restriksijskih vzorcev, a sta se uvrstila v isto pulzozkupino (F). Vsi pa so imeli enak serotip (1/2a).

### Epidemiološke povezave kliničnih izolatov

Z metodo PFGE ugotavljamo sorodnost med posameznimi izolati bakterij, kar je posebej primerno v primeru izbruhov ali epidemij, saj tako najlažje spremljamo širjenje okužb in neposredno povezavo med izolati. Leta 2013 je prišlo na eni izmed slovenskih kmetij do pojava listerioze pri več ovcah in kozah, od katerih jih je nekaj tudi poginilo. Poleg vzorcev različnih živalskih tkiv so bili odvzeti tudi vzorci naravnega okolja, voda iz domačega zajetja in silaža. Kar 11 vzorcev je bilo pozitivnih na *L. monocytogenes*. Vsi izolati so pripadali serotipu 1/2a in uvrstili smo jih v svojo pulzozkupino G. Od tega sem enak restriksijski vzorec, restriksijski vzorci ostalih treh izolatov pa so se le malo razlikovali. Podobnost med njimi je bila 95,2 % oz. 97,7 %.

V poletnih mesecih 2013 so v Sloveniji za listeriozo zboleli tudi trije ljudje. Zaradi tega je bila izvedena epidemiološka preiskava, v kateri so sodelovali tudi delavci medicinske in veterinarske stroke. Opravljeno je bilo epidemiološko poizvedovanje in vzorčenje različnih živil iz trgovin, kjer so bolniki kupovali hrano. Prisotnost listerij je bila ugotovljena v enem izmed mesnih izdelkov, ki ga sicer noben izmed bolnikov ni kupil, a ugotovljeno je bilo, da so v isti trgovini kupovali različne narezane salame. *L. monocytogenes* je bila izolirana tudi iz brisov površin. Vsi izolati *L. monocytogenes* so pripadali serotipu 1/2a. Uvrstili pa smo jih v dve pulzozkupini (Q in C). V pulzozkupino C smo uvrstili sedem od skupaj osmih izolatov. Dva humana izolata sta imela enak restriksijski vzorec, ki se le v manjši meri razlikoval od izolatov iz živil in brisov salamoreznic. Podobnost med obema genetskima skupinama je bila 96,2 %. V primerih, kjer je podobnost zelo velika, je odločitev o tem, ali gre za isti tip zelo težka in je odvisna od meril, ki jih določimo za interpretacijo. Po novejših priporočilih je razlika v enem pasu dovolj za razlikovanje med izolati. Tretji humani izolat se je uvrstil v drugo pulzozkupino (Q).

V analizo je bil vključen tudi izolat *L. monocytogenes* iz kožnih pustul veterinarja, ki se je okužil pri porodu mrtvorojenega telička. *L. monocytogenes* pa je bila izolirana tudi iz posteljice krave. Oba izolata sta imela enak serološki tip (4b), s pomočjo PFGE smo ju uvrstili v pulzozkupino A, v katero spadajo tudi vzorci nekaterih drugih izolatov živali in ljudi.

Z opravljeno študijo smo dobili odlične podatke o raznolikosti tipov *L. monocytogenes*. Na splošno je bila pri naših izolatih prisotna zelo velika raznolikost, saj je večina pulzozkupin (17) zelo majhnih in vsebujejo pet ali manj izolatov. Veliko (9) je tudi izolatov, ki jih nismo uspeli uvrstiti v nobeno izmed pulzozkupin. Za boljši epitootiološki pregled bi bilo potrebno izvesti študijo, kjer bi načrtno izbirali vzorce le v določenem časovnem obdobju na ožji lokaciji vzorčenja, po možnosti povezane s kliničnim primerom pri živalih in/ali ljudeh.. Ker pa je v Sloveniji primerov listerioze malo, bi bili pri pridobivanju takih izolatov zelo omejeni.

### 5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

Za pomoč pri ugotavljanju širjenja okužb uporabljamo različne metode tipizacije bakterijskih sevov. Hitro in učinkovito razlikovanje med sorodnimi bakterijskimi izolati je namreč izjemnega pomena za epidemiološki nadzor nalezljivih bolezni. V času epidemije je hitro ukrepanje nujno, s pomočjo tipizacije pa lahko identificiramo epidemiološko povezane izolate ter določimo rezervoar in poti širjenja okužbe.

Za serotipizacijo *L. monocytogenes* lahko uporabimo tako klasično metodo s pomočjo komercialnih antiserumov, kot tudi metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR), saj sta metodi primerljivi. Vendar pa je metoda PCR bistveno hitrejša in bolj objektivna od klasične serotipizacije, zato bi le ta lahko nadomestila klasično metodo. Glavni problem serotipizacijskih metod pa je njihova omejena vrednost za epidemiološko poizvedovanje. Večina humanih kliničnih in živalskih sevov vrste *L. monocytogenes* namreč sodi v 4 serološke tipe 1/2a, 1/2b, 1/2c in 4b. Prav zaradi tega nam serološke metode dajo preveč ohlapne podatke za iskanje poti širjenja okužb. Zaradi tega ima klasična serotipizacija le omejeno epidemiološko vrednost. Kot epidemiološko orodje je bistveno boljša metoda s pulzno gelsko elektroforezo (PFGE). Je namreč ena izmed najbolj ponovljivih molekularnih tipizacijskih metod z visoko ločljivostjo med posameznimi izolati, zato jo uporabljamo tudi za subtipizacijo listerij. Z njeno pomočjo namreč lahko ocenimo razlike oz. spremembe v genomih bakterijskih izolatov in tako določimo njihovo

medsebojno podobnost oziroma sorodnost. Prav to pa je ključno pri odkrivanju vira izbruha in poti širjenja okužbe pri pojavu epidemij. Bistveno težje pa najdemo kakšno podobnost oziroma sorodnost med izolati *L. monocytogenes*, ki so bolj krajevno in časovno razpršeni.

Uporaba metode PFGE ob izbruhih listerioze je zelo uspešna, saj omogoča ugotovitev vira kontaminacije oz. okužbe in spremljanja poti širjenja okužbe. V nedavnih primerih listerioze pri živalih in ljudeh v Sloveniji smo z metodo PFGE lahko potrdili ali ovrgli identičnost povzročitelja, kar potrjuje našo prvo hipotezo. Problem se pojavi le v primerih, ko so izolati zelo podobni (vendar ne enaki) in je interpretacija odvisna od kriterijev, ki jih določimo za razlikovanje med izolati.

Na podlagi subtipizacije s PFGE smo ugotovili veliko raznolikost izolatov, ki pa so bili le v posameznih primerih značilni za določeno vrsto vzorca, zato druge hipoteze nismo mogli v celoti potrditi. Verjetno je razlog tudi v tem, da so bili številni izolati *L. monocytogenes* krajevno in časovno zelo oddaljeni, pri številnih pa so nam manjkali tudi ključni epidemiološki podatki. Zaradi tega je bilo s pomočjo metode PFGE zelo težko najti podobnost in povezave med posameznimi subtipi. Za potrditev te hipoteze bi bila potrebna skrbno načrtovana epidemiološka študija, ki bi zajela vse tipe vzorcev v določenem časovnem obdobju.

#### 6.Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>4</sup>

Na projektu ni bilo sprememb programa ali sestave projektne skupine.

#### 7.Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>5</sup>

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	3713146	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Kožna listerioza pri veterinarju z dokazanim zoonotičnim prenosom
		ANG	Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission
	Opis	SLO	Opisan je primer kožne listerioze pri človeku. Po pomoči pri porodu mrtvorojenega teleta so se veterinarju na koži rok pojavile pustule, iz katerih je bila izolirana <i>L. monocytogenes</i> . Ista bakterija je bila izolirana tudi iz placente krave, na podlagi PFGE pa je bil dokazan prenos s krave na človeka. Po nam dostpnih podatkih je to prvi primer, kjer je bil prenos dokazan tudi z genotipizacijskimi metodami.
		ANG	A case of <i>Listeria monocytogenes</i> skin infection in a man is presented. Veterinary practitioner developed pustular changes on the skin of arms and hands after assisting with the delivery of a stillborn calf. <i>L. monocytogenes</i> was isolated from the skin lesions and from the bovine placenta. Isolates were serotyped and genotyped PFGE to confirm the suspected transmission of the pathogen from animal to human. To the best of our knowledge, this is the first case of cutaneous listeriosis in which the evidence for zoonotic transmission of <i>L. monocytogenes</i> is supported by genotyping methods.
Objavljeno v	Blackwell; Zoonoses and public health; 2014; Vol. 61, issue 4; str. 238-241; Impact Factor: 2.065; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.019; A': 1; WoS: NN, ZC; Avtorji / Authors: Zelenik Katja, Pate Mateja, Avberšek Jana, Lušicky Marija, Krt Branko, Ocepek Matjaž, Zdovc Irena		
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek		
2.	COBISS ID	3717498	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Reševanje slabe kvalitete pulzotipov ApaI ter kratek pregled PFGE protokolov za bakterije iz vrste <i>Listeria monocytogenes</i>
		ANG	Report on overcoming the poor quality of Apal pulsotypes with a short review on PFGE for <i>Listeria monocytogenes</i>
		Ker je listerioza, ki jo povzroča bakterija <i>Listeria monocytogenes</i> , ena izmed pomembnih izzivov za javno zdravje v Evropi, povezanih z alimentarnimi zoonozami, je za izvajanje epidemioloških študij potreben	



	Opis	SLO	učinkovit protokol za tipizacijo izolatov. V našem prispevku so kratko predstavljeni trije standardizirani protokoli PFGE, ki so na voljo za <i>L. monocytogenes</i> . Ker smo v našem laboratoriju naleteli na težave zaradi slabe kvalitete pulzotipov ApaI, smo primerjali encime treh različnih proizvajalcev ter glede na rezultate predlagali spremembo v postopku za restrikcijo.
		ANG	Since listeriosis, caused by <i>Listeria monocytogenes</i> , is one of the important concerns of public health in Europe related to foodborne zoonoses, an efficient protocol for isolate typing is necessary when performing epidemiological studies. In the present paper, three standardized PFGE protocols available for <i>L. monocytogenes</i> were briefly reviewed. Since observing a poor-quality of ApaI pulsotypes in our laboratory, enzymes from three different manufacturers were compared and modification of the restriction protocol was suggested according to the obtained results.
	Objavljeno v	Polskie Towarzystwo Mikrobiologów.; Polish Journal of Microbiology; 2013; Vol. 62, no. 3; str. 307-309; Impact Factor: 0.871; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.334; WoS: QU; Avtorji / Authors: Kušar Darja, Kavalič Maja, Ocepek Matjaž, Zdovc Irena	
	Tipologija	1.03 Kratki znanstveni prispevek	
3.	COBISS ID	3887226	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Izolacija listerij iz zraka v mesnopredelovalni industriji
		ANG	Isolation of airborne <i>Listeria</i> spp. in meat processing industry
Opis	SLO	<i>Listeria monocytogenes</i> in druge listerije se lahko preko mesa in mesnih izdelkov prenesejo na človeka. Posebno pozornost zahteva tudi možnost aerogene kontaminacije mesa in izdelkov z mikroorganizmi, ki tvorijo aerosol. V prispevku je opisana prisotnost listerij v bioaerosolu v zraku mesno predelovalnih obratov in pomen pravilne metodologije vzorčenja.	
	ANG	<i>Listeria monocytogenes</i> and other <i>Listeria</i> species can significantly affect the health of consumers transferring by meat and meat products. Special interest was emphasized due to the possibility of aerogene contamination of meat and products with microorganisms forming bioaerosol. In this paper the presence of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Listeria</i> spp and in bioaerosol in air of meat processing plants and the importance of selecting the appropriate sampling methods.	
Objavljeno v	Zadružna štampa; Meso; 2014; God. 16, br. 4; str. 366-369; Avtorji / Authors: Dobeic Martin, Zdovc Irena, Pintarič Štefan		
Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek		
4.	COBISS ID	3587194	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Naše izkušnje pri praktični uporabi nanomaterialov za razkuževanje površin
		ANG	Experiences regarding practical use of nano materials for disinfection of surfaces
Opis	SLO	Rezultati interdisciplinarnega projekta, Centra odličnosti NAMASTE so poskus sinteze, stabilnosti in površinske zaščite testnih steklenih in polietilenskih površin s titanatnimi nanocevkami in poskus baktericidne učinkovitosti na bakterije iz rodu <i>Listeria</i> v prehrabeni industriji. Poskusi v laboratoriju so pokazali na vsaj 35% znižanje <i>L. innocua</i> na steklenih površinah pod pogoji UV sevanja (350 Nm). Eksperiment v realnih razmerah v perutninskih klavnica pa je pokazal na več kot 2 log <sub>10</sub> zmanjšanje (99,22%) (povprečno 40-70%) testnih bakterij <i>L. innocua</i> na PE površinah osvetljenih zgolj s standardno fluorescentno svetlobo v obstoječih klimatskih pogojih.	
		The experiment of the synthesis and the coating stability of titanate nanotubes and the outcome experiment of their effects on <i>Listeria</i>	

		reduction in food plants are the results of an interdisciplinary project within the Centre of Excellence NAMASTE. Our experiments in laboratory conditions showed that at least 35% of tested close related nonpathogenic bacteria ( <i>L.innocua</i> ) were reduced on titanate nanotubes coated glass under the conditions of UV photo influenced excitation (350 nm). The experiment in real conditions that is in poultry slaughterhouse showed more than 2 log <sub>10</sub> (99.22%) (in average 40-70%) of test bacteria ( <i>L. innocua</i> ) reduction on the PE test slides coated by titanate nanotubes induced only by fluorescent light and existent air conditions.
	Objavljeno v	Srpsko veterinarsko društvo; Zbornik radova; 2012; Str. 203-207; Avtorji / Authors: Dobeic Martin, Pintarič Štefan, Zdovc Irena, Štrancar Janez
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
5.	COBISS ID	3854714 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Pojav prvega mecC-pozitivnega seva MRSA v človeških vzorcih v Sloveniji
		<i>ANG</i> Detection of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> carrying the mecC gene in human samples in Slovenia
	Opis	<i>SLO</i> V prispevku opisujemo pojav prvega mecC-pozitivnega seva MRSA, ki smo ga osamili pri bolnici, ki je bila hospitalizirana v severovzhodni regiji Slovenije. Z retrospektivno analizo smo v zbirki 395 sevov MRSA domačega okolja (CA-MRSA) dodatno dokazali še šest mecC-pozitivnih sevov MRSA. Sevi MRSA so pripadali tipom spa t843, t9397 in t10009, kar jih uvršča v sekvenčni tip ST130.
		<i>ANG</i> Following the recognition of a mecC MRSA isolate from a patient hospitalized in the northeast region of Slovenia, a national collection of 395 community-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (CA-MRSA) isolates from 2006 to 2013 was screened. An additional six mecC MRSA strains were found and characterized as spa types t843, t9397 and t10009, and multilocus sequence type ST130.
	Objavljeno v	Cambridge University Press; Epidemiology and infection; 2014; Vol. , No.; str. 1-4; Impact Factor: 2.491; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.984; WoS: NE, NN; Avtorji / Authors: Dermota Urška, Zdovc Irena, Štrumbelj Iztok, Grmek-Košnik Irena, Ribič Helena, Rupnik Maja, Golob Majda, Zajc Urška, Bes M., Laurent Frederic, Müller-Premru Manica
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

### 8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	3873914 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Epidemiološka in mikrobiološka preiskava listerijskih okužb v zdravstveni regiji Novo mesto v letu 2013
		<i>ANG</i> Epidemiological and microbiological investigation of <i>Listeria</i> infections in health region Novo mesto
	Opis	<i>SLO</i> Opisan je primer preiskave več listerijskih okužb v regiji Novo mesto. Pri ugotavljanju potencialnega vira okužb so sodelovale različne zdravstvene in veterinarske ustanove. Na podlagi tipizacije izolatov z molekularnimi metodami je bilo ugotovljeno, da primerov ni mogoče zanesljivo povezati z živili živalskega izvora.
		An investigation of <i>Listeria</i> infections in the health region, Novo mesto are described. In determining a potential source of infection a variety of



		ANG	medical and veterinary institutions were involved. Based on the molecular typing of isolates it was found that the cases can not be reliably associated with food products of animal origin.
	Šifra	B.06	Drugo
	Objavljeno v	Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije; Enboz; 2014; št. 7; str. 7-19; Avtorji / Authors: Košir Marta, Trkov Marija, Zdovc Irena	
	Tipologija	1.04	Strokovni članek
2.	COBISS ID	3914106	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Izbruh listerioze na farmi - celovit pristop k odkrivanju vira okužbe
		ANG	Outbreak of listeriosis on a farm – an integral approach to detection of infection source
	Opis	SLO	V prispevku opisujemo izbruh listerioze na kmetiji s približno 90 živalmi (ovcami, kozami, kravo s teličkom in nekaj konji). V maju 2013 je poginilo šest živali: dve ovci, dva jagenjčka, ena koza in en kozliček. Glede na anamnezo in rezultate genotipizacije, pa tudi glede na dejstvo, da so se po izpustu na pašo in prenehanju krmljenja s silažo pogini končali, smo zaključili, da je bila za pogine v hlevu najverjetneje kriva kontaminirana silaža. Raziskava izbruha je dober primer uporabnosti tipizacijskih metod v epizootiološke namene.
		ANG	Herein, we describe an outbreak of listeriosis on a farm with approximately 90 animals (sheep, goats, a cow with a calf and a few horses). According to the anamnesis and genotyping results and according to the fact that the deaths ceased after the animals started grazing and feeding with silage stopped, we concluded that contaminated silage was the source of infection. This outbreak investigation is a good example of the usefulness of typing methods for epizootiological purposes.
	Šifra	F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov
	Objavljeno v	Veterinarska fakulteta; 5. Slovenski veterinarski kongres 2014; 2014; Str. 87-88; Avtorji / Authors: Golob Majda, Pate Mateja, Avberšek Jana, Mijovič Aljoša, Pintarič Štefan, Pirjevec Jasna, Zdovc Irena	
	Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
3.	COBISS ID	3522170	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Verjetnost kontaminacije rdečega mesa iz zraka z bakterijami vrste <i>Listeria monocytogenes</i> v klavnični industriji
		ANG	Likelihood of contamination of red meat from the air by bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> in meat industry
	Opis	SLO	Avtor je ugotavljal prisotnost bakterij iz rodu <i>Listeria</i> na površinah opreme in prostorov v treh klavnicah za rdeče meso. Z uporabo izvirne metode vzorčenja zraka je ugotovil, da se listerije lahko prenašajo tudi po zraku in določil najbolj pogosta mesta aerogene kontaminacije.
		ANG	The presence of <i>Listeria</i> on surfaces of equipment and facilities in three slaughterhouses for red meat was investigated. Using the original air sampling method was found that <i>Listeria</i> can also be transmitted through the air and it was determined the most common sites of air contamination.
	Šifra	D.09	Mentorstvo doktorandom
	Objavljeno v	[E. Kenda]; 2012; 111 f.; Avtorji / Authors: Kenda Edvard	
	Tipologija	2.08	Doktorska disertacija
4.	COBISS ID	3636090	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	RRP5 - bioaktivni, biokompatibilni in bioinertni materiali
		ANG	

		RRP5 - bioactive , biocompatible and bioinert materials
Opis	SLO	Nekateri člani projektne skupine so tudi člani centra odličnosti NAMASTE, kjer se ukvarjajo z razvojem nanomaterialov za baktericidne premaze. Njihovo učinkovitost proučujejo na bakteriji <i>Listeria innocua</i> , ki je nepatogena vrsta in lahko služi kot varen model za raziskovalno delo z listerijami.
	ANG	Some project team members are also members of the Centre of Excellence NAMASTE , which is engaged in the development of nanomaterials for bactericidal coating. Some project team members are also members of the Centre of Excellence NAMASTE , which is engaged in the development of nanomaterials for bactericidal coating . Their effectiveness in studying the bacterium <i>Listeria innocua</i> , which is non-pathogenic species and can serve as a safe model for research work with listeria .
Šifra	F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja
Objavljeno v	Ministrstvo za izobraževanje, znanost, kulturo in šport Republike Slovenije; 2013; Avtorji / Authors: Zdovc Irena, Dobeic Martin, Pintarič Štefan, Golob Majda	
Tipologija	3.15	Prispevek na konferenci brez natisa

## 9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>2</sup>

V času trajanja projekta smo v delo vključili tudi druge raziskovalce, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt. Tako so bile v tem času zaključene doktorska, magistrska in srednješolska naloga, pri katerih so kot mentorji ali somentorji sodelovali člani projektne skupine.

Edvard Kenda je leta 2012 zagovarjal doktorsko nalogo z naslovom Verjetnost kontaminacije rdečega mesa iz zraka z bakterijami vrste *Listeria monocytogenes* v klavnični industriji. Maja Kavalič le leta 2014 zagovarjala magistrsko nalogo z naslovom Tipizacija izolatov *Listeria monocytogenes* s klasično serološko metodo in PCR ter subtizacija s PFGE. V okviru raziskovalnega projekta je bila opravljena tudi odlično ocenjena projektna raziskovalna naloga, ki sta jo izvedli dijakinji Gimnazije in veterinarske šole. Teja Zalar in Lea Lucija Usenik sta izdelali alogo z naslovom Pojavnost bakterije *Listeria monocytogenes* v hladilnikih in molekularna subtizacija sevov.

Zaradi velike variabilnosti preiskovanih matrikov so bile potrebne tudi nekatere modifikacije metod. Zaradi tega so bile posredno ali neposredno vpeljane ali izboljšane posamezne diagnostične metode. Prilagodili smo postopek za izolacijo *L. monocytogenes* iz vode z modificiranim postopkom filtracije in postopek za izolacijo listerij iz zraka. Pri klasični serotipizaciji smo modificirali postopek določanja flagelarnih antigenov, pri metodi PFGE pa izboljšali postopek za določanje pulzotipov z ApaI.

Največji dosežek pa je bil izboljšanje obstoječega informacijskega sistema in podatkovnih baz, kar je bilo posebno očitno pri oblikovanju skupne arhivske zbirke *L. monocytogenes*. Zelo pomemben je bil delovni obisk dr. Benamina Felixa iz Evropskega referenčnega laboratorija (EU-RL) za *L. monocytogenes* (Anses, Paris), ki je s člani projektne skupine sodeloval pri oblikovanju enote evropske baze podatkov za epizootiološko spremljanje človeških, živalskih in drugih sevov *L. monocytogenes* v evropskem in tudi širšem prostoru.

## 10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>3</sup>

### 10.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>2</sup>

SLO

V okviru projekta smo pridobili številne nove informacije in znanstvena spoznanja o pojavnosti, številu in lastnostih izolatov *L. monocytogenes* iz človeka, živali, živil, hrane za živali, naravnega okolja, okolja predelovalne industrije in iz posameznih delov prehranske verige. Pri tem so sodelovali raziskovalci iz vseh sodelujočih skupin in se ob tem dodatno izpopolnjevali in

usposabljali. Rezultati preiskav so bili posredovani partnerjem na projektu, strankam, od katerih smo pridobili vzorce oz. izolate *L. monocytogenes*, širši strokovni javnosti in pristojnim upravnim službam. Podatki so bili posredovani v obliki seminarjev, permanentnih izobraževanj, strokovnih posvetovanj in objav v domači in tuji strokovni literaturi.

V okviru projekta je nastala velika arhivska zbirka listerij (predvidvamo, da je največja v Sloveniji in verjetno tudi širše), za katero kažejo veliko zanimanje druge raziskovalne institucije, med njimi tudi Kemijski inštitut v Ljubljani, kjer proučujejo različne faktorje patogenosti (hemolizini, listeriolizin). Preliminarno testiranje 20 arhivskih izolatov *L. monocytogenes* je bilo opravljeno v okviru naloge mlade raziskovalke Sare Primec (mentor G. Anderluh), nadaljnje raziskovanje pa bo odvisno od uspešnosti pridobitve ustreznega financiranja.

Zdravniki, veterinarji praktiki, patologi in epidemiologi medicinske in veterinarske stroke se zanimajo za rezultate naše raziskave, da bi lažje ovrednotili razmere, kjer je pričakovati večje tveganje za okužbe z *L. monocytogenes*. Poleg tega so zelo zainteresirani za uporabo diagnostičnih metod, ki omogočajo zanesljive rezultate v čim krajšem možnem času.

Izboljšave oz. modifikacije različnih diagnostičnih metod bodo uporabne tudi za raziskovalce v drugih laboratorijih. Prilagodili smo postopek za izolacijo *L. monocytogenes* iz vode, s katerim bomo lahko preiskovali tudi vzorce nižje koncentracije listerij. Postopek za izolacijo listerij iz zraka pa bo primeren predvsem za proučevanje kontaminacije v prostorih živilsko predelovalne industrije.

Zelo smo poenostavili postopek določanja flagelarnih antigenov v postopku klasične serotipizacije. Postopek je krajši, cenejši in bolj zanesljiv kot standardni, zato omogoča bolj učinkovito delo v raziskovalnih in rutinskih laboratorijih. Izboljšanje metode PFGE pa pomeni tudi poenostavitev postopka za določanje pulzotipov z ApaI.

Člani projektne skupine so tudi ustanovni člani Centra odličnosti NAMASTE, v okviru katerega proučujejo učinek nano materialov na preživetje listerij v naravnem okolju in v okoljih živilsko predelovalne industrije. Preko tega centra, ki ima sedež na Inštitutu Jožef Štefan, zelo dobro sodelujejo s številnimi partnerji z različnih področij industrije.

ANG

In the scope of the project, many new information and scientific knowledge on the incidence, number and characteristics of *L. monocytogenes* isolates, originating from humans, animals, food, animal feed, natural environment, environment of the food processing plants and from different segments of the food chain, were gained. Researchers from all the participating groups were involved, and were additionally educated and trained. The results of the research were forwarded to the project partners, clients from whom the samples or isolates of *L. monocytogenes* were obtained, broader professional community and to the relevant administrative departments. The data were transmitted in the form of seminars, permanent trainings, professional consultations and publications in Slovene or international scientific literature.

The project has created a large archive collection of listeriae (assumed to be the largest in Slovenia and probably beyond), for which great interest is shown by the other research institutions, including the National Institute of Chemistry in Ljubljana where different factors of pathogenicity (hemolysins, listeriolysin) are studied. A preliminary testing of 20 archival isolates of *L. monocytogenes* was performed in the context of the work by a young researcher Sara Primec (mentor G. Anderluh), but further research will depend on the success of obtaining adequate financing.

Physicians, veterinary practitioners, pathologists and epidemiologists of the medical and veterinary profession are showing interest for the results of our research to help them evaluate the conditions, where greater risk for the infection with *L. monocytogenes* is expected. In addition, they are very interested in the use of diagnostic methods which allow reliable results in the shortest possible time.

Improvements or modifications of various diagnostic methods will also be useful for the researchers from other laboratories. The procedure for the isolation of *L. monocytogenes* from the water was adapted, which will enable the investigation also of the samples with lower concentration of listeriae. In addition, the procedure for the isolation of listeriae from the air will be particularly suitable for the investigation of contamination in the areas of the food processing industry.

In the process of classical serotyping, the procedure for the determination of flagellar antigens

was very simplified. It is shorter, cheaper and more reliable in comparison to the standard procedure; therefore it enables more efficient work in the research and routine laboratories. In addition, the improvement of PFGE method leads toward the simplification of the procedure for determination the ApaI pulsotypes.

Members of the project group are also the founding members of the Centre of Excellence NAMASTE, within which the effect of nano materials on the survival of listeriae in the natural environment and in the environment of the food processing plants is studied. Through this center, headquartered at the Institute Jozef Stefan, a very good cooperation with many partners from various sectors of the industry is achieved.

## 10.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Nova znanja in uporaba sodobnih diagnostičnih metod, ki smo jih vpeljali v okviru projektnega dela, so se izkazali za nepogrešljive predvsem v primerih večjih povezanih okužb (izbruhih) z *L. monocytogenes* pri živalih in ljudeh. Na podlagi tipizacije s PFGE smo pomagali pri ugotavljanju virov okužb in predlagali ukrepe za preprečevanje nastanka novih okužb. Pri tem je bila izjemno pomembna uskladitev metodologije v medicinskih in veterinarskih laboratorijih, ki je nujna zaradi tipizacije izolatov za potrebe epidemioloških raziskav.

Rezultati so izjemno pomembni za nosilce dejavnosti kmetijske in živilsko predelovalne stroke, saj lahko okužba živali ali kontaminacija živil z listerijami povzroči zelo veliko ekonomsko in zdravstveno škodo.

Diagnostični laboratoriji (predvsem laboratoriji regionalnih enot NVI) kažejo zanimanje za posredovanje protokolov validiranih postopkov za izolacijo, identifikacijo in tipizacijo *L. monocytogenes*.

Na podlagi ocene stanja glede pogostnosti pojavljanja *L. monocytogenes* v izbranih vzorcih, smo sodelovali pri pripravi izboljšanja tehnologij v smeri večje varnosti živil.

Rezultati projekta kažejo smernice, kako zmanjšati kontaminiranost živil živalskega izvora z listerijami in povečati osveščenost oz. znanje potrošnikov v smeri varnejše priprave hrane, kar bo imelo vpliv na varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva.

Ker smo *L. monocytogenes* izolirali tudi iz številnih vzorcev divjih živalih (srne, jeleni, lisice), se za naše rezultate zelo zanimajo tudi lovci. Skupaj z njimi smo že opravili testiranje divjadi v spomladanskem času, podobno akcijo pa načrtujemo tudi v jesenskih mesecih. Zanimajo se predvsem za ovrednotenje nevarnosti okužb divjih živali z ostanki živalske hrane na kmetijah. Prav tako pa je potrebno raziskati ali obstaja verjetnost, da kolonizirana divjad lahko kontaminira kmetijske površine in tako posredno tudi domače živali in kmetijske pridelke.

ANG

New knowledge and the use of modern diagnostic methods, which were introduced in the scope of the project work, have proven to be indispensable, especially in the cases of larger interconnected infections (outbreaks) with *L. monocytogenes* in animals and humans. On the basis of PFGE typing, the support was given when identifying the sources of infection and the measures for preventing the emergence of new infections were suggested. For this, the harmonization of methodology in medical and veterinary laboratories was extremely important as being necessary for the typing of isolates in the epidemiological studies.

The results are extremely important for the corporations of agricultural and food processing profession as the infection of animals or contamination of foods with listeriae cause a very large economic and health damage.

Diagnostic laboratories (mainly of the regional units of NVI) are showing interest for forwarding the protocols of validated procedures for the isolation, identification and typing of *L. monocytogenes*.

Based on the assessment of the situation regarding the frequency of occurrence of *L. monocytogenes* in the selected samples, we participated in the preparation of improvements of the technologies aiming for the greater food safety.

The results of the project are suggesting the guidelines how to decrease the contamination of the foods of animal origin with listeriae and how to raise awareness or knowledge of the

consumers toward the safer preparation of food, which will impact the protection of health and the improvement of healthcare.

Since *L. monocytogenes* was isolated also from numerous samples of the wild animals (roe deer, red deer, foxes), hunters are very interested in our results. In a common action, the testing of game in the spring time was already performed, and a similar action is planned for the autumn months. The main interest is for the evaluation of risk to infect game with the remains of animal feed on the farms. It is also necessary to investigate whether it is possible that the colonized game can contaminate the agricultural land and thus, indirectly, also the domestic animals and crops.

## 11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

### 11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

**Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?**<sup>11</sup>

Poleg financerjev so se za naše rezultate zanimale tudi druge raziskovalne ustanove, predvsem Inštitut Jožef Stefan in Kemijski inštitut v Ljubljani. Naše je bilo zelo pomembno za nosilce dejavnosti kmetijske in živilsko predelovalne industrije, s stališča moderne metodologije pa tudi za diagnostične laboratorije, predvsem laboratorije regionalnih enot NVI. Med uporabniki storitev pa še zdravniki, veterinarji praktiki, patologi in epidemiologi medicinske in veterinarske stroke ter lovci.

### 11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih
- pri mednarodnih uporabnikih

**Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:**<sup>12</sup>

Evropski referenčni laboratorij (EU-RL) za *L. monocytogenes* v Parizu, ki preverja usposobljenost pooblaščenih laboratorijev za diagnostiko *L. monocytogenes* in tipizacijo izolatov s klasično in molekularno tipizacijo ter subtipizacijo s PFGE.

Tuji strokovnjaki so udeleženi v vseh postopkih pri preverjanju zagotavljanja kakovosti s področja diagnostike *L. monocytogenes*, kjer kot zunanji eksperti vsako leto potrdijo ustreznost delovanja laboratorijev VF/NVI v skladu s standardom ISO 17025.

**Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:**<sup>13</sup>

Novembra 2013 je bila članica projektne skupine na usposabljanju za molekularno tipizacijo *L. monocytogenes* z metodo PFGE v referenčnem laboratoriju EU-RL za *L. monocytogenes* v Parizu (ANSES Maisons-Alfort Laboratory for Food Safety).

Maja 2014 je bil na 4-dnevem delovnem obisku na VF dr. Benjamin Felix iz EURL za *L. monocytogenes*. Sodeloval pri oblikovanju enotne baze podatkov za epizootiološko spremljanje človeških, živalskih in drugih sevov *L. monocytogenes* v evropskem in tudi širšem prostoru. Prisotna je bila tudi vodja hrvaškega NRL za *L. monocytogenes*, zaradi poenotenja diagnostike *L. monocytogenes* na Hrvaškem veterinarskem inštitutu v Zagrebu z laboratoriji v Sloveniji. Prejeli smo vabilo dr. Benjamin Felixa (EU-RL), da bi zbirko izolatov *L. monocytogenes* vključili v dva evropska projekta. Prvi bi potekal v okviru Evropske agencije za varno hrano (EFSA),

drugi za sekvenciranje izolatov v okviru raziskovalnega dela Evropske komisije Horizon 2020.

## 12. Izjemni dosežek v letu 2014<sup>14</sup>

### 12.1. Izjemni znanstveni dosežek

Pripravili smo članek, ki je bil objavljen v ugledni znanstveni reviji. Opisan je primer kožne listerioze pri človeku, kar je po podatkih iz literature dokaj redek primer. *L. monocytogenes* je bila izolirana iz pustularnih sprememb na koži veterinarja, ki so se razvile po tem, ko je ta pomagal pri porodu mrtvorojenega telička. *L. monocytogenes* pa je bila izolirana tudi iz posteljice krave. Izolata sta bila s pomočjo PFGE uvrščena v isto pulzoskupino in sta imela enak serološki tip (4b). Med restrikcijskima vzorcema je bila 99,3% podobnost. ZELENIK, Katja, PATE, Mateja, AVBERŠEK, Jana, LUŠICKY, Marija, KRT, Branko, OCEPEK, Matjaž, ZDOVC, Irena. Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission : a case report. *Zoonoses and public health*, ISSN 1863-1959. [Print ed.], 2014, vol. 61, issue 4, str. 238-241.

### 12.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Opravili smo prvo fazo priključitve baze podatkov Nacionalnega referenčnega laboratorija (NRL), ki vsebuje rezultate tipizacij *L. monocytogenes*, k bazi Evropskega referenčnega laboratorija. Le- ta je vzpostavil centralno bazo in omogočil izmenjavo rezultatov v celotni mreži NRL-jev, kar je ključnega pomena za učinkovito obravnavo izbruhov okužb pri ljudeh. NRL-ji morajo svoje nacionalne baze prilagoditi formatu baze EURL, za kar smo na NVI izvedli preliminarno usposabljanje, ki ga je vodil dr. Benjamin Felix. Za vse nadaljnje aktivnosti v tej smeri pa morajo vpletene pristojne ustanove podpisati sporazum o sodelovanju, v katerem so natančno določeni tudi pogoji glede objave podatkov iz baze EURL. S podpisom sporazuma ima NRL neomejen dostop do baze podatkov EURL, kar je pomembno pri rutinskem in raziskovalnem delu, saj lahko tako izvajajo primerjave verodostojnih podatkov, kar pomeni večjo preglednost in zanesljivost rezultatov na nacionalni in evropski ravni.

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

**Podpisi:**

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
raziskovalne organizacije:*

in

*vodja raziskovalnega projekta:*

Univerza v Ljubljani, Veterinarska  
fakulteta

Irena Zdovc

**ŽIG**

Kraj in datum:

Ljubljana

13.3.2015

**Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/20**



Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>4</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta.

Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

<sup>6</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta.

Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>8</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

<sup>9</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>14</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu.

Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2015 v1.00

F1-2F-EA-B6-46-55-25-4A-D0-78-1F-CE-05-2D-BC-1F-D6-D1-BD-39

# UGOTAVLJANJE IZVORA IN ŠIRJENJA *L. MONOCYTOGENES* V REJAH ŽIVALI IN PROIZVODNJI ŽIVIL ZA ZAGOTAVLJANJE VARNE HRANE

## DETECTION OF SOURCES AND SPREADING OF *L. MONOCYTOGENES* IN ANIMAL HOLDINGS AND FOOD PRODUCTION PLANTS FOR FOOD SAFETY ASSURANCE

Zdovc I, Avberšek J, Biasizzo M, Dobeic M, Golob M, Jakovac Strajn B, Kavalič M, Kirbiš A, Krt B, Kušar D, Mičunovič J, Ocepek M, Paragi M, Pate M, Pintarič Š, Rupel T, Starič J, Trkov M, Vadnjal S, Zajc U, Zelenik K.

Ključne besede: *Listeria monocytogenes*; tipizacija; klasična serotipizacija; molekularna tipizacija; PCR, PFGE

### POVZETEK

Bakterije iz rodu *Listeria* so ubikvitarni mikroorganizmi, ki so razširjeni povsod v naravi. Glavni rezervoar listerij so zemlja, rastline, krma in voda, lahko pa tudi okužene domače in divje živali ter ljudje. Za ljudi je patogena le *L. monocytogenes*, ki povzroča listeriozo. Odrasli zdravi ljudje zbolijo izjemoma, bolezen pa je pogostejša v dovzetnih populacijah, predvsem pri novorojenčkih in zelo majhnih otrocih, pri starejših ljudeh in ljudeh z oslabljenim imunskim odzivom. *L. monocytogenes* med vsemi bakterijami, ki se prenašajo s hrano, povzroča največjo obolevnost in smrtnost, poleg tega pa je med vsemi nesporogenimi bakterijami najbolj odporna proti ekstremnim pogojem okolja. Zaradi odpornosti proti nizkim temperaturam, se lahko razmnožuje v vseh fazah hladne verige in pomeni veliko tveganje za kontaminacijo površin in živil.

Za človeka so najbolj nevarna živila, ki so namenjena uživanju brez predhodne termične obdelave (RTE-ready to eat). Hrana, ki vsebuje manj kot 100 cfu/g *L. monocytogenes*, sicer za odraslo zdravo populacijo ne pomeni večjega tveganja, vendar lahko ob neprimernem ravnanju z živilom, število bakterij močno naraste in tako živilo postane zdravju škodljivo. Kontaminirana živila je potrebno umakniti iz prodaje, kar povzroča tudi veliko gospodarsko škodo.

Z namenom izolacije čim večjega števila različnih sevov *L. monocytogenes* smo odvzeli in preiskali 1540 vzorcev različnega izvora: človeka, živali, živil, hrane za živali, naravnega okolja in okolja predelovalne industrije. V okviru tega smo pridobili 203 izolate iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, živil in njihovih surovin, brisov površin in zraka v klavnicah, zemlje in površinskih vod ter gnoja, krme in silaže. Tipizacija izolatov je bila osnova za analizo poti in načinov prenosa *L. monocytogenes*.

Poleg klasičnega načina serotipizacije s komercialnimi antiserumi smo uporabili še genotipizacijski metodi, metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in subtipizacijsko metodo gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE). Domnevali smo, da bodo imele uporabljene fenotipske in genotipske tipizacijske metode zadostno moč

razlikovanja za določitev različnih tipov, ki se pojavljajo v posameznem okolju, kar bi nam omogočalo identifikacijo morebitnih prevladujočih tipov. Predvidevali smo tudi, da bodo tipi, ki jih najpogosteje ugotavljamo v živilih, identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh. Ugotovili smo, da sta serotipizacijski metodi primerljivi, a imata kot epidemiološko orodje omejeno vrednost, saj lahko večino kliničnih izolatov *L. monocytogenes* razvrstimo v serološke tipe 1/2a, 1/2b 1/2c ali 4b. Za uspešen epidemiološki nadzor ima večji pomen genotipizacijska metoda PFGE, ki smo jo uporabili za subtipizacijo listerij. Z njo smo uspeli potrditi hipotezo, da bodo imele naše uporabljene tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih podtipov, ki se pojavljajo v okolju. Hipoteze, da bodo podtipi, ki jih najpogosteje odkrijemo v živilih, identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh, pa nismo mogli v celoti potrditi.

Key words: *Listeria monocytogenes*; typing; classical serotyping; molecular typing; PCR, PFGE

## ABSTRACT

*Listeria spp.* are ubiquitous microorganisms widespread in nature. Their main reservoirs are soil, plants, feed and water, but also infected domestic and wild animals and humans. The only species pathogenic for humans is *L. monocytogenes* which causes listeriosis. Healthy adults are rarely affected while certain populations, e.g. newborns, small children, aged people and immunocompromised persons, are more prone to disease. *L. monocytogenes* has the highest morbidity and mortality rates among all bacteria causing food-borne infections. In addition, it is the most resistant to extreme environmental conditions among all non-sporogenous bacteria. Due to its resistance to low temperatures it can multiply at all stages of cold chain and therefore represents a high risk for contamination of surfaces and food.

The highest risk for human health is represented by ready to eat food. Food containing less than 100 cfu/g of *L. monocytogenes* is not considered as a major risk for healthy adult population. However, inadequate treatment of food may lead to increased numbers of *L. monocytogenes*. Contaminated food has to be withdrawn from retail which causes huge economic losses.

With the aim of the isolation of as many different strains of *L. monocytogenes* were taken analysed 1540 samples of different origins: human, animal, food, animal feed, the natural environment and environmental industries. In this context, we obtained 203 isolates from clinical samples of human and animal foodstuffs and food raw materials, swab surfaces and air in slaughterhouses, soil, surface water and manure, fodder and silage. Typing of the isolates was the basis for the analysis of routes and modes of transmission of *L. monocytogenes*.

To achieve this we used the traditional methods of serotyping, together with genotyping methods (PCR, PFGE). We hypothesized that the methods used will have sufficient power to determine the differentiation of different types that occur in a particular environment, which would allow us to identify any dominant types. We also assumed that the types that are most often found in foods are identical to the ones that most often cause clinical disease in humans. We found that the serotyping methods are comparable, but are both of limited value as an epidemiological tool, since the majority of clinical isolates of *L.*

*monocytogenes* can be classified into serological types 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b. The genotyping method PFGE that we used to subtype *Listeria* was much better suited for a successful epidemiological surveillance. With it we were able to verify the hypothesis that our typing methods used will have sufficient power to determine the differentiation of different subtypes that occur in the environment. We were however unable to fully confirm the hypothesis that the subtypes most frequently detected in foods are identical to those that most often cause clinical disease in humans.

## 1. OPIS PROBLEMA

*Listeria monocytogenes* je za človeka patogena bakterija. Povzroča različne bolezni, od gripi podobne bolezni do spontanega splava pri nosečnicah ter do sepse in smrtno nevarnega meningoencefalitisa pri dojenčkih in imunsko oslabeledih ljudeh. Do okužbe ljudi najpogosteje pride ob zaužitju živil, kontaminiranih z *L. monocytogenes*. Okužbe ljudi in živali niso pogoste, vendar je bolezen lahko huda in med obolelimi povzroča veliko smrtnost. Prav zaradi visoke umrljivosti prištevamo v industrializiranih državah *L. monocytogenes* med najpomembnejše bakterije, ki se prenašajo s kontaminirano hrano (Vazquez-Boland in sod., 2001; Painter in Slutsker, 2007).

*L. monocytogenes* namreč uspešno raste pri širokem razponu temperatur (tudi pri temperaturah hladilnika), sposobna je preživetja pri večjem razponu pH vrednosti, prav tako pa lahko preživi zelo slane pogoje. Zaradi tega jo lahko izoliramo iz veliko različnih živil, tako živalskega kot rastlinskega izvora, ter iz že obdelanih živil in surovin (Khelef in sod., 2006; Lado in Yousef, 2007; Griffiths, 2003; Norton in Braden, 2007).

Različne metode tipizacije bakterijskih sevov so orodje za iskanje poti širjenja bakterij in posledično vira okužbe ali kontaminacije. Hitro in učinkovito razlikovanje med sorodnimi bakterijskimi izolati je namreč izjemnega pomena za epidemiološki nadzor nalezljivih bolezni. V času epidemije je hitro ukrepanje nujno in s pomočjo tipizacije lahko identificiramo epidemiološko povezane izolate in določimo rezervoar ter poti širjenja okužbe (van Belkum in sod., 2007).

Metodi za serotipizacijo listerij sta klasična serološka tipizacija s pomočjo komercialnih antiserumov in serotipizacija z verižno reakcijo s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction - PCR). Večina človeških kliničnih in živilskih sevov vrste *L. monocytogenes* sodi v serološke tipe 1/2a, 1/2b 1/2c ali 4b. Zaradi tega ima serotipizacija, kot epidemiološko orodje, omejeno vrednost (van Belkum in sod., 2007; Gasanov in sod., 2005; McLauchlin in sod., 2004).

Za subtipizacijo listerij uporabljamo pulzno gelsko elektroforezo (ang. Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE), ki je ena izmed najbolj ponovljivih molekularnih tipizacijskih metod z visoko ločljivostjo. Z njeno pomočjo namreč lahko ocenimo razlike oz. spremembe v genomih bakterijskih izolatov in tako določimo njihovo medsebojno podobnost oziroma sorodnost. Metoda PFGE za namene epidemioloških študij velja za zlati standard za odkrivanje s hrano povezanih bakterijskih patogenov, vključno z *L. monocytogenes* (van Belkum in sod., 2007).

V Sloveniji smo doslej uradno analizirali le vzorce živil (monitoring zoonoz), medtem ko se aktivno spremljanje prisotnosti *L. monocytogenes* pri živalih izvaja le v primerih, ko želimo ugotoviti poti širjenja okužbe pri živalih in ljudeh ali vir kontaminacije. Prav tako smo imeli v preteklosti malo podatkov o izvoru in načinih širjenja bakterije *L. monocytogenes* v različnih okoljih predelovalne industrije. Za ugotavljanje vira okužbe je

potrebno tipizirati in primerjati seve, ki so izolirani v različnih okoljih, pri živalih, v predelovalni industriji, v živilih in pri ljudeh. Klasični načini serotipizacije so premalo občutljivi, zato je nujna uporaba modernejših metod za molekularno serotipizacijo (PCR) in molekularno subtipizacijo (PFGE). Z uporabo teh metod je mogoče spremljati širjenje bakterije v vseh fazah prehranske verige, od hleva do predelovalnega obrata oz. živilskega izdelka in končno do človeka.

## 2. KRATEK POVZETEK KLJUČNIH UGOTOVITEV IZ LITERATURE

Bakterije iz rodu *Listeria* so ubikvitarni mikroorganizmi, ki so razširjeni povsod v naravi. Glavni rezervoar listerij so zemlja, rastline, krma in voda, lahko pa tudi okužene domače in divje živali ter ljudje. Za ljudi je patogena le *L. monocytogenes*, ki povzroča listeriozo. Odrasli zdravi ljudje zbolijo izjemoma, bolezen pa je pogostejša v dovzetnih populacijah, predvsem pri novorojenčkih in zelo majhnih otrocih, pri starejših ljudeh in ljudeh z oslabljenim imunskim odzivom. *L. monocytogenes* med vsemi bakterijami, ki se prenašajo s hrano, povzroča največjo obolevnost in smrtnost, poleg tega pa je med vsemi nesporogenimi bakterijami najbolj odporna proti ekstremnim pogojem okolja. Zaradi odpornosti proti nizkim temperaturam se lahko razmnožuje v vseh fazah hladne verige in pomeni veliko tveganje za kontaminacijo površin in živil.

Za človeka so najbolj nevarna živila, ki so namenjena uživanju brez predhodne termične obdelave (RTE-ready to eat). Hrana, ki vsebuje manj kot 100 cfu/g *L. monocytogenes*, sicer za odraslo zdravo populacijo ne pomeni večjega tveganja, vendar lahko ob neprimernem ravnanju z živilom število bakterij močno naraste in tako živilo postane zdravju škodljivo. Kontaminirana živila je potrebno umakniti iz prodaje, kar za pridelovalce pomeni tudi veliko gospodarsko škodo.

### 2.1 *Listeria monocytogenes* in listerioza

#### 2. 1.1. Podatki o povzročitelju

Listerije so kratke, po Gramu pozitivne paličke (0,4 do 0,5  $\mu\text{m}$  široke in 0,5 do 2  $\mu\text{m}$  dolge). So fakultativni anaerobi in bolje rastejo v prisotnosti 10%  $\text{CO}_2$ . Imajo encim katalazo, nimajo pa oksidaze, hidrolizirajo eskulin, tolerirajo 10% NaCl v gojišču in so gibljive. V rodu *Listeria* je sedem vrst, ki jih razvrščamo v dve večji skupini:

- *L. murrayi* in *L. grayi* sta nehemolitični in nepatogeni, izoliramo pa jih zelo redko.
- *L. monocytogenes* in *L. ivanovii* sta hemolitični in patogeni za živali; *L. monocytogenes* je patogena tudi za ljudi. Obe sta sorodni z vrstami *L. seeligeri*, *L. innocua* in *L. welscheimeri*, ki pa jih ne uvrščamo med patogene.

Patogene listerije se lahko prebijejo skozi epitelno bariero prebavil in se razmnožujejo v makrofagih jeter in vranice s pomočjo hemolizina listeriolizina O. Drugi način okužbe je prehod skozi poškodovane površine sluznic, preko končičev trigeminalnega živca (*n. trigeminus*) do centralnega živčnega sistema. Znano je, da mnoge patogene bakterije potrebujejo za svoj metabolizem razpoložljiv vir železa. Visoka vsebnost železa v silaži vpliva na dobro preskrbljenost s tem elementom v tkivih ovc in goveda, ki pogosto uživajo

silazo. Zato je mogoče to eden izmed dodatnih predispozicijskih faktorjev, ki vplivajo na večjo pogostnost obolenja pri prežvekovalcih.

**2.1.2. Listerioza pri ljudeh** je najpogosteje posledica okužb s kontaminirano hrano, predvsem z mehкими siri, mlekom in drugimi mlečnimi izdelki, perutninskim mesom in zeljno solato. Bolezen se lahko kaže s podobnimi znaki kot gripa (oteženo dihanje in gibanje, povečana telesna temperatura), pri nosečih ženskah pa se okužba lahko razširi na plod, kar lahko povzroči abortus oz. rojstvo mrtvega otroka. Živčna oblika bolezni se lahko razvije pri novorojencih in pri odraslih s slabo imunsko sposobnostjo. Posebej so ogroženi veterinarji in delavci na klavnicah, pri katerih lahko pride do lokalne okužbe preko ran (Zelenik s sod., 2013). Kožna oblika se lahko razvije tudi v generalizirano, ki je lahko usodna.

**2.1.3 Listerioza pri živalih** je opisana pri zelo različnih vrstah, mnoge med njimi so asimptomatski prenašalci *L. monocytogenes* v blatu. Od domačih živali najpogosteje obolevajo ovce, govedo in koze, redkeje pa piščanci, konji, prašiči itd. Listerioza se pojavlja tudi med ljubiteljskim vrstami živali, predvsem pri kuncih in glodalcih (činčile, budre, gerbili), pri katerih so bile listerije tudi prvič opisane.

Večina okužb je sicer subkliničnih, sporadično pa živali lahko zbolijo z izrazitimi kliničnimi znaki. Izjemoma se bolezen lahko pojavi v obliki endemij ali celo epidemij, navadno z živčnimi znaki in posledičnim poginom (Zdovc s sod., 2004, Pirš s sod., 2005) Število primerov listerioze pri domačih živalih narašča povsod po svetu. Na področjih, kjer bolezen ni potrebno prijavljati, ni mogoče natančno spremljati števila primerov in načina širjenja bolezni. V čredi, kjer so vse živali izpostavljene istemu viru okužbe (npr. kontaminirana krma), navadno zbolijo le 5-10% živali, druge so verjetno naravno odporne.

Listerioza se pogosteje pojavlja pozno jeseni, pozimi in zgodaj spomladi. Na pojav bolezni vplivajo številni dejavniki, npr. stres (sprememba hrane, transport), druge bolezni, spremembe na zobovju, na sluznici prebavil itd. Pomembni so lahko dejavniki okolja, npr. vhljevanje novih živali, prenaseljenost, spremenjene oz. neugodne klimatske razmere (mraz, dolgo deževje, suša). Zanimivo je, da se v isti čredi lahko pojavijo različni serotipi *L. monocytogenes*.

Največji problem pojavljanja listerioze pri gospodarskih živalih (predvsem pri govedu in drobnici) je posredna nevarnost za zdravje ljudi, saj uživanje njihovih proizvodov (npr. surovega mleka) predstavlja najbolj pogost način okužb ljudi z listerijami. Na Danskem so v raziskavi s serotipizacijo ugotovili, da so vsi goveji izolati spadali v serološko skupino 1, kateri je pripadalo tudi 63 % človeških izolatov, medtem ko je ostalih 37 % izolatov pripadalo serološki skupini 4.

Listerioza pri prašičih je razmeroma redka, vendar so po nekaterih podatkih prašiči lahko pomemben rezervoar za okužbo z *L. monocytogenes*.

Listerioza pri perutnini je prav tako redko opisana, vendar so v okuženih jatah lahko pomembni asimptomatski prenašalci listerij. V posameznih rejah perutnine je okuženih lahko tudi več kot 30% piščancev, najverjetneje pa se okužijo s kljuvanjem po kontaminirani zemlji, iztrebkih in poginjenih živalih. Perutnina lahko predstavlja vir okužbe za druge domače živali. Veliko večji problem predstavlja **kontaminacija perutninskega mesa** z listerijami. Vzrok za to je le delno povezan z okuženimi živalmi;



bolj verjetna je naknadna kontaminacija mesa med klanjem in pripravo za trg. Znani so primeri okužb ljudi s premalo toplotno obdelanim perutninskim mesom.

#### **2.1.4 Odpornost listerij v naravnem okolju**

Na preživetje bakterij vplivajo številni dejavniki, proti katerim so listerije bistveno bolj odporne, kot večina drugih bakterij (Scot, 2000).

Temperatura. *L. monocytogenes* raste v širokem temperaturnem razponu med 0 - 45 °C. Nekateri avtorji za spodnjo mejo rasti in razmnoževanja navajajo celo temperaturo -1°C ali manj. Najugodnejše se listerije razmnožujejo med 30 in 37 °C. Podatki o temperaturni toleranci listerij se pri različnih avtorjih precej razlikujejo. Za razliko od večine ostalih zastrupljevalcev živil, se listerije pri temperaturah hladilnika še vedno uspešno razmnožujejo, poleg tega pa so ugotovili, da se virulentnost *L. monocytogenes*, ki se razmnožuje pri nižjih temperaturah, poveča. V zamrznjenih živilih listerije preživijo dolgo, preživetje pa je odvisno od hitrosti zamrznitve, temperature in fizikalnih lastnosti živila. Po navedbah raziskovalcev se število listerij po nekaj tednih zamrzovanja, pri - 18 °C, ne zmanjša bistveno. Izsledki raziskav preživetja *L. monocytogenes* pri višjih temperaturah so različni. Nekateri sevi so odpornejši in 5-minutno segrevanje pri temperaturi 63 °C ali 1-minutno segrevanje pri 80 °C, za razliko od drugih sevov, listerije preživijo. Čas preživetja listerij je tudi pri visokih temperaturah odvisen od živila in njegove sestave. V mesu je listerija zaradi nižje vodne aktivnosti ( $a_w$ ) ter zaščitnega delovanja maščob v mesu bolj obstojna kakor v mlečnih izdelkih. *L. monocytogenes* ugodno raste v pH območju med 5,6 in 9,6. Najboljše razmere za njeno rast pa so v nevtralnem ali rahlo alkalnem mediju.

Slanost. Listerije se lahko razmnožujejo pri koncentraciji NaCl do 10 %. Na čisti soli lahko preživijo do 150 dni, pri nižjih temperaturah in enaki stopnji slanosti pa celo dlje.

Vodna aktivnost. Za rast *L. monocytogenes* je najugodnejša  $a_w$  okrog 0,97. Za razliko od večine drugih patogenih mikrobov, se razmnožuje še pri vrednosti do 0,92. V fermentiranih salamah z  $a_w$  0,79 – 0,86, kljub 5-7 % NaCl in dodani nitritni soli ter nizkemu pH (4,3 – 4,5) pri 4 °C, preživi vsaj 84 dni.

#### **2.1.5 Prisotnost *L. monocytogenes* v posameznih skupinah živil**

*L. monocytogenes* je pogosto prisotna v surovih živilih, tako rastlinskega, kot živalskega izvora, lahko pa se pojavlja tudi v že obdelanih živilih kot posledica naknadne kontaminacije. S pasterizacijo listerije sicer uničimo (Van der Veen S, 2009), vendar jih tudi v termično obdelanih živilih, zaradi kasnejših navzkrižnih kontaminacij, lahko pogosto izoliramo. Listerije so pogosto prisotne na površinah in napravah v živilskih obratih, kjer jih zaradi njihove odpornosti in sposobnosti tvorbe biofilma, kljub čiščenju in razkuževanju, težko uničimo (Jemmi T, 2006; Tompkin RB, 2002). Živila se lahko kontaminirajo v procesu obdelave, priprave oziroma manipulacije (npr. rezanje, mletje, dimljenje). Velikokrat pa do kontaminacije pride tudi doma (kontaminirane površine hladilnika, slaba termična obdelava, križanje čistih in nečistih poti, ipd.).

Ker je za določene proizvode težko zagotoviti popolno odsotnost listerij, je Evropska komisija z Uredbo 2037/2005 za nekatera živila določila najvišjo dovoljeno število *L. monocytogenes* (100 cfu/g) v času roka uporabnosti. Najbolj problematična so tista živila,

v katerih se listerije lahko razmnožujejo, jih shranjujemo v hladilniku dlje časa in se zaužijejo surova. Na razmnoževanje v živilih, poleg kombinacije teh dejavnikov, vpliva tudi kemijska sestava, dodane snovi, prisotna mikroflora ter atmosfera pakiranja. Živila lahko glede na njihovo kombinacijo fizikalnih in kemijskih lastnosti razdelimo na tista, v katerih se listerije razmnožujejo in tista, v katerih je razmnoževanje onemogočeno. Smatra se, da se listerije pri  $pH \leq 4,4$  ali  $a_w \leq 0,92$  ne razmnožujejo.

Mleko in mlečni izdelki. Listerije se lahko pojavljajo v širokem spektru mlečnih izdelkov, tako nefermentiranih kakor fermentiranih. Najbolj problematični so predvsem mehki siri, ki so izdelani iz surovega mleka, v zadnjem času pa predvsem surovo mleko, ki se prodaja preko mlekomatov. Povečana skrb zaradi pojavljanja listerij v mlečnih izdelkih je sledila izbruhu listerioze v ZDA (1983), ki so ga povezali z uživanjem pasteriziranega mleka. Leta 1985 je v ZDA, ob izbruhu listerioze, v kateri so se ljudje okužili s sirom zbolelo 300 ljudi, od tega jih je 85 umrlo. Mednarodne razsežnosti pa je problem dobil s pojavom obsežne zastupitve z mehkim sirom v Švici leta 1987. V vseh primerih je bila iz omenjenih živil izolirana *L. monocytogenes*. Zadnji odmevni izbruh listerioze je bil leta 2010 oz. 2011, ko je zaradi uživanja mehkih sirov (kvargljev) zbolelo večje število ljudi v Avstriji (25), Nemčiji (8) in na Češkem (1).

Meso in mesni izdelki. *L. monocytogenes* lahko najdemo v vseh vrstah mesa, večinoma na površini. Prisotnost v globini je verjetno posledica naknadne kontaminacije. Najpogosteje okužena živila so: tatarski biftek, zaseka, tlačanka in narezani mesni izdelki. *L. monocytogenes* se lahko razmnožuje tudi v vakuumsko pakiranih izdelkih in izdelkih, ki so pakirani v kontrolirani atmosferi. Piščančje meso se večinoma kontaminira med procesom predelave. V fermentiranih mesnih izdelkih, ki jim je dodana starterska kultura, število *L. monocytogenes* upade.

Jajčni izdelki. Iz celih jajc *L. monocytogenes* še ni bila izolirana, bila pa je izolirana iz razbitih jajc oziroma melanžev, verjetno zaradi naknadne kontaminacije. *L. monocytogenes* v surovih jajcih preživi, v kuhanih pa se tudi dobro razmnožuje.

Ribe in drugi morski sadeži predstavljajo možnost okužbe z *L. monocytogenes*, predvsem, ko gre za že pripravljena živila (npr. dimljeni losos). Povprečna kontaminacija morskih živil z *L. monocytogenes* je ocenjena na 4 %. Ker je bakterija do visoke slanosti tolerantna, je v morski vodi sposobna preživeti, vendar je tudi za prisotnost listerij v morskih živilih večinoma kriva naknadna kontaminacija.

V rastlinski hrani je bila *L. monocytogenes* ugotovljena na surovih paradižnikih, redkvicah, solati in na svežem sadju. Kontaminacija je pogostejša pri pakirani in mešani zelenjavi. Izbruhi, povezani s kontaminirano zelenjavo so redki, najodmevnejša je bila zastupitev v Kanadi leta 1981, kjer so kot vzrok zastupitve navedli kontaminirano solato iz zelja. Pri tem izbruhu je zbolelo 41 ljudi, 18 jih je za posledicami listerioze umrlo. S pakiranjem zelenjave v kontrolirani atmosferi, lahko podaljšamo obstojnost zelenjave, s tem pa omogočimo listerijam, da se v tem času razmnožijo, saj tovrstna atmosfera njihovega razmnoževanja ne zadrži.

Pripravljena hrana (»ready to eat« - RTE). V zadnjem času tako hrano uvrščamo med najbolj rizično, ker se pred zaužitjem običajno slabše termično obdela.

### 3. UPORABLJENE METODE DELA

#### 3.1. Vrste vzorcev in način vzorčenja

Z namenom izolacije čim večjega števila različnih izolatov *L. monocytogenes* smo odvzeli in preiskali 1540 vzorcev različnega izvora: človeka, živali, živil, hrane za živali, naravnega okolja in okolja predelovalne industrije. V okviru tega smo pridobili izolate iz kliničnih vzorcev ljudi in živali, izolate iz živil in njihovih surovin, izolate pridobljene iz brisov površin in zraka v klavnicah, izolate iz zemlje in površinskih vod ter gnoja, krme in silaže za prehrano živali. Vsi izolati so zbrani v interni zbirki, ki je nastala za potrebe našega raziskovalnega projekta, prispevali pa so jih partnerji z Veterinarske fakultete v Ljubljani, Inštituta za varovanje zdravja in Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor (zdaj Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano). Pri odvzemu vzorcev so sodelovali tudi pooblaščen veterinarji na terenu, v primeru pogina pa patologi Nacionalnega veterinarskega inštituta (NVI). Vzorce živil so prispevali tudi proizvajalci živil z namenom notranje kontrole (HACCP).

Izolacija, identifikacija in determinacija, ki temelji na standardu ISO11290-2:1998, je bila opravljena po protokolu Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Iz omenjenih vzorcev smo v letih 2010 do 2013 pridobili 203 izolate *L. monocytogenes*, ki so shranjeni na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete.

Iz kliničnih in patoloških vzorcev smo pridobili:

- izolate iz vzorcev možganskega tkiva (n= 19),
- izolate iz vzorcev fecesa (n= 8),
- izolate iz vzorcev mleka (n=7),
- izolat iz vzorca bezgavk (n=1),
- izolat iz vzorca jeternega tkiva (n=1),
- rektalne brise (n=3)
- izolat pridobljen iz vzorca abortiranega plodu (n=1).

Vzorci živil so bili pregledani na Inštitutu za higieno živil (IHŽ), v letih 2010 do 2013, iz katerih smo pridobili 64 izolatov:

- izolate iz vzorcev zaseke (šn=11),
- izolate iz vzorcev lososa in drugih rib (n=18),
- izolate iz vzorcev mesa in mesnih pripravkov (n=18),
- izolate iz vzorcev paštet, suhe salame, klobase, belih kozic in tatarskega bifitka (n=7),
- izolate iz vzorcev surovega mleka (n= 8),
- izolat iz vzorca zelenjave (n=1)
- in izolat, pri katerem vrsta živila ni poznana (n=1).

Vzorci naravnega okolja so bili pridobljeni z vzorčenjem kmetij v Ljubljani in okolici v letih 2012 in 2013. Izolate iz vzorcev površinskih vod smo dobili iz Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. V raziskavo smo vključili 27 izolatov:

- izolate iz vzorcev površinske vode (n= 13),
- izolate iz vzorcev gnoja (n=8),
- izolate iz vzorcev silaže in krme (n= 3),

- izolata iz vzorcev zemlje (n= 2)
- in izolat pridobljen iz vode iz zajetja (n=1).



Slika 1: Zbiranje vzorcev iz naravnega okolja po kmetijah: a) vzorčenje silaže, b) vzorčenje vode iz napajalnika, c) vzorčenje gnoja in d) vzorčenje zemlje, (foto M. Kavalič).

Vzorci iz klavnic in predelovalnih obratov so bili odvzeti v letih 2008 do 2013. Skupno smo pridobili 26 izolatov:

- izolate pridobljene iz brisov površin v klavnicah (n=13) in
- izolate iz vzorcev zraka v klavnicah (n=13).

Izolate iz kliničnih in patoloških vzorcev ljudi smo dobili z Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor in Inštituta za varovanje zdravja. Vzorci so bili odvzeti v letih 2007 do 2013. Skupno smo preiskovali osemindvajset izolatov:

- izolate iz hemokultur (n= 15),
- izolat pridobljen iz brisa kože (n=1),
- izolat iz vzorca likvorja (n=1),
- izolata iz vzorcev punktatov (plevralni in abdominalni) (n= 2)
- in izolati pri katerih natančno mesto odvzema ni bilo znano (n=9).

V raziskavi so bili z namenom primerjave uporabljeni tudi starejši izolati *L. monocytogenes* iz interne zbirke Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete.

#### Vzorčenje v primeru izbruhov listerioze

Posebej smo obravnavali izbruhe listerioze pri živalih in ljudeh, kjer smo naredili načrt vzorčenja na podlagi pridobljenih anamnestičnih podatkov. Poleg tega pa smo odločali za dodatne vzorce tudi na terenu, če smo presodili, da bi dodatni vzorci lahko prispevali k razjasnitvi primera. Vsi primeri izbruhov so opisani posebej, primer A (priloga 2), primer B (priloga 3), primer C (priloga 4), primer D (priloga 5).

Posebej pa sta opisana primera listerioze pri ljudeh, kjer smo preučevali verjetnost prenosa *L. monocytogenes* z živali na ljudi. Primera sta opisana v priloženih prispevkih (Zelenik s sod. 2014, Košir s sod., 2014).

## 3.2. Laboratorijske preiskave

Klinični vzorci živali so bili pregledani po protokolu, ki ga predvideva OIE, t.j. s splošno bakteriološko preiskavo na osnovnih gojiščih (krvni agar) in z usmerjeno bakteriološko preiskavo na obogatitvenih gojiščih (Fraser bujon) in selektivnih diferencialnih gojiščih (agar ALOA in Palcam) standardnem postopku. Klinični vzorci ljudi so bili preiskani po protokolu za splošno bakteriološko preiskavo in hemokulturo. Preiskave kliničnih vzorcev so bile opravljene na IMP VF in IVZ RS. Vzorci živil so bili preiskani na IHŽ VF in IVZ RS po standardnem postopku skladno z ISO standardom za izolacijo listerij. Vzorci okolja, ki so jih odvzeli sodelavci IHOŽE VF so bili preiskani na IMP VF, skladno z ISO standardom, oz. po modificirani (in house) metodi za vzorce, ki jih standard posebej ne predvideva.

### 3.2.1 Izolacija bakterij *Listeria monocytogenes*

Postopek za ugotavljanje bakterije *L. monocytogenes* vključuje izolacijo na obogatitvenih in selektivnih gojiščih. Najpogostejše uporabljena referenčna metoda za izolacijo in identifikacijo listerij je standard EN ISO 11290.

Vsak vzorec smo najprej obogatili v obogatitvenem gojišču, polovičnem Fraser-jevem bujonu (F1), saj lahko vzorec vsebuje nizko število bakterij vrste *L. monocytogenes* in visoko skupno število bakterij. F1 bujon namreč vsebuje polovično koncentracijo selektivnih sestavin in tako omogoča rast in razmnoževanje tudi poškodovanim celicam. Nato smo vzorce prenesli v Fraser-jev bujon (F2), kjer je prišlo do sekundarne obogatitve. Po inkubaciji pa smo vzorce nasadili na trdna selektivna gojišča ALOA in PALCAM.

Na ALOA agarju so bile kolonije *L. monocytogenes* po 48 urah modro-zelene barve in obdane z motnim halo efektom. Od nepatogenih vrst listerij smo *L. monocytogenes* ločili ravno na podlagi halo efekta. Nepatogene vrste so namreč prav tako na gojišču modro-zelene barve, a okoli njih ni halo efekta.

Na PALCAM agarju, ki je rožnato do rdeče barve, so bile kolonije *Listeria* spp. po 24 urah zelo majhne, sivo zelene ali olivne barve, gojišče neposredno okrog kolonij pa se je obarvalo črno. Po 48 urah so ostale kolonije zelene, velike 1,5 do 2 mm v premeru, v sredini ugreznjene, gojišče pa se je v celoti obarvano črno.

Natančen protokol je prikazan v posebni prilogi Izolacija bakterije *Listeria monocytogenes*.

### 3.2.2 Identifikacija

#### 3.2.2.1 Potrditev rodu *Listeria* spp.

Za potrditev bakterij iz rodu *Listeria*, smo morali iz vsakega trdnega selektivnega gojišča precepiti po 5 kolonij, ki so bile značilne za listerije. Kolonije smo razsadili do posameznih kolonij na predhodno osušeno KA gojišče. Nasajeno gojišče smo nato inkubirali pri 35–37 °C, 18–24 ur, oziroma toliko časa, da smo dobili zadovoljivo rast (do 48 ur). Tipične kolonije so bile velike 1–2 mm v premeru, konveksne, brezbarvne in motne z gladkim robom. Osnovno diagnostiko smo dopolnili s katalaznim preizkusom (pozitiven) in barvanjem po Gramu (*Listeria* spp. so grampozitivne kratke paličke, ki so lahko razporejene posamezno, v parih pod kotom ali ena ob drugi).

### 3.2.2.2 Potrditev vrste *Listeria monocytogenes*

Za potrditev vrste *L. monocytogenes* smo uporabili več dodatnih testov.

#### Hemoliza

Za ugotavljanje hemolitične aktivnosti smo uporabili krvni agar z ovčjo krvjo. Bakterijsko kolonijo smo na agarju razsadili do posameznih kolonij. Inokulirana gojišča smo inkubirali pri temperaturi 37 °C 24 ur. Bakterije *L. monocytogenes* so na krvnem agarju povzročile hemolizo beta, ki je bila včasih vidna le pod kolonijami. *L. ivanovii* na krvnem agarju tvori zelo močno in široko beta hemolizo (slika), medtem ko *L. innocua* ne povzroča hemolize.



Slika 2: Rast *Listeria monocytogenes* (levo), *Listeria ivanovii* (na sredini) in *Listeria innocua* (desno) na krvnem agarju.

#### Identifikacija z biokemijsko preiskavo na osnovi izkoriščanje ogljikovih hidratov

Sumljive kolonije smo precepili na sveže gojišče za čisto kulturo, po inkubaciji pa v tekoča gojišča z dodatkom ustreznega ogljikovega hidrata. Po 24-48 urah inkubacije pri 37 °C je bila navadno že opazna pozitivna reakcija, v nasprotnem primeru pa smo inkubacijo nekoliko podaljšali. Izolirane bakterije smo preizkusili glede na njihovo sposobnost razkroja različnih sladkorjev (ramnoze in ksiloze).



Slika 3: Reakcija izkoriščanja različnih sladkorjev: *Listeria monocytogenes*, pozitivna reakcija (razkroj ramnoze, levo) in negativna reakcija (ni razkroja ksiloze, desno).



Natančen protokol je prikazan v posebni prilogi Potek identifikacije bakterije *Listeria monocytogenes*.

### **3.2.3. Klasična serotipizacija bakterije *Listeria monocytogenes***

Za osnovno serotipizacijo izolatov *L. monocytogenes* smo uporabili metodo določanja somatskih in flagelarnih antigenov, na podlagi katerih vse listerije lahko razvrstimo v 15 različnih serotipov. Za klasično serotipizacijo ni na voljo nobenega splošnega mednarodnega standarda, zato so med laboratoriji možne manjše variacije pri izvedbi testiranja, kar pa ne vpliva na končni rezultat tipizacije.

Klasično serološko tipizacijo smo opravili na podlagi dokazovanja somatskih (O) in flagelarnih (H) antigenov s pomočjo specifičnih serumov (Denka-Seiken) po navodilu proizvajalca, v določenih segmentih pa bo rahlo modificiran v skladu s priporočili centralnega referenčnega laboratorija za *L. monocytogenes* v Parizu (EU-RL, ANSES, *Maisons-Alfort Laboratory for Food Safety*, Paris).

Serološka tipizacija izolatov in molekularna serotipizacija s PCR sta bili opravljena na IMP VF, človeški izolati pa tudi na IVZ RS po usklajenem postopku z Veterinarsko fakulteto.

Klasična serotipizacija je temeljila na modificirani metodi Denka Seiken. Pri klasični serotipizaciji nam je za vzorec služila čista kultura bakterije *L. monocytogenes*. Za serotipizacijo smo uporabili komercialno pripravljene antiserume. Posebej smo determinirali O antigen in H antigen.

#### **3.2.3.1 Določitev antigena O**

*L. monocytogenes* smo nasadili na krvni agar in inkubirali pri 37 °C čez noč. Naslednji dan smo pričeli z aglutinacijo. Na predmetnico smo kanili kapljico serumov I/II in V/VI ter kapljico fiziološke raztopine kot negativno kontrolo. Nato smo vzeli bakteriološko zanko bakterijske kulture in jo zmešali s kapljico posameznega antiseruma. Za vsak antiserum smo uporabili svežo bakteriološko zanko. V primeru pozitivnega rezultata je prišlo do aglutinacije. Najprej smo preverili, da ni prišlo do aglutinacije v fiziološki raztopini, saj bi to pomenilo možnost avtoaglutinacije. Kot pozitiven rezultat smo šteli le močno aglutinacijo z enim od obeh antiserumov v roku 1 minute. Če je vzorec reagiral z I/II antiserumom, smo postopek ponovili še z antiserumoma I in IV. Če pa je prišlo do aglutinacije z antiserumom V/VI, smo postopek ponovili še z antiserumi VI, VII, VIII in IX.

Natančen protokol je prikazan v posebni prilogi Shema determinacije O antigena bakterije *Listeria monocytogenes*.

#### **3.2.3.2 Določitev antigena H**

*L. monocytogenes* smo nasadili na krvni agar in čez noč inkubirali pri 37 °C. Naslednji dan smo vzeli eno bakteriološko zanko kulture in jo nasadili na notranjo stran nastavka za pipetiranje, ki smo ga prej postavili v 50 ml epruvete napolnjene s poltekočim gojiščem BHI z 0,2 % agarjem. Nato smo kulturo inkubirali na 30 °C 5 do 7 dni, oziroma dokler nismo opazili rasti na zgornji strani gojišča izven nastavka za pipetiranje. Nato smo eno

bakteriološko zanko inokulirali v tekoče gojišče BHI in inkubirali čez noč na 30 °C. Naslednji dan smo v novo epruveto odpipetirali enako količino prej inokuliranega BHI-ja in fiziološke raztopine s formalinom ter dobro premešali (slika 13). Nato smo v majhne epruvetke kanili po dve kapljici vsakega antiseruma (A, B, C in D) in le tem dodali 0,5 ml suspenzije preiskovane bakterije. Za negativno kontrolo smo uporabili fiziološko raztopino. Vse smo dobro premešali in dali inkubirati na 52 °C za 2 uri. Nato smo epruvetke pregledali za pojav aglutinacije, ki je pomenila pozitiven rezultat (slika 14). Natančen protokol je prikazan v posebni prilogi Shema determinacije H antigena bakterije *Listeria monocytogenes*.

### 3.2.3.3 Interpretacija rezultatov

Serotip *L. monocytogenes* smo določili na podlagi kombinacije O in H antigenov, kot je prikazano spodnji shemi.

Serotip	O-antigen	H-antigen
1/2a	I, II, (III)	AB
1/2b	I, II, (III)	ABC
1/2c	I, II, (III)	BD
3a	II, (III), IV	AB
3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	ABC
3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	BD
4a	(III), (V), VII, IX	ABC
4ab	(III), V, VII, IX, X	ABC
4b	(III), V, VI	ABC
4c	(III), V, VII	ABC
4d	(III), (V), VI, VII	ABC
4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	ABC
7	(III), XII, XIII<	ABC

### 3.2.4 Serotipizacija bakterije *Listeria monocytogenes* z verižno reakcijo s polimerazo

Serotipizacija bakterije *L. monocytogenes* je povzeta po virih: Doumith in sod., 2004; Borucki in sod., 2003; D'Agostino in sod., 2004)

#### 3.2.4.1 Izolacija DNA

Vzorci *L. monocytogenes* smo nasadili na krvni agar in jih čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo delo nadaljevali v komori za varno delo. V 2 ml mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 100 µl sterilne destilirane vode, nato smo dodali po eno bakteriološko zanko čiste kulture vzorca in dobro zmešali. Mešanico smo nato v termobloku inkubirali 15 minut na 95 °C. Po inkubaciji smo vse vzorce centrifugirali in nato do uporabe shranili v zamrzovalniku.

#### 3.2.4.2. Pomnoževanje DNA

Za vsak vzorec smo izvedli dva različna PCR pomnoževanja. S prvim smo dobili šest produktov, z drugim pa enega. Za interpretacijo rezultatov sta pomembna oba.

V vsako mikrocentrifugirko smo torej dali 24,5 µl reakcijske mešanice. Dodali smo ji po 1 µl izolirane DNA našega vzorca. Nato smo izvedli pomnoževanje z aparatom za PCR Veriti (Applied biosystems, Invitrogen, Kalifornija, ZDA). Produkta smo do analize s kapilarno elektroforezo shranili v hladilniku.

V vsako mikrocentrifugirko smo torej dali 22,5 µl reakcijske mešanice. Dodali smo ji po 2,5 µl izolirane DNA našega vzorca. Nato smo izvedli pomnoževanje z aparatom za PCR Veriti (Applied biosystems, Invitrogen, Kalifornija, ZDA) (preglednica 15). Produkta smo do analize s kapilarno elektroforezo shranili v hladilniku.

Serotipizacijo smo opravili po standardnem protokolu, ki je prikazan v posebni prilogi. Shema serotipizacije bakterije *Listeria monocytogenes* z metodo verižne reakcije s polimerazo.

### 3.2.5. Subtipizacija bakterije *Listeria monocytogenes* s pulzno gelsko elektroforezo

Subtipizacija bakterije *L. monocytogenes* je povzeta po: Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*. PulseNet, CDC, 2013.

#### 3.2.5.1 Izolacija DNA

Pred začetkom izolacije DNA smo si vedno pripravili vse potrebne raztopine in material za delo. Poleg tega smo pred začetkom dela vklopili in nastavili na ustrezno temperaturo vodno kopel s stresanjem (54 °C), navadno vodno kopel (53-56 °C), termomikser (37 °C) in termoblok (55 °C).

#### 3.2.5.2. Priprava suspenzije celic

Dan pred izvedbo dela smo nasadili izolate *L. monocytogenes* na krvni agar in jih čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo delo nadaljevali v komori za varno delo. Vsak izolat *L. monocytogenes* smo suspendirali v epruveti s 3 ml TE pufra. Nato smo suspenziji z biofotometrom izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 610 nm in vrednosti zabeležili na obrazec. Vrednosti OD so morale biti med 1,25 in 1,35. Po 240 µl suspenzije vsakega vzorca smo prenesli v novo 2 ml mikrocentrifugirko, dodali 60 µl lizocima (z založno koncentracijo 10 mg/ml) in premešali z obračanjem. Mikrocentrifugirke smo nato inkubirali 10 minut v termobloku pri temperaturi 37 °C.

#### 3.2.5.3. Priprava agaroze

V čaši smo v 10 ml sterilne destilirane vode raztopili 0,12 g agaroze SeaKem Gold in jo do uporabe postavili v vodno kopel na temperaturo 53-56 °C. V 50 ml centrifugirko smo odpipetirali 10 % SDS (natrijev dodecil sulfat), temu dodali agarozo, premešali in do

uporabe centrifugirko postavili v vodno kopel na temperaturo 53-56 °C. Tik pred uporabo smo dodali še proteinazo K, premešali in mešanico odpipetirali v 2 ml mikrocentrifugirke, ki smo jih postavili v termoblok (53 °C). Vse sestavine in količine so navedene v preglednici 17, mešanico pa moramo pripraviti v dovolj veliki količini (število vzorcev + 4).

#### 3.2.5.4. Priprava čepkov

Po 10 minutni inkubaciji mikrocentrifugirk z lizocimom, smo suspenziji s pipetiranjem počasi dodali po 300 µl ogrete raztopine (SSP) in pazili, da niso nastali mehurčki. Mešanico smo takoj prenesli v modelčke za čepke in počakali 10-15 minut, da so se strdili.

#### 3.2.5.5. Liza celic

Najprej smo v 50 ml centrifugirki pripravili mešanico pufra CLB (pufer za lizo celic) in proteinaze K. Količine so navedene v preglednici 18.

Za vsak vzorec smo vzeli 50 ml centrifugirko, jo primerno označili, vanjo odpipetirali po 4 ml mešanice in s spatulo nato vanjo prenesli čepke. Med uporabo smo spatulo po vsakem vzorcu razkužili v alkoholu. Nato smo preverili, da so vsi čepki potopljeni v mešanico in jih inkubirali 2 uri pri temperaturi 54°C v vodni kopeli s stresanjem (150 rpm).

#### 3.2.5.6. Spiranje čepkov

Pred začetkom spiranja smo ogreli zadostno količino sterilne destilirane vode (SDV) in pufra TE na 54°C. Čepke smo nato najprej 2x spirali s 15 ml ogrete SDV (50-54°C) in jih po vsakem spiranju inkubirali v vodni kopeli s stresanjem 10 minut. Nato smo čepke še 4x spirali s 15 ml ogretega TE (50-54°C). Po vsakem spiranju smo jih inkubirali v vodni kopeli s stresanjem 15 minut. Po spiranju smo čepke do cepitve DNA shranili v 1,8 ml svežega pufra TE v hladilniku.

#### 3.2.5.7. Cepitev DNA z *Asc I*

Najprej smo v 2 ml mikrocentrifugirki pripravili predcepitveno mešanico tako, da smo pufer 4 razredčili z up (ultrapure) vodo v razmerju 1:10.

V označene mikrocentrifugirke smo za vsak vzorec odpipetirali po 150 µl razredčenega pufra. Nato smo čepke s spatulo izvlekli iz pufra TE in s skalpelom previdno odrezali 2 milimetreške koščke ter jih prenesli v mikrocentrifugirke z razredčenim puffrom. Ostanek čepka smo pustili v TE puffru in ga shranili v hladilniku. Med rezanjem čepkov smo spatulo razkuževali v alkoholu. Čepke smo v predcepitveni mešanici inkubirali 15 minut pri 37 °C (slika 19). Med tem smo pripravili cepitveno mešanico z restrikcijsko endonukleazo *Asc*).

Po inkubaciji smo odstranili vso predcepitveno mešanico in pri tem pazili, da nismo poškodovali čepkov. Nato smo v mikrocentrifugirke dodali po 150 µl cepitvene mešanice (preglednica 20) in inkubirali v vodni kopeli vsaj 4 ure pri 37 °C).

#### 3.2.5.8. Cepitev DNA referenčnih sevov *Salmonella braenderup* z *XbaI*

Pri vsaki restrikciji smo opravili tudi cepitev referenčnih sevov. Vsakič smo opravili cepitev 3 vzorcev *Salmonella braenderup*. Najprej smo pripravili predcepitveno mešanico. Nato smo s spatulo čepke izvlekli iz pufra TE, previdno odrezali 2 milimetreške koščke ter jih prenesli v mikrocentrifugirke, kamor smo že prej odpipetirali po 100 µl predcepitvene mešanice, in jih inkubirali 15 minut pri 37 °C (slika 19). Med tem smo pripravili še cepitveno mešanico. Po 15 minutni inkubaciji smo odstranili predcepitveno mešanico in sevom dodali po 102 µl cepitvene mešanice. Nato smo inkubirali vsaj 4 ure pri 37 °C.

### 3.2.5.9. Cepitev DNA z *ApaI*

Najprej smo v 2 ml mikrocentrifugirki pripravili predcepitveno mešanico tako, da smo pufer 4 razredčili z ultrapure vodo v razmerju 1:10. Nato smo v označene mikrocentrifugirke za vsak vzorec odpipetirali po 150 µl razredčenega pufra. Potem smo s spatulo čepke izvlekli iz pufra TE in previdno s skalpelom odrezali 2 milimetske koščke ter jih prenesli v mikrocentrifugirke z razredčenim pufrom. Ostanek čepka smo pustili v TE pufru in ga shranili v hladilniku. Med rezanjem čepkov smo spatulo namakali v alkohol. Čepke smo v predcepitveni mešanici inkubirali 10 minut na 37 °C. Med tem smo pripravili cepitveno mešanico z restrikcijsko endonukleazo *ApaI*.

Po inkubaciji smo odstranili vso predcepitveno mešanico in pri tem pazili, da nismo poškodovali čepkov. Nato smo v mikrocentrifugirke dodali po 150 µl cepitvene mešanice in inkubirali v vodni kopeli vsaj 5 ur pri 25 °C. Po končani restrikciji smo odpipetirali cepitveno mešanico in v mikrocentrifugirke dodali 150 µl pufra TE ter jih pred izvedbo elektroforeze inkubirali čez noč oz. do 1 tedna v hladilniku.

### 3.2.5.10 Elektroforeza

Najprej smo v celico aparata za elektroforezo vlili 2 litra 0,5 x TBE pufra (dva kratno mešanico: 50 ml + 950 ml destilirane vode). Nato smo vklopili vir napajanja, modul za nastavljanje programov, črpalko in hladilno enoto, nastavili program elektroforeze in počakali, da se je pufer v celici ohladil na zahtevano temperaturo.

Nato smo pripravili 1 % agarozo SeaKem Gold tako, da smo 1,8 g agaroze raztopili v 180 ml 0,5 x TBE in jo do uporabe postavili v kopal na temperaturo 53-55 °C.

Okvir, glavniček in podlogo za gel smo splaknili z destilirano vodo. S spatulo smo pobrali koščke čepkov iz mikrocentrifugirk, jih osušili s staničevino, previdno položili na glavniček (približno 1 mm od spodnjega roba), počakali 5-10 minut in jih zalili z 1 % agarozo. Med polaganjem posameznih čepkov na glavniček smo spatulo vsakič razkužili v absolutnem etanolu. Na glavniček smo čepke polagali v obratnem vrstnem redu, tako da so si od leve proti desni sledile številke od 12 proti 1. Na prvi, srednji in zadnji zob glavnika smo nanesti čepke *S. braenderup*, na vse ostale pa preiskovane izolate *L. monocytogenes*.

Nato smo sestavili okvir za vlivanje gela, vanj vstavili glavniček in vlili gel. Počakali smo približno 30 minut, da se je gel strdil in nato previdno odstranili glavniček. Jamice smo zalili z 1 % agarozo in počakali, da se je strdila. Pladenj z gelom smo prenesli v celico za elektroforezo in počakali 10-15 minut, da se je temperatura gela izenačila z temperaturo pufra v celici. Nato smo vnesli še parametre elektroforeze (preglednica 25) in zagnali aparat.

### 3.2.5.11 Odčitavanje rezultatov

Po končani elektroforezi smo gel barvali z etidijevim bromidom (10 mg/ml) 20-30 minut v pokriti posodi. Razredčino etidijevega bromida smo pripravili tako, da smo 40 µl etidijevega bromida redčili z 400 ml destilirane vode. Po barvanju smo gel spirali v približno 500 ml destilirane vode 60-90 minut na tresoči podlagi. Na vsakih 20-30 minut smo zamenjali vodo.

Po spiranju smo rezultate zabeležili v komori z UV presvetljevalnikom. Slikali smo pri različnih osvetlitvah in slike shranili v formatu „tif uncompressed“ ter jih prenesli v program BioNumerics za nadaljnjo obdelavo rezultatov.

### 3.2.5.12 Analiza rezultatov

Rezultate smo analizirali s pomočjo računalniškega programa BioNumerics (verzija 5.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgija), ki omogoča medsebojno primerjavo pulzotipov in izdelavo dendrogramov. V programu BioNumerics je bila primerjava med izolati narejena le na podlagi encima *ApaI*. Za primerjavo smo uporabili algoritem UPGMA s koeficientom Dice, z 1 % optimizacijo ter z 1 % toleranco zamika med pasovi. Kriterij za razvrščanje izolatov v podtipe je bila 80 % skladnost med pulzotipi.

## 4. REZULTATI

V naši raziskovalni nalogi smo uspeli pridobiti izolate *L. monocytogenes* iz vseh rizičnih oz. najpogostejših mest, kjer listerije lahko vstopajo v prehransko verigo in povzročajo okužbe pri ljudeh. Raziskavo smo izvajali na več različnih nivojih (naravno okolje, živali, predelovalni obrati, živila, človek) in na podlagi tipizacije izoliranih sevov poskušali najti nekatere epizootiološke povezave. Spremljali in analizirali smo okužbe živali in ugotavljali poti prenosa *L. monocytogenes* iz primarne proizvodnje živali v predelavo živil. V obratih živilske industrije smo sistematično vzorčili in preiskovali kritična mesta, kjer lahko prihaja do zunanje in notranje kontaminacije obratov. Preiskovali smo vzorce v predelavi rdečega mesa, perutninskega mesa, mlečnih in ribjih izdelkov ter različnih živilsko predelovalnih obratov. Evidentirali smo najpogosteje kontaminirana živila in izvedli potrebne dodatne preiskave živil.

Iz 1540 vzorcev smo pridobili 203 izolate bakterije *L. monocytogenes*, ki smo jih dodali že obstoječi arhivski zbirki. Med izolati smo glede na poreklo izbrali 185 sevov *L. monocytogenes* in jih serotipizirali s klasično serološko metodo in z verižno reakcijo s polimerazo ter subtipizirali z metodo pulzne gelske elektroforeze. Namerno smo izbrali seve *L. monocytogenes*, ki so bili izolirani iz petih različnih okolij:

- živali (preglednica 1),
- živil (preglednica 2),
- naravnega okolja (preglednica 3),
- klavnic (preglednica 4) in
- ljudi (preglednica 5).

Največ izolatov *L. monocytogenes* smo pridobili iz vzorcev živil (64). Iz vzorcev živali smo pridobili 40 izolatov, iz vzorcev naravnega okolja 27, iz vzorcev klavnic pa 26 izolatov *L. monocytogenes*. Iz humanih vzorcev smo uspeli pridobiti 28 izolatov *L. monocytogenes*.

### 4.1. Serotipizacija s klasično serološko metodo in z metodo verižne reakcije s polimerazo

Pri vseh serotipiziranih izolatih *L. monocytogenes* so se serološki tipi ugotovljeni s klasično serotipizacijsko metodo ujemali s serološkimi tipi ugotovljenimi z metodo serotipizacije z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

Vzorci živali so vključevali 19 vzorcev možganskega tkiva, 8 vzorcev fecesa, 7 vzorcev mleka, 1 vzorec bezgavk, 1 vzorec jetrnega tkiva, 3 vzorce rektalnih brisov ter vzorec, pridobljen iz abortiranega plodu. Največ vzorcev je bilo pridobljenih od goveda, kar 21, od tega sta bila 2 vzorca izolirana od teličkov in en iz abortiranega plodu. Poleg tega je bilo 8



vzorcev pridobljenih od ovac. Od koz smo pridobili 10 vzorcev, od tega sta bila 2 od kozličkov. En vzorec pa smo pridobili še od srne.

Pri izolatih *L. monocytogenes*, izoliranih iz živalih je prevladoval serološki tip 1/2a, kateremu je pripadalo kar 23 izolatov. Poleg tega je še 11 izolatov pripadalo serotipu 4b ter 5 izolatov serotipu 1/2b. Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli.

Iz vzorcev odvzetih iz možganskega tkiva sta bila najpogostejše izolirana serotipa 1/2a in 4b, iz vzorcev mleka 1/2a, iz vzorcev fecesa pa prav tako 1/2a in 4b. Izolat iz bezgavke srne pa je pripadal serotipu 1/2a, istemu serotipu je pripadal tudi izolat iz jetrnega tkiva kozlička. Izolati, ki smo jih pridobili iz rektalnih brisov, so pripadali serotipu 1/2a. Izolat *L. monocytogenes* iz abortiranega plodu goveda smo analizirali le s klasično serotipizacijo in ugotovili serološki tip 4b, PCR serotipizacija pa ni bila narejena, a predvidevamo, da bi se rezultat PCR ujema s klasično serotipizacijo.

Preglednica 1: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi živalskimi izolati *Listeria monocytogenes*.

serotip	Vrsta živalskega vzorca				Skupaj (št. / %)	
	možgansko tkivo	mleko	feces	drugo		
<b>1/2a</b>	8	7	3	5	23	57,5
<b>1/2b</b>	3	0	2	0	5	12,5
<b>1/2c</b>	0	0	0	0	0	0
<b>4b</b>	8	0	3	1	12	30
<b>skupaj</b>	19	7	8	5	40	100

Vzorci živil so vključevali 18 vzorcev rib, 35 vzorcev mesa in mesnih izdelkov, 8 vzorcev surovega mleka in po en vzorec zelenjave in kuhanih belih kozic. Za en živilski izolat pa vrsta živila ni bila znana. Med vzorci rib je bilo kar 16 vzorcev lososa. Med mesne izdelke pa smo vključili vzorce zaseke, suhih salam, paštet, svinjskega vratu ter mesne pripravke.

Pri izolatih *L. monocytogenes* iz živil je prevladoval serološki tip 1/2a. Od skupno 64 izolatov *L. monocytogenes*, je bilo namreč kar 49 izolatov s serotipom 1/2a. Izolatov ostalih serotipov je bilo bistveno manj, 8 izolatov je pripadalo serotipu 4b, 5 izolatov serotipu 1/2b, 2 izolata pa sta pripadala serotipu 1/2c. Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli.

Preglednica 2: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi živalskimi izolati *Listeria monocytogenes*

serotip	Vrsta živilskega vzorca				skupaj (št. / %)	
	ribe	meso in mesni izdelki	mleko	drugo		
1/2a	16	24	7	2	49	76,6
1/2b	1	4	0	0	5	7,8
1/2c	0	2	0	0	2	3,1
4b	1	5	1	1	8	12,5
<b>skupaj</b>	18	35	8	3	64	100

Vzorci, odvzeti iz naravnega okolja so vključevali 13 vzorcev površinske vode, 8 vzorcev gnoja, 2 vzorca zemlje, 2 vzorca silaže ter po en vzorec krme in vode iz zajetja.

Pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz naravnega okolja sta prevladovala serološka tipa 1/2a in 4b. Serotipu 1/2a je pripadalo 15 izolatov *L. monocytogenes*, serotipu 4b pa 9. Poleg tega so 3 izolati pripadali serotipu 1/2b. Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli.

Iz vzorcev odvzetih iz gnoja je bil najpogostejše izolirani serotip 1/2a, iz vzorcev površinske vode prav tako 1/2a, iz vzorcev zemlje pa 4b. Izolat izoliran iz krme je pripadal serotipu 1/2a, prav tako tudi izolat izoliran iz vode iz lastnega zajetja rejca ter en izolat iz silaže, drugi izolat iz silaže je pripadal serotipu 4b.

Preglednica 3: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi izolati *Listeria monocytogenes* iz naravnega okolja

serotip	Vrsta naravnega okolja				skupaj (št. / %)	
	gnoj	površinska voda	zemlja	drugo		
1/2a	5	7	0	3	15	55,6
1/2b	1	2	0	0	3	11,1
1/2c	0	0	0	0	0	0
4b	2	4	2	1	9	33,3
<b>skupaj</b>	8	13	2	4	27	100

Vzorci odvzeti iz klavnic so vključevali 13 vzorcev zraka, 10 vzorcev brisa površine in po en vzorec iz bazena za kri, satelita za piščance in filetirke.

Pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz klavnic je prevladoval serološki tip 1/2a. Kar 18 izolatov *L. monocytogenes* od skupno 26 je namreč pripadalo serotipu 1/2a. Serotipu 4b je pripadalo 6 izolatov, serotipu 1/2b pa 2 izolata.

Vsi izolati *L. monocytogenes*, ki so bili izolirani iz zraka so imeli enak serotip, 1/2a. Pri vzorcih brisa površine je bil pa najpogostejši serotip 4b. Vzorca *L. monocytogenes* izolirana iz bazena za kri in satelita za piščance sta pripadala serotipu 1/2a, vzorec iz filetirke pa serotipu 4b.

Preglednica 4: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi izolati *Listeria monocytogenes* iz klavnic

serotip	Vrsta vzorca odvzetega iz klavnice			skupaj (št. / %)	
	bris površine	zrak	drugo		
<b>1/2a</b>	3	13	2	18	69,2
<b>1/2b</b>	2	0	0	2	7,7
<b>1/2c</b>	0	0	0	0	0
<b>4b</b>	5	0	1	6	23,1
<b>skupaj</b>	10	13	3	26	100

Vzorci ljudi so vključevali 15 vzorcev hemokultur, vzorec brisa kože, vzorec likvorja, 2 vzorca punktativ (plevralni in abdominalni) pri ostalih 9 humanih vzorcih pa natančno mesto odvzema ni bilo znano.

Pri humanih izolatih *L. monocytogenes* sta prevladovala serološka tipa 1/2a in 4b. Serotipu 1/2a je pripadalo 14 izolatov *L. monocytogenes*, 9 pa serotipu 4b. Poleg tega so 3 izolati pripadali serotipu 1/2b, 2 pa serotipu 1/2c. Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli.

Iz izolatov izoliranih iz hemokultur je bil najpogostejši serotip 1/2a. Izolat izoliran iz likvorja je pripadal serotipu 1/2a, izolat izoliran iz punktativ serotipu 1/2a, izolat kože pa serotipu 4b.

Preglednica 5: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi človeškimi izolati *Listeria monocytogenes*

serotip	Vrsta humanega vzorca					skupaj (št. / %)	
	hemokultura	likvor	bris kože	punktat	neznano		
1/2a	9	1	0	2	2	14	50
1/2b	2	0	0	0	2	4	14,3
1/2c	1	0	0	0	0	1	3,6
4b	3	0	1	0	5	9	32,1
skupaj	15	1	1	2	9	28	100

#### Skupna analiza rezultatov

Med vsemi izoliranimi sevi *L. monocytogenes* je prevladoval serološki tip 1/2a. Izmed 185 izolati je namreč kar 119 pripadalo temu serotipu, kar predstavlja 64,3 %. Drugi najpogostejši serološki tip je bil 4b, izolatov takega serotipa je bilo 44, kar je 23,8 %. Serotipu 1/2b je pripadalo 19 izolatov (10,3 %) in serotipu 1/2c trije izolati (1,6 %). Izolatov ostalih serotipov med našimi vzorci nismo našli.

Preglednica 6: Porazdelitev serotipov med vsemi analiziranimi izolati *Listeria monocytogenes*

serotip	živali		živila		naravno okolje		klavnice		ljudje		skupaj	
	(št. / %)	(št. / %)	(št. / %)	(št. / %)	(št. / %)	(št. / %)	(št. / %)	(št. / %)	(št. / %)	(št. / %)	(št. / %)	
1/2a	23	57,5	49	76,6	15	55,6	18	69,2	14	50	119	64,3
1/2b	5	12,5	5	7,8	3	11,1	2	7,7	4	14,3	19	10,3
1/2c	0	0	2	3,1	0	0	0	0	1	3,6	3	1,6
4b	12	30	8	12,5	9	33,3	6	23,1	9	32,1	44	23,8
skupaj	40		64		27		26		28		185	

#### 4.2 Rezultati pridobljeni z metodo pulzne gelske elektroforeze (PFGE)

Rezultate, ki smo jih pridobili z metodo PFGE, smo analizirali s pomočjo računalniškega programa BioNumerics. Program omogoča izdelavo dendrogramov, na podlagi katerih smo izolate *L. monocytogenes* razvrstili v preglednico. Naš kriterij za razvrščanje izolatov v podtipe je bila 80 % skladnost med pulzotipi. V programu BioNumerics pa je bila primerjava med izolati narejena le na podlagi encima *ApaI*.

Večino živalskih izolatov *L. monocytogenes* smo uvrstili v pulzoskupine A, B in G, večino živilskih izolatov v pulzoskupine B, C in F, večino izolatov iz naravnega okolja v pulzoskupino D, večino izolatov iz klavnic v pulzoskupino E in večino humanih izolatov v pulzoskupine A, D, C in J.

Večino izolatov, ki smo jih uvrstili v isto pulzoskupino, je pripadalo enakemu serološkemu tipu. Izjeme so bili nekateri izolati, ki smo jih uvrstili v pulzoskupine A, D, E, J, L in N. V večini primerih sta izstopala po dva izolata.

Največja nehomologija je bila prisotna seveda pri izolatih, ki jih nismo uspeli uvrstiti v pulzoskupino. Takih je bilo 9, izolirani pa so bili iz živil, klavnic, naravnega okolja in živalskih tkiv. Pripadali so tudi različnim serotipom (1/2a, 1/2b in 4c).

Preglednica 7: Pulzoskupine, podtipi in serotipi izolatov *Listeria monocytogenes*

pulzoskupina	število podtipov (št. izolatov)	serotipi (št. izolatov)	št. živalskih izolatov	št. živilskih izolatov	št. izolatov iz naravnega okolja	št. izolatov iz klavnic	št. humanih izolatov
A	16 (26)	4b (24), 1/2b (2)	8	7	3	3	5
B	9 (25)	1/2a (25)	6	17	1	1	0
C	10 (18)	1/2a (18)	0	11	1	3	3
D	11 (15)	4b (13), 1/2a (1), 1/2b (1)	4	0	6	1	4
E	6 (13)	1/2a (12), 4b (1)	1	1	1	9	1
F	11 (12)	1/2a (12)	0	10	1	0	1
G	3 (11)	1/2a (11)	9	2	0	0	0
H	5 (7)	1/2b (7)	0	4	0	1	2
I	2 (5)	1/2a (5)	0	3	1	1	0
J	4 (5)	1/2c (4), 1/2a (1)	0	2	0	0	3
K	2 (5)	1/2a (5)	0	4	0	1	0
L	5 (5)	1/2a (4), 1/2b (1)	0	0	2	1	2
M	3 (3)	1/2a (3)	0	3	0	0	0
N	3 (3)	1/2a (1), 1/2b (2)	1	0	2	0	0
O	2 (3)	4b (3)	0	1	0	1	1
P	2 (2)	1/2a (2)	0	0	2	0	0
Q	2 (2)	1/2a (2)	1	0	0	0	1
R	2 (2)	1/2a (2)	0	0	0	2	0
S	2 (2)	1/2a (2)	1	1	0	0	0
T	2 (2)	1/2a (2)	0	0	1	0	1
U	2 (2)	1/2a (2)	0	2	0	0	0
V	2 (2)	1/2a (2)	0	0	0	0	2

W	2 (2)	1/2b (2)	2	0	0	0	0
X	1 (2)	1/2a (2)	1	0	1	0	0
Y	1 (2)	1/2a (2)	0	0	0	0	2
Izolati brez pulzoskopine	9 (9)	1/2a (4), 1/2b (2), 4b (3)	2	2	3	2	0

## 5 RAZPRAVA

V zadnjih petnajstih letih je postala listerioza ena izmed najbolj aktualnih, s hrano povezanih okužb ter velik problem zdravstvenih organov in živilske industrije. Okužba sicer ni pogosta, vendar je bolezen lahko izjemno huda in smrtnost visoka. Prav zaradi tega *L. monocytogenes* obravnavamo kot zelo resno patogeno bakterijo in enega izmed najpomembnejših vzrokov smrti, povezanih z okužbo s kontaminirano hrano v industrializiranih državah (Vazquez-Boland in sod., 2001; Painter in Slutsker, 2007).

V preteklosti so izvedli že več študij karakterizacije *L. monocytogenes* iz različnih okolij, največkrat je šlo za humane in živilske izolate (Grif in sod., 2006; Lukinmaa in sod., 2003a; Okwumabua in sod. 2005). Le redko pa so bili v take študije vključeni tudi živalski izolati ter izolati iz predelovalne industrije in naravnega okolja. In prav karakterizacija izolatov iz različnih tipov okolij je pomembna za razumevanje raznolikosti med tipi in podtipi sevov *L. monocytogenes*. Taki podatki so namreč ključnega pomena pri interpretaciji tipov in podtipov izolatov *L. monocytogenes* med preiskavami izbruhov listerioze ali prizadevanj nadzora okužb s to bakterijo.

Uporaba konvencionalnih serotipizacijskih metod v epidemiološke namene je razmeroma majhna, saj lahko večino sevov, ki jih povezujemo s humano listeriozo, uvrstimo v tri serološke skupine 1/2a, 1/2b in 4b (McLauchlin in sod., 2004). Ti podatki nam pri ugotavljanju poti širjenja okužb pri izbruhih listerioze in spremljanju raznolikosti sevov *L. monocytogenes* v različnih okoljih ne pomagajo veliko. V epidemioloških študijah uporabljamo serotipizacijo predvsem za določanje prevalence specifičnega serološkega tipa. Ker s serotipizacijo tudi ne moremo neposredno določiti vrste listerije, je ne moremo uporabljati za identifikacijo bakterije *L. monocytogenes* (van Belkum in sod., 2007).

Pri pojasnjevanju poti prenosa patogenega mikroorganizma, še posebej v primerih s sumom epidemiološke povezave, je smiselno uporabiti molekularne tipizacijske metode, saj omogočajo boljše razlikovanje med podtipi *L. monocytogenes*, kot konvencionalne tipizacijske metode. PFGE je tako postala široko uporabljana metoda za karakterizacijo izolatov *L. monocytogenes* in trenutno velja za zlati standard (Graves in Swaminathan, 2001) za subtipizacijo *L. monocytogenes*, saj ima veliko moč diskriminacije in je zato zelo uporabna predvsem pri epidemioloških študijah (Zelenik in sod., 2013).

V naši raziskavi s pomočjo klasične serotipizacije nismo uspeli determinirati večje raznolikosti med 185 izolati *L. monocytogenes*, saj smo med vsemi izolati odkrili le štiri serološke tipe: 1/2a (64,3 %), 4b (23,8 %), 1/2b (10,3 %) in 1/2c (1,6 %). Večina izolatov je pripadala serotipoma 1/2a in serotipu 4b. Prav ta dva serotipa pa sta poleg serotipa 1/2b ugotovljena pri večini sporadičnih primerov in izbruhov listerioze po svetu (Gianfranceschi in sod., 2009). Serotipe 1/2a, 1/2b in 4b smo odkrili pri izolatih izoliranih iz vseh petih okolij. Serotip 1/2c pa je bil prisoten le pri izolatih iz živilskih in humanih vzorcev.

V vseh okoljih je bilo največ izolatov serotipa 1/2a. Predvsem pa se je njegovo prevladovanje med izolati opazilo pri vzorcih iz klavnic ter živalskih in živilskih vzorcih. Pri izolatih izoliranih iz kliničnih vzorcev humanega izvora ter iz vzorcev naravnega okolja pa je bilo število izolatov serotipov 1/2a in 4b bolj izenačeno, vseeno pa je prevladoval serotip 1/2a. V številnih novejših študijah (Lukinmaa in sod., 2003b; Pak in sod., 2002;

Loncarevic in sod., 1998) so opazili, da se pri humanih kliničnih vzorcih vse pogosteje pojavlja serotip 1/2a in, da le ta počasi zamenjuje serotip 4b. Razlog za to je lahko dejstvo, da postaja sepsa pogostejša klinična oblika listerioze kot meningoencefalitis. Iz krvi pa pogosteje izoliramo serotipa 1/2a in 1/2b kot 4b (Swaminathan in sod., 2007; Gianfranceschi in sod., 2009).

V naši raziskavi je pri vseh serotipiziranih izolatih *L. monocytogenes* prišlo do ujemanja seroloških tipov ugotovljenih s klasično serotipizacijsko metodo in z metodo serotipizacije z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Z izvedbo klasične serotipizacije nismo imeli nobenih težav, čeprav je znano, da je metoda dokaj subjektivna in da so v preteklosti ugotovili, da lahko pride med laboratoriji do številnih razlik v rezultatih (Schijnberg in sod., 1996). V našem primeru je torej klasična serotipizacijska metoda primerljiva z molekularno serotipizacijsko metodo verižne reakcije s polimerazo. Glede na to, da je metoda PCR bistveno hitrejša in hkrati tudi bolj objektivna kot metoda klasične serotipizacije, bi lahko ta počasi zamenjala klasično metodo.

Subtipizacijska metoda PFGE omogoča bistveno bolj občutljivo razlikovanje med posameznimi izolati *L. monocytogenes*. Prav zato smo jo uporabili poleg serotipizacije, saj smo tako lahko ugotovili večjo raznolikost, porazdelitev in ekološko pripadnost bakterije *L. monocytogenes* v različnih okoljih.

Rezultate smo analizirali tudi s pomočjo računalniškega programa BioNumerics, ki omogoča medsebojno primerjavo pulzotipov in izdelavo dendrogramov. Naš kriterij za razvrščanje izolatov v podtipe je bila 80 % skladnost med pulzotipi. Po kriterijih, ki jih je leta 1995 opisal Tenover s sodelavci, razlika v enem pasu restrikcijskega vzorca pomeni tesno povezanost izolatov. Po novejših priporočilih (Barrett in sod., 2006; Felix in sod., 2012) pa je razlika v enem pasu dovolj za razlikovanje med izolati. Pri vseh naših izolatih je bila narejena restrikcija z dvema endonukleazama (*AscI* in *ApaI*). V programu BioNumerics pa je bila primerjava med izolati narejena le na podlagi encima *ApaI*.

Prevladujoče pulzoscupine in podtipe smo našli pri izolatih *L. monocytogenes* izoliranih iz različnih okolij (preglednica 32). V nekaterih večjih pulzoscupinah so izolati, ki so kazali homologijo v serološkem tipu in podtipu, izhajali iz različnih okolij (priloga B). To se je pokazalo že v nekaterih prejšnjih študijah (Gray M. J. in sod., 2004; Sauders in sod., 2004), kjer so ugotovili, da izolati *L. monocytogenes*, ki izhajajo iz različnih virov, predstavljajo posebno, a hkrati prekrivajočo populacijo.

Nekatere pulzoscupine so bile dokaj homologne glede prevladujočega serotipa in vrste okolja. V pulzoscupini **A**, ki je vključevala največje število izolatov (26) in 16 podtipov, so bili prisotni izolati *L. monocytogenes* izolirani iz vzorcev tkiva živali (8), živil (7), naravnega okolja (3), klavnic (3) in človeškega tkiva (5). Prevladovali so izolati iz tkiv živali in iz živil. Vsi izolati niso pripadali enakemu serološkemu tipu. Serotipu 4b je pripadalo 24 izolatov, 2 pa sta pripadala serotipu 1/2b.

V pulzoscupini **B**, ki je vključevala 25 izolatov, so bili zajeti izolati iz vseh okolij, z izjemo humanih izolatov. Vsi izolati so imeli enak serotip (1/2a). Prevladovali pa so živalski (6) in živilski (17) izolati.



Pulzoscupina **C** je vključevala 18 izolatov, od tega pa jih je kar 11 izhajalo iz vzorcev živil. Tudi tu so imeli vsi izolati enak serotip (1/2a).

Pulzoscupina **D** je edina, kjer so bili vključeni izolati kar treh različnih seroloških tipov. Večina (13) izolatov je sicer pripadala serotipu 4b, po en izolat pa je pripadal serotipu 1/2a in 1/2b. Pulzoscupina je vključevala izolate iz vseh okolij razen živil.

Pulzoscupine **E**, **F** in **G** so vključevale po 13, 12 in 11 izolatov in v vsaki so močno prevladovali izolati iz enega okolja. V pulzoscupini E so bili izolati *L. monocytogenes* iz klavnic, v primeru pulzoscupine F izolati iz živil, v pulzoscupini G pa izolati iz živalskega tkiva.

V nekaterih študijah (Gilbreth in sod., 2005; Nadon in sod., 2001) so ugotovili, da je na podlagi PFGE izolate mogoče razvrstiti v filogenetske linije oz. skupine. V filogenetsko skupino I so uvrstili izolate s serotipi 1/2b, 3b, 4b, 4d in 4e, v filogenetsko skupino II pa izolate s serotipi 1/2a, 1/2c in 3a. Redko pa so prisotni izolati 4a in 4c, ki sodijo v filogenetsko skupino III. Z našo raziskavo tega sicer nismo uspeli pokazati. Razlog za to pa je bil, da je bila naša raziskava drugače zastavljena. Nismo namreč načrtno vzorčili in zato so bili naši vzorci zelo razpršeni, poleg tega smo vključili vzorce iz petih različnih okoljih, za razliko od ostalih študij.

Omeniti še velja, da smo v naši raziskavi za PFGE uporabljali restrikcijske encime *ApaI* treh različnih proizvajalcev. Na začetku dela smo uporabljali restrikcijski encim *ApaI* proizvajalca Roche Diagnostics (Mannheim, Nemčija). Ta ima založno koncentracijo 40U/μl in optimalno inkubacijsko temperaturo restrikcije 30 °C. Uporaba tega encima je priporočena s strani EU-RL (European Union Reference Laboratory) in z njegovo uporabo smo dobili zadovoljive rezultate oziroma dobro ločljivost podtipov. Nato smo uporabljali restrikcijski encim *ApaI* proizvajalca Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, ZDA, kupljenega pod nekdanjo zaščitno znamko Fermentas, Vilna, Litva) z založno koncentracijo 10U/μl in optimalno inkubacijsko temperaturo restrikcije 37 °C. Tudi ob uporabi encima tega proizvajalca je bila kvaliteta podtipov zadovoljiva, vendar je bil volumen porabe encima za pripravo restrikcijske mešanice bistveno višji od encima *ApaI* proizvajalca Roche Diagnostics, saj je bila njegova založna koncentracija manjša. Uporaba večje količine encima ima dve slabosti. V shranjevalnem pufru encimov je prisoten glicerol in večja poraba encimske raztopine vodi do večje koncentracije glicerola v restrikcijski mešanici, kar ima lahko za posledico slabe rezultate restrikcije. Poleg tega so zaradi večje porabe encima potrebne tudi večje zaloge tega v laboratoriju. Zaradi tega smo se odločili za restrikcijo uporabiti encim *ApaI* proizvajalca New England Biolabs (Ipswich, MA, ZDA), z založno koncentracijo 50 U/μl in optimalno inkubacijsko temperaturo restrikcije 25 °C. Presenečeno smo ugotovili, da je bila kvaliteta podtipov slaba. Kvaliteta podtipov se je bistveno izboljšala, če smo po restrikciji, restrikcijsko mešanico odstranili in jo zamenjali z enako količino TE pufra ter inkubirali čez noč v hladilniku (pri temperaturi 4 °C) in nato elektroforezo izvedli šele naslednji dan. Uporaba restrikcijskih encimov različnih proizvajalcev ima torej vpliv na kvaliteto *ApaI* podtipov *L. monocytogenes*, kot smo že opisali v literaturi (Kušar in sod., 2013).

Iz analize dendrograma PFGE sicer težko sklepamo o bistvenih povezavah med podtipi *L. monocytogenes* iz različnih okolij. V nedavnih primerih listerioze pri živalih in ljudeh v Sloveniji pa smo z metodo PFGE lahko potrdili ali ovrgli identičnost povzročitelja, kar potrjuje našo hipotezo, da bodo imele uporabljene tipizacijske metode zadostno moč

razlikovanja za določitev različnih podtipov, ki se pojavljajo v okolju. Problem se pojavi le v primerih, ko so izolati zelo podobni (vendar ne enaki) in je interpretacija odvisna od kriterijev, ki jih določimo za razlikovanje med izolati.

Na podlagi subtipizacije s PFGE smo ugotovili veliko raznolikost izolatov, ki pa so bili le v posameznih primerih značilni za določeno vrsto vzorca, zato hipoteze, da bodo podtipi, ki jih najpogosteje odkrijemo v živilih identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh, nismo mogli v celoti potrditi. Verjetno je razlog tudi v tem, da so bili številni izolati *L. monocytogenes* krajevno in časovno zelo oddaljeni, pri številnih pa so nam manjkali tudi ključni epidemiološki podatki. Zaradi tega je bilo s pomočjo metode PFGE zelo težko najti podobnost in povezave med posameznimi podtipi. Za potrditev te hipoteze bi bila potrebna skrbno načrtovana epidemiološka študija, ki bi zajela vse tipe vzorcev v določenem časovnem obdobju.

V analizo smo vključili tudi sedem izolatov *L. monocytogenes* iz surovega mleka (priloga B). Kljub temu, da so bili izolati istega izvora, so se uvrstili v dve pulzoscupini, znotraj vsake pa so imeli izolati identičen restrikcijski vzorec. V pulzoscupino B smo poleg izolatov iz surovega mleka uvrstili še sedem izolatov *L. monocytogenes* iz mleka krav ene izmed slovenskih kmetij. Štirje izmed teh izolatov so imeli enak restrikcijski vzorec kot izolati iz surovega mleka, z ostalimi tremi pa je bila sorodnost 96,8 %. Zaradi tega obstaja velika verjetnost, da je izvor vseh vzorcev mleka enak. Vsi izolati so imeli tudi enak serotip (1/2a).

Med živilske izolate smo vključili tudi izolate, pri katerih smo predvidevali, da bodo imeli enak oz. zelo podoben restrikcijski vzorec (priloga B). Takih je bilo osem vzorcev, kjer je šlo za mesni pripravek istega proizvajalca. Ugotovili smo, da so se vsi izolati uvrstili v isto pulzoscupino (B), vendar pa med seboj niso bili popolnoma identični. Pet izolatov je imelo enak restrikcijski vzorec, in le ta se je v 96,8 % ujema še z izolatom iz mešanega mletega mesa. Obstaja možnost, da je tudi mešano meso izviralo od istega proizvajalca. Ostali trije so imeli enak restrikcijski vzorec kot izolat iz tkiva bezgavk srne. Slednje je nekoliko nenavadno, saj nismo našli nobene povezave med izolati. Analizirali smo tudi dva izolata (L173, L193) iz mesnih pripravkov istega proizvajalca, ki nista imela identičnih restrikcijskih vzorcev, a sta se uvrstila v isto pulzoscupino (F). Vsi izolati pa so imeli enak serotip (1/2a).

## EPIDEMIOLOŠKE POVEZAVE KLINIČNIH IZOLATOV

Z metodo PFGE ugotavljamo sorodnost med posameznimi izolati bakterij. V primerih, ko so vzorci zelo časovno in prostorsko razpršeni pa težko najdemo kakšno povezavo. Metodo je zato najbolje uporabiti v primeru izbruhov ali epidemij, saj tako najlažje spremljamo širjenje okužb in neposredno povezavo med izolati. Leta 2013 je prišlo na eni izmed slovenskih kmetij do več primerov pojava listerioze pri živalih, od katerih jih je nekaj tudi poginilo. Zbolelo je več koz in ovac. Poleg vzorcev različnih živalskih tkiv so bili odvzeti tudi vzorci naravnega okolja, med drugim tudi voda iz domačega zajetja in silaža. Kar 11 vzorcev je bilo pozitivnih na *L. monocytogenes*. Vsi izolati *L. monocytogenes* so pripadali serotipu 1/2a in uvrstili smo jih v svojo pulzoscupino G. Izmed enajstih izolatov jih je imelo osem enak restrikcijski vzorec, restrikcijski vzorci ostalih treh izolatov pa so se le malo razlikovali. Podobnost med njimi je bila 95,2 % oz. 97,7 %.

V poletnih mesecih 2013 so v Sloveniji za listeriozo zboleli tudi trije ljudje. Zaradi tega je bila izvedena epidemiološka preiskava, v kateri so sodelovali tudi delavci medicinske in veterinarske stroke. Med drugim je bilo izvedeno tudi poizvedovanje v zvezi z zgodovino prehrane okuženih ljudi. Na prisotnost *L. monocytogenes* je bilo testiranih nekaj izdelkov živil iz trgovin, kjer so bolniki kupovali hrano. Prisotnost listerij je bila ugotovljena v enem izmed mesnih izdelkov, ki ga sicer noben izmed bolnikov ni kupil, a ugotovljeno je bilo, da so v isti trgovini kupovali različne narezane salame. *L. monocytogenes* je bila izolirana tudi iz brisov površin. S pomočjo metode PFGE smo lahko ugotovili, da so nekateri izolati *L. monocytogenes* povezani (priloga B). Vsi izolati *L. monocytogenes* so pripadali serotipu 1/2a. Uvrstili pa smo jih v dve pulzoscupini (Q in C). V pulzoscupino C smo uvrstili kar sedem od skupaj osmih izolatov. Ugotovili smo, da imata dva humana izolata (L595, L596) enak restriksijski vzorec, ki se le v manjši meri razlikuje od izolatov iz živil (L590, L591) in brisov salamoreznic (L592, L593). Podobnost med obema genetskima skupinama je bila 96,2 %. V primerih, kjer je podobnost zelo velika, je odločitev o tem, ali gre za isti tip zelo težka in je odvisna od meril, ki jih določimo za interpretacijo. Po kriterijih, ki jih je opisal Tenover s sod. (1995), razlika v enem pasu restriksijskega vzorca pomeni tesno povezanost izolatov. Po novejših priporočilih (Barrett in sod., 2006; Felix in sod., 2012) pa je razlika v enem pasu dovolj za razlikovanje med izolati. Tretji humani izolat (L594) se je uvrstil v drugo pulzoscupino (Q).

V analizo je bil vključen tudi izolat *L. monocytogenes* (L491) iz gnojnih sprememb na koži veterinarja, ki so se razvile po tem, ko je ta pomagal pri porodu mrtvorojenega telička. *L. monocytogenes* pa je bila izolirana tudi iz posteljice krave (102/07). Izolata smo s pomočjo PFGE uvrstili v pulzoscupino A (preglednica 32 in priloga B). Izolata imata enak serološki tip (4b), med restriksijskima vzorcema pa obstaja 99,3 % podobnost. Zanimivo pa je, da se restriksijski vzorec izolata iz sprememb na koži ujema z restriksijskim vzorcem iz možganskega tkiva goveda (L230) in vzorcem izolata *L. monocytogenes* iz potoka Globovnica (L365). Restriksijski vzorec izolata iz abortiranega plodu goveda pa se ujema z restriksijskimi vzorci več različnih izolatov: možganskega tkiva koze (L199, L210), možganskega tkiva ovce (L202, L209), zaseke (L270) in hemokulture človeka (L509). Kot že zgoraj omenjeno je podobnost med obema genetskima skupinama 99,3 % (Zelenik in sod., 2013).

Iz dendrograma (priloga B) in preglednice 32 je razvidno tudi, da je bila pri naših izolatih prisotna zelo velika raznolikost, saj je večina pulzoscupin (17) zelo majhnih in vsebujejo pet ali manj izolatov. Veliko (9) je tudi izolatov, ki jih nismo uspeli uvrstiti v nobeno izmed pulzoscupin. Za bolj homologne rezultate bi morali vzorčiti bolj načrtno. Problem pa predstavljajo tudi pomanjkljivi podatki o izolatih. Pri izolatih *L. monocytogenes* iz humanih kliničnih in patoloških vzorcev nas je omejevala anonimnost pacientov, saj kar za 9 od 28 izolatov nismo poznali mesta odvzema vzorca oziroma njegovega porekla. Poleg tega o bolnikih ne poznamo nobenih drugih informacij, npr: kraj bivanja, spol in predispozicijske dejavnike tveganja za okužbo. Ne vemo tudi, če so morda imeli stik z okuženo živaljo.

V klavnicah je bila večina izolatov *L. monocytogenes* izoliranih iz vzorcev zraka. Zanimivo bi bilo istočasno vzorčiti še brise določenih površin in primerjati izolirane tipe listerij. Pri izolatih *L. monocytogenes* iz naravnega okolja imamo največ podatkov, vendar

tudi ti niso vedno popolni. Poleg tega so bili nekateri vzorci odvzeti iz mest, v bližini katerih ni kmetij in zato težko iščemo povezavo med izolati iz naravnega okolja in iz živali. Pri izolatih iz kliničnih in patoloških vzorcev živali so nam manjkali predvsem podatki o lokaciji obolelih živali. Smiselno bi bilo na isti kmetiji odvzeti še vzorce zemlje, vode in gnoja in iskati morebitno povezanost med izolati. Pri vzorcih živil pa so nam manjkali predvsem podatki o proizvajalcu živila in pri vzorcih mesnih izdelkov tudi morebitna povezava s klavnicami.

Poleg pomanjkljivih podatkov o vzorcih, ne smemo zanemariti tudi dejstva, da so bili izolati zbrani v časovnem razponu več let. Zaradi tega je tudi težje najti povezave med izolati *L. monocytogenes*.

Za boljši pregled stanja bi bilo potrebno izvesti študijo, kjer bi izbirali vzorce le v določenem časovnem obdobju in bi tudi načrtno in čim bolj podrobno zbirali podatke o poreklu vzorca in lokaciji vzorčenja. Glavni problem tega pa je, da so take študije zelo drage in zahtevne za izvedbo. Poleg tega pa je v Sloveniji letno zelo malo primerov listerioze pri ljudeh in pri živalih, zato bi verjetno pridobili zelo malo kliničnih izolatov *L. monocytogenes*.

## 6. ZAKLJUČKI

*Listeria monocytogenes* je sicer ubikvitarna bakterija, vendar v določenih okoliščinah lahko povzroča listeriozo, ki je ena izmed najpomembnejših vzrokov smrti, povezanih z okužbo s kontaminirano hrano.

Za pomoč pri ugotavljanju širjenja okužb uporabljamo različne metode tipizacije bakterijskih sevov. Hitro in učinkovito razlikovanje med sorodnimi bakterijskimi izolati je namreč izjemnega pomena za epidemiološki nadzor nalezljivih bolezni. V času epidemije je hitro ukrepanje nujno, s pomočjo tipizacije pa lahko identificiramo epidemiološko povezane izolate ter določimo rezervoar in poti širjenja okužbe.

V naši raziskavi smo uporabili genotipizacijske metode (verižna reakcija s polimerazo, ang. polymerase chain reaction - PCR in pulzna gelska elektroforeza, ang. pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) skupaj s klasičnimi metodami serotipizacije za določitev genskega profila, ki je bil osnova za analizo poti in načinov prenosa *L. monocytogenes*. Skupno smo analizirali 185 izolatov, ki smo jih izolirali iz petih različnih okolij: živali, živil, naravnega okolja, klavnic in ljudi.

Za serotipizacijo listerij smo uporabili klasično metodo s pomočjo komercialnih antiserumov in molekularno metodo PCR. Ugotovili smo, da sta metodi med sabo dobro primerljivi, saj je pri vseh serotipiziranih izolatih *L. monocytogenes* prišlo do ujemanja seroloških tipov ugotovljenih s klasično serotipizacijsko metodo in z metodo tipizacije s PCR, vendar pa je metoda PCR bistveno hitrejša in bolj objektivna od klasične serotipizacije. Prav zaradi tega bi lahko ta počasi zamenjala klasično metodo. Za vsak vzorec smo izvedli dva različna PCR pomnoževanja, z enim smo dobili šest produktov, z drugim pa enega, za interpretacijo rezultatov sta pomembna oba.

Glavni problem serotipizacijskih metod pa je njihova omejena vrednost za epidemiološko poizvedovanje. Večina humanih kliničnih in živilskih sevov vrste *L. monocytogenes*

namreč sodi v 4 serološke tipe 1/2a, 1/2b, 1/2c in 4b. Prav zaradi tega nam serološke metode dajo preveč ohlapne podatke za iskanje poti širjenja okužb. To smo ugotovili tudi v naši raziskavi. S pomočjo serotipizacije namreč nismo uspeli determinirati večje raznolikosti med 185 izolati *L. monocytogenes*, saj smo med vsemi izolati odkrili le štiri najpogostejše serološke tipe: 1/2a (64,3%), 4b (23,8%), 1/2b (10,3%) in 1/2c (1,6%).

Kot epidemiološko orodje je zato bistveno boljša metoda PFGE. Je ena izmed najbolj ponovljivih molekularnih tipizacijskih metod z visoko ločljivostjo med posameznimi izolati, zato jo uporabljamo tudi za subtipizacijo listerij. Z njeno pomočjo namreč lahko ocenimo razlike oz. spremembe v genomih bakterijskih izolatov in tako določimo njihovo medsebojno podobnost oziroma sorodnost. Prav to pa je ključno pri odkrivanju vira izbruha in poti širjenja okužbe pri pojavu epidemij. Rezultate, ki smo jih pridobili z metodo PFGE smo analizirali s pomočjo računalniškega programa BioNumerics; primerjava med izolati je narejena le na podlagi encima *ApaI*. Program omogoča izdelavo dendrogramov, na podlagi katerih smo izolate *L. monocytogenes* razvrstili v preglednico. Naš kriterij za razvrščanje izolatov v podtipe je bila 80 % skladnost med pulzotipi. Večino živalskih izolatov *L. monocytogenes* smo uvrstili v pulzoskopine A, B in G, večino živilskih izolatov v pulzoskopine B, C in F, večino izolatov iz naravnega okolja v pulzoskopino D, večino izolatov iz klavnic v pulzoskopino E in večino humanih izolatov v pulzoskopine A, C, D in J.

Z metodo PFGE smo uspeli potrditi hipotezo, da bodo imele naše uporabljene tipizacijske metode zadostno moč razlikovanja za določitev različnih podtipov, ki se pojavljajo v okolju. Problem se je pojavil le v primerih, ko so izolati zelo podobni (vendar ne enaki) in je bila interpretacija odvisna od kriterijev, ki smo jih določili za razlikovanje med izolati. S pomočjo PFGE smo ugotovili veliko raznolikost izolatov, ki pa so bili le v posameznih primerih značilni za določeno vrsto vzorca, zato hipoteze, da bodo podtipi, ki jih najpogosteje odkrijemo v živilih identični s tistimi, ki najpogosteje povzročajo klinična obolenja pri ljudeh, nismo mogli v celoti potrditi. Verjetno je razlog tudi v tem, da so bili številni izolati *L. monocytogenes* krajevno in časovno zelo oddaljeni, pri številnih pa so nam manjkali tudi ključni epidemiološki podatki. Zaradi tega je bilo s pomočjo metode PFGE zelo težko najti podobnost in povezave med posameznimi podtipi. Za potrditev te hipoteze bi bila potrebna skrbno načrtovana epidemiološka študija, ki bi zajela vse tipe vzorcev v določenem časovnem obdobju.

Za boljši pregled stanja bi bilo potrebno izvesti načrtno študijo, kjer bi izbirali vzorce le v določenem časovnem obdobju in bi tudi čim bolj podrobno zbirali podatke o poreklu vzorca in lokaciji vzorčenja.

Shranili smo vse izolate, ki smo jih pridobili v posameznih fazah raziskave in jih serotipizirali s klasičnimi in molekularnimi metodami. Na podlagi subtipizacije z metodo PFGE smo opravili epidemiološke analize, v katere smo vključili tudi človeške izolate. V raziskavi smo sodelovali strokovnjaki različnih strok, kar je prispevalo k prenosu znanja in uporabi usklajenih modernih metod (PCR, PFGE) za izdelavo strokovnih podlag v smislu preprečevanja kontaminacije živil z *L. monocytogenes*. Rezultati naše raziskave so pomemben prispevek k proizvodnji zdrave, neoporečne hrane in izboljšanju javnega zdravja.

## LITERATURA

- Audits International/FDA. 1999. U.S. food temperature evaluation: Design and summary pages. Maryland, Audits International U.S. Food and Drug Administration: 13 str.  
[http://foodrisk.org/default/assets/File/Audits-FDA\\_temp\\_study.pdf](http://foodrisk.org/default/assets/File/Audits-FDA_temp_study.pdf) (maj, 2013)
- Barrett T. J., Gerner-Smidt P., Swaminathan B. 2006. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3: 20-31
- Borucki M. K., Call D. R. 2003. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 12: 5537-5540
- CDC. 2013. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*. Atlanta, PulseNet ZDA, Centers for disease control and prevention: 11 str.  
<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf> (avgust 2013)
- D'Agostino M., Wagner M., Vazquez-Boland J. A., Kuchta T., Karpiskova R., Hoorfar J., Novella S., Scotti M., Ellison J., Murray A., Fernandes I., Kuhn M., Pazlarova J., Heuvelink A., Cook N. 2004. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model - Towards an international standard - DTU Orbit. *Journal of Food Protection*, 67, 8: 1646-1655
- Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 8: 3819-3822
- EFSA. 2008. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness, Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA Journal*, 6, 1: 599, doi: 10.2903/j.efsa.2008.599: 42 str.
- EFSA. 2012. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10, 3: 2597, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2597: 442 str.
- Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2012. 2013. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 107 str.  
[http://www.ivz.si/gradiva\\_nalezljive\\_bolezni?pi=5&\\_5\\_Filename=attName.png&\\_5\\_MediaId=7727&\\_5\\_AutoResize=false&pl=105-5.3](http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=attName.png&_5_MediaId=7727&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3). (januar 2014)
- Félix B., Brisabois A., Dao T. T., Lombard B., Asséré A., Roussel S. 2012. The use of pulsed field gel electrophoresis in *Listeria monocytogenes* sub-typing: harmonization at the European Union level. V: *Gel electrophoresis: Principles and basics*. Sameh M. (ed.). Rijeka, InTech: 241-254
- Gasnov U., Hughes D., Hansbro P. M. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 851-875
- Gianfranceschi M. V., D'Ottavio M. C., Gattuso A., Bella A., Aureli P. 2009. Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002–2005). *Food Microbiology*, 26: 520-526
- Gilbreth S. E., Call J. E., Wallace F. M., Scott V. N., Chen Y., Luchansky J. B. 2005. Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 8115–8122
- Graves L. B., Swaminathan B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 65: 55–62

- Gray M. J., Zadoks R. N., Fortes E. D., Dogan B., Cai S., Chen Y., Scott V. N., Gombas D. E., Boor K. J., Wiedmann M. 2004. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5833–5841
- Grif K., Heller I., Wagner M., Dierich M., Wurznner R. 2006. A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Austria by automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3: 138–141
- Griffiths M. W. 2003. *Listeria* properties and occurrence. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 6. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3562–3573
- ILSI research foundation. 2005. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - A risk-based approach. *Journal of Food Protection*, 68, 9: 1932-1994
- Interpretive summary: Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. 2003. Washington, Center for Food Safety and Applied Nutrition/FDA: 27 str.  
<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM197329.pdf> (junij 2013)
- ISO 11290-2:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. 1998: 28 str.
- Kérouanton A., Marault M., Petit L., Grout J., Dao T. T., Brisabois A. 2010. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 80: 134-137
- Khelef N., Lecuit M., Buchrieser C., Cabanes D., Dussurget O., Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. V: *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer Science Business Media: 404-476
- Kušar D., Kavalič M., Ocepek M., Zdovc I. 2013. Report on overcoming the poor quality of *ApaI* pulsotypes with a short review on PFGE for *Listeria monocytogenes*. *Polish Journal of Microbiology*, 62, 3: 307-309
- Lado B. H., Yousef A. E. 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. V: *Listeria, listeriosis and food safety*. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, CRC Press: 305-356
- Lahuerta A., Westrell T., Takkinen J., Boelaert F., Rizzi V., Helwigh B., Borck B., Korsgaard H., Ammon A., Mäkelä P. 2011. Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics - the EFSA-ECDC summary report 2009. *Euro Surveill*, 16, 13: 1-4
- Loncarevic S., Tham W., Danielsson-Tham M. L. 1998. Changes in serogroup distribution among *Listeria monocytogenes* human isolates in Sweden. V: *Proceedings of XIII international symposium on problems of listeriosis*. Halifax, Nova Scotia, Canada June 28-July 21. 1998: 20-20
- Lukinmaa S., Aarnisalo K., Suihko M. L., Siitonen A. 2003a. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed field gel electrophoresis. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 562–568
- Lukinmaa S., Miettinen M., Nakari U. M., Korkeala H., Siitonen A. 2003b. *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero- and genotypes during an 11-year period in Finland. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1694–1700
- Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11<sup>th</sup> ed. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings: 378-379

- McLauchlin J., Mitchell R. T., Smerdon W. J., Jewell K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 15-33
- Nadon C.A., Woodward D.L., Young C., Rodgers F.G., Wiedmann M. 2001. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 7: 2704–2707
- Norton D. M. in Braden C. R. 2007. Foodborne listeriosis. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, CRC Press: 305-356
- Okwumabua O., O'Connor M., Shull E., Strelow K., Hamacher M., Kurzynski T., Warshauer D. 2005. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from food animal clinical cases: PFGE pattern similarity to strains from human listeriosis cases. *FEMS Microbiology Letters*, 249: 275–281
- Painter J., Slutsker L. 2007. Listeriosis in humans. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton. CRC Press: 85-110
- Pak S.I., Spahr U., Jemmi T., Salman M. D. 2002. Risk factors for *Listeria monocytogenes*: contamination of dairy products in Switzerland, 1990–1999. *Preventive Veterinary Medicine*, 53: 55–65
- Pirš T., Zdovc I., Gombač M., Švara T., Juntos P., Vengušt M. 2005. *Listeria monocytogenes* septicaemia in a foal. *Slovenian veterinary research*, 42: 49-53
- Poljak M. 2007. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129-142
- Poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2010. 2011. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava RS: 79 str.
- QIAxcel<sup>®</sup> DNA handbook. 2013. 4<sup>th</sup> ed. Hilden, Germany, QIAGEN: 56 str.  
<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=f6158498-a857-4a2f-b40b-569fba3793e2>
- Quinn P. J., Markey B. K., Leonard F. C., Hartigan P., Fanning S., Fitz Patrick E. S. 2011. Pathogenic bacteria. V: Microbiology and microbial disease. Sayers M. (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. West Sussex, Wiley-Blackwell: 179-411
- Rapley R. 2010. Molecular biology, bioinformatics and basic techniques. V: Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Wilson K. Walker J. (eds.). 7<sup>th</sup> ed. New York, Cambridge University Press: 138-194
- Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. 2004. Microbiological risk assessment series. Switzerland, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization: 78 str.  
<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf?ua=1> (junij 2013)
- Sauders B. D., Mangione K., Vincent C., Schermerhon J., Farchione C. M., Dumas N. B., Bopp D., Kornstein L., Fortes E. D., Windham K., Wiemann M. 2004. Distribution of *Listeria monocytogenes* molecular subtypes among human and food isolates from New York State shows persistence of human disease-associated *Listeria monocytogenes* strains in retail environments. *Journal of Food Protection*, 67: 1417–1428
- Sauders B. D. in Wiedmann M. 2007. Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the natural environment. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, CRC Press: 21-54



- Schijnberg A., Bannerman E., Courtieuc A. L., Kissd E., McLauchlin J., Shah S., Wilhelms D. 1996. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 32: 279-287
- Schmitt-Kopplin P. 2008. Capillary electrophoresis: Methods and protocols V: Methods in molecular biology. Walker J. M. (eds.). Neuberberg, Humana Press: 415-428
- Swaminathan B., Gerner-Smidt P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9: 1236-1243
- Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2233-2239
- van Belkum A., Tassios P. T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N. K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13, 3: 1-46
- Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 3: 584-640
- Wesley I. V. 2007. Listeriosis in animals. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser L. T., Marth E. H. (eds.). 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, CRC Press: 55-84
- Zdovc I., Mijovič, A., Ocepek M., Pate M., Krt B. 2004. Ugotavljanje bakterije *Listeria monocytogenes* v odprtih vodah. V: Preventiva pred širjenjem zoonoz in drugih nalezljivih bolezni v okolju: zbornik referatov 2. interdisciplinarnega simpozija DDD, zdravje in okolje z mednarodno udeležbo. Berger, T., Dobeic M., Vudrag M. (ur.). Ljubljana, Slovenska veterinarska zveza, Sekcija za DDD in higieno okolja, Zavod za zdravstveno varstvo, Slovensko društvo za bolnišnično higieno: 23-28
- Zelenik K., Avbersek J., Pate M., Lusicky M., Krt B., Ocepek M., Zdovc I. 2013. Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission – A case report. *Zoonoses and Public Health*: doi: 10.1111/zph.12075: 10 str. (v tisku)

**Objavljeni prispevki raziskovalcev projektne skupine, ki so nastali v neposredni povezavi z raziskovalnim projektom:**

- BIASIZZO, Majda, GREBENC, Stanka, KIRBIŠ, Andrej, HENIGMAN, Urša. Izdelava študije ugotavljanja sposobnosti razmnoževanja bakterije *Listeria monocytogenes* v živilih za neposredno uživanje. V: Veliki spomladanski živilski seminar, 17. junij 2011, Ljubljana. *Zakonodaja in trendi: seminar : gradivo za interno uporabo*. Ljubljana: Gospodarska zbornica Slovenije, 2011, str. 1-7.
- BIASIZZO, Majda, GREBENC, Stanka, HENIGMAN, Urška, KIRBIŠ, Andrej. Contamination of dried meat products with *Listeria monocytogenes*. V: 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology), Maribor, 12th - 15th October 2011. JANEŽIČ, Sandra (ur.), et al. *Abstract book*. Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2011, str. 132.
- BIASIZZO, Majda, GREBENC, Stanka, HENIGMAN, Urška, KIRBIŠ, Andrej. Primerjava med uspešnostjo izolacije bakterije *L. monocytogenes* iz vzorcev mesnih izdelkov sestavljenih iz petih enot in združenih vzorcev. V: 4. slovenski veterinarski kongres 2011, Portorož, 18. do 19. november 2011. MAJDIČ, Gregor (ur.). *Program in zbornik referatov*, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Supplement, 13). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2011, vol. 48, suppl. 13, str. 125-128.
- BIASIZZO, Majda. Univerza v Ljubljani : Veterinarska fakulteta : Nacionalni veterinarski inštitut. V: *Možnosti uporabe različnih metod na področju mikrobioloških preiskav živil*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Center za podiplomski študij in permanentno izobraževanje, 2014, str. 1-9. [COBISS.SI-ID [3796346](#)]
- BIASIZZO, Majda. Vzorčenje živil, surovin in površin. V: *Možnosti uporabe različnih metod na področju mikrobioloških preiskav živil*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Center za podiplomski študij in permanentno izobraževanje, 2014, str. 1-11. [COBISS.SI-ID [3798394](#)]
- DOBEIC, Martin, KENDA, Edvard, MIĆUNOVIĆ, Jasna, ZDOVC, Irena. Airborne *Listeria* spp. in the red meat processing industry. *Czech Journal of Food Sciences*, ISSN 1212-1800, 2011, vol. 29, no. 4, str. 441-447.
- DOBEIC, Martin, PINTARIČ, Štefan, ZDOVC, Irena, ŠTRANCAR, Janez. *Potencialne možnosti upotrebe biocidnih nano titanat prevlaka u industriji prerade mesa : [predavanje na akreditovanom predavanju "Nanotehnologija u medicini", Fakultet veterinarske medicine Univerziteteta u Beogradu, Beograd, 4. april 2013]*. Beograd: Srpsko veterinarsko društvo, 2013.
- DOBEIC, Martin, PINTARIČ, Štefan, ZDOVC, Irena, GOLOB, Majda, KOKLIČ, Tilen, KURE, Sandra, ŠTRANCAR, Janez. Titanate nanotubes as antibacterial coatings for control of *Listeria* in food plants. V: *Proceedings of the 15th*

International Congress of the International Society for Animal Hygiene, July 3 - 7, Vienna, Austria. KÖFER, Josef (ur.), SCHOBESBERGER, Hermann (ur.). *XV ISAH Congress 2011. Animal hygiene and sustainable livestock production : innovations in hygiene, nutrition and housing for healthy food from healthy animals*. Brno: ISAH, 2011, str. 1171-1173.

- DOBEIC, Martin, PINTARIČ, Štefan, ZDOVC, Irena, ŠTRANCAR, Janez. Naše iskustvo pri praktičnoj primeni nanomaterijala za dezinfekciju površina. V: 23. Savetovanje veterinarara Srbije, Zlatibor, 13.-16. septembar 2012. RADENKOVIĆ-DAMNJANOVIĆ, Brana (ur.). *Zbornik radova*. Beograd: Srpsko veterinarsko društvo, 2012, str. 203-207.
- GOLOB, Majda, MIJOVIČ, Aljoša, KRT, Branko, ZDOVC, Irena. *Listeria monocytogenes* v surovem mleku iz hlevskega vzorca - kako najti vir kontaminacije. V: 4. slovenski veterinarski kongres 2011, Portorož, 18. do 19. november 2011. MAJDIČ, Gregor (ur.). *Program in zbornik referatov*, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Supplement, 13). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2011, vol. 48, suppl. 13, str. 296-299.
- GREBENC, Stanka, BIASIZZO, Majda, HENIGMAN, Urška, KIRBIŠ, Andrej. Potek mikrobioloških analitskih postopkov v higieni živil. V: Veliki spomladanski živilski seminar, 17. junij 2011, Ljubljana. *Zakonodaja in trendi: seminar : gradivo za interno uporabo*. Ljubljana: Gospodarska zbornica Slovenije, 2011, str. [1-7].
- GREBENC, Stanka, BIASIZZO, Majda, HENIGMAN, Urška, KIRBIŠ, Andrej. Povzročitelji zoonoz pri različnih vrstah mesa in mesnih izdelkih v Sloveniji v letih 2008 do 2010. V: 4. slovenski veterinarski kongres 2011, Portorož, 18. do 19. november 2011. MAJDIČ, Gregor (ur.). *Program in zbornik referatov*, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Supplement, 13). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2011, vol. 48, suppl. 13, str. 137-140.
- GREBENC, Stanka, HENIGMAN, Urška, KIRBIŠ, Andrej, BIASIZZO, Majda. Izvajanje kontrole proizvodnje živil po uredbi komisije (ES) št. 2073/05. V: Veliki jesenski živilski semina, 22. november 2012, Ljubljana. *Zakonodaja in trendi*. Ljubljana: Gospodarska zbornica Slovenije, 2012, str. [1-5].
- JUNTES, Polona, PALLER, Tomislav, PIRJEVEC, Jasna, MORI, Ines, BARLOVIČ, Smiljka, IPŠA, Zdravko, GROM, Jože, KUHAR, Urška, TOPLAK, Ivan, ZDOVC, Irena. Pregled patologije pri drobnici v Sloveniji = Overview of pathology of small ruminants in Slovenia. V: CVIRN, Marjana (ur.). *Zbornik predavanj*. Slovenj Gradec: Kmetijska založba, 2013, str. 67-76.
- KAVALIČ, Maja. *Tipizacija izolatov Listeria monocytogenes s klasično serološko metodo in PCR ter subtizacija s PFGE : magistrsko delo = Typing of Listeria monocytogenes isolates using conventional serological method and PCR as well as subtyping using the PFGE method : M. Sc. Thesis*, (Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Magistrsko delo magistrskega študija - 2. stopnja

Mikrobiologija, 17). Ljubljana: [M. Kavalič], 2014. XIII, 92 f., [10] f. pril., ilustr., tabele.

- KENDA, Edvard. *Verjetnost kontaminacije rdečega mesa iz zraka z bakterijami vrste Listeria monocytogenes v klavnični industriji : doktorska disertacija = Likelihood of contamination of red meat from the air by Listeria monocytogenes in meat industry : doctoral thesis*. Ljubljana: [E. Kenda], 2012. 111 f., ilustr. <http://www3.vf.uni-lj.si/PortalGenerator/document.aspx?ID=89&Action=2&UserID=0&SessionID=48826&NavigationID=614>.
- KIRBIŠ, Andrej, BIASIZZO, Majda, GREBENC, Stanka, GODIČ TORKAR, Karmen, BAUER, Martin, JEVŠNIK, Mojca. Raw milk from vending milk machine in Slovenia: food safety control. V: 3rd International Scientific Meeting, 2-4 September 2012, Republic of Macedonia, Ohrid. MITROV, Dine (ur.), PENDOVSKI, Lazo (ur.). *Days of veterinary medicine 2012 : book of proceedings*. Skopje: Faculty of veterinary medicine, 2012, str. 106-107. [COBISS.SI-ID [3577722](#)]
- KOŠIR, Marta, TRKOV, Marija, ZDOVC, Irena. Epidemiološka in mikrobiološka preiskava listerijskih okužb v zdravstveni regiji Novo mesto v letu 2013 = Epidemiological and microbiological investigation of listeria infections in health region Novo mesto in 2013. *Enboz*, ISSN 2232-3139, julij-avgust 2014, št. 7, str. 7-19. <http://www.ivz.si/enboz?pi=5& 5 Filename=attName.png& 5 MediaId=8672& 5 AutoResize=false&pl=223-5.3>.
- KUŠAR, Darja, KAVALIČ, Maja, OCEPEK, Matjaž, ZDOVC, Irena. Report on overcoming the poor quality of Apal pulsotypes with a short review on PFGE for *Listeria monocytogenes*. *Polish Journal of Microbiology*, ISSN 1733-1331, 2013, vol. 62, no. 3, str. 307-309.
- KUŠAR, Darja, KAVALIČ, Maja, GOLOB, Majda, PATE, Mateja, OCEPEK, Matjaž, ZDOVC, Irena. Tipizacija bakterije *Listeria monocytogenes* s klasično serološko metodo in PCR ter subtipizacija z metodo PFGE. V: 6. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva, 24.-26. september 2014, Bled, Slovenija. KUŠAR, Darja (ur.), OCEPEK, Matjaž (ur.). *Knjiga povzetkov : kongres SMD 2014*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2014, str. 114, Po-35. [http://smd-kongres.si/SMD\\_zbornik\\_NET.pdf](http://smd-kongres.si/SMD_zbornik_NET.pdf).
- PATE, Mateja, GOLOB, Majda, ZDOVC, Irena. Listeriosis in animals and humans : analysis of interesting cases. V: 3rd VetLab Conference of Alpe Adria Region, 14th November - 15th November 2013, Ljubljana. ZABAVNIK PIANO, Jelka (ur.). *Strengthening of scientific cooperation among veterinary laboratories and veterinary services of the Alpe Adria Region (Carinthia, Slovenia and Friuli Venezia Giulia)*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2013, str. 41-44.

- PINTARIČ, Štefan, DOBEIC, Martin, ZDOVC, Irena, GOLOB, Majda, GREBENC, Stanka, ŠTRANCAR, Janez. Use the centrifugal samplers for detection of microorganisms in the air. V: Proceedings of the 15th International Congress of the International Society for Animal Hygiene, July 3 - 7, Vienna, Austria. KÖFER, Josef (ur.), SCHOBESBERGER, Hermann (ur.). *XV ISAH Congress 2011. Animal hygiene and sustainable livestock production : innovations in hygiene, nutrition and housing for healthy food from healthy animals*. Brno: ISAH, 2011, str. 785-787.
- ZALAR, Teja, USENIK, Lea Lucija. *Pojavnost bakterije Listeria monocytogenes v hladilnikih in molekularna subtipizacija sevov : projektna naloga*. Ljubljana: Biotehniški izobraževalni center, Gimnazija in veterinarska šola, april 2014. 51 f., ilustr.
- ZDOVC, Irena, DOBEIC, Martin, PINTARIČ, Štefan, GOLOB, Majda. *RRP5 - bioaktivni, biokompatibilni in bioinertni materiali : [predavanje na: 2. planski konferenci Centra odličnosti NAMASTE, četrtek, 31. 1. 2013, Institut "Jožef Stefan", Ljubljana]*. Ljubljana: Ministrstvo za izobraževanje, znanost, kulturo in šport Republike Slovenije, 2013.
- ZDOVC, Irena. *Proficiency testing on Listeria monocytogenes : NRL activities on PT trials : [referat na] 5th workshop of the NRLs for Listeria monocytogenes, 10 and 11 March 2011, ANSES Maisons-Alfort Laboratory for Food Safety, Maison-Alfort cedex, France*. Maison-Alfort cedex, 2011. 17 izročkov v power point programu.
- ZDOVC, Irena, BIASIZZO, Majda, GREBENC, Stanka, HENIGMAN, Urška, GOLOB, Majda. *Listeria monocytogenes pri živalih in v živilih*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut, 2011. 56 str., ilustr.
- ZELENIK, Katja, LUŠICKY, Marija, TRKOV, Marija, LORENČIČ ROBNIK, Slavica, ZDOVC, Irena. Ali postaja listerioza problem v Evropi in Sloveniji? = Is listeriosis becoming a problem in Europe and Slovenia?. V: 4. Baničevi dnevi, Radenci, november 2012. PETROVEC, Miroslav (ur.). *Zoonoze : [zbornik prispevkov]*, (Medicinski razgledi, Supplement, letn. 51, 6). Ljubljana: Medicinski razgledi, 2012, letn. 51, supl. 6, str. 63-69.
- ZELENIK, Katja, PATE, Mateja, AVBERŠEK, Jana, LUŠICKY, Marija, KRT, Branko, OCEPEK, Matjaž, ZDOVC, Irena. Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission : a case report. *Zoonoses and public health*, ISSN 1863-1959. [Print ed.], 2014, vol. 61, issue 4, str. 238-241, doi: [10.1111/zph.12075](https://doi.org/10.1111/zph.12075).

#### **Prispevki, sprejeti v objavo:**

- GOLOB M, PATE M, AVBEREŠEK J, MIJOVIČ A, PINTARIČ Š, PIRJEVEC J, ZDOVC I. Izbruh listerioze na farmi- celovit pristop k odkrivanju okužbe. Prispevek bo v obliki predavanja predstavljen na Veterinarskem kongresu v Portorožu, 14. – 15. novembra 2014.