

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/1



## ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	V4-1110
<b>Naslov projekta</b>	Zagotavljanje varne hrane: problematika kontaminacije perutnine in perutninskega mesa s kampilobaktri v Sloveniji
<b>Vodja projekta</b>	11133 Matjaž Ocepek
<b>Naziv težišča v okviru CRP</b>	1.03.04 Intestinalna kampilobakterioza – vodilna zoonoza v EU: analiza stanja v zvezi s kampilobaktri pri perutnini in v perutninskem mesu v Sloveniji ter določitev kritičnih točk z namenom zagotavljanja varnejše hrane
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	1673
<b>Cenovni razred</b>	
<b>Trajanje projekta</b>	10.2011 - 09.2014
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta 1027 Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije 2106 PERUTNINA PTUJ reja perutnine, proizvodnja krmil, perutninskega mesa in izdelkov, trgovina in storitve d.d. 3334 NACIONALNI LABORATORIJ ZA ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.02 Animalna patologija in epizootiologija
<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

Z našimi raziskavami smo želeli ugotoviti in raziskati kritične točke za vnos in širjenje povzročitelja na piščančjih farmah, za kontaminacijo piščančjih trupov in mesa v perutninski klavnici ter nato v prometu, torej v celotni živilsko-proizvodni in prehransko-oskrbovalni verigi. V raziskavo smo vključili tri matične jate, v katerih smo vzorčili feces in jajca, ter šest jat brojlerjev, kjer smo vzorčili okolje pred vselitvijo, nato pa okolje, krmo, vodo in feces trikrat v prvem tednu po vselitvi in nato tedensko do zakola. Ob zakolu smo trupe piščancev iz istih jat vzorčili med samim klavnim procesom, vzdolž celotne klavne linije. Trupe oz. meso piščancev istega proizvajalca smo nato vzorčili še v prometu. Vse izolate smo genotipizirali z metodo PFGE, izolate iz piščancev v prometu pa smo preiskali tudi na odpornost proti protimikrobnim zdravilom. Poleg tega so bile opravljene ankete za oceno tveganja med zaposlenimi v perutninski proizvodni verigi in potrošniki.

*C. jejuni* smo izolirali iz vseh vzorcev fecesa odvzetih v matičnih jatah. Vertikalnega prenosa kampilobaktrov na potomstvo nismo potrdili. V petih spremljanih brojlerskih jatah je do vnosa kampilobaktrov prišlo teden oz. dva pred koncem reje, šesta jata pa je ostala do konca reje negativna. Profili PFGE so bili pri vseh pozitivnih jatah vezani na posamezne farme.

Rezultati vzorčenja na klavnici so pokazali, da klavniško okolje oz. klavna linija pred začetkom klanja ni kontaminirana s kampilobaktri. Trupi piščancev se na klavni liniji najverjetneje kontaminirajo že med procesom skubljenja ter med evisceracijo. Raven kontaminacije s kampilobaktri se v splošnem niža z bližanjem koncu klavne linije. Na zmanjšanje onesnaženja s kampilobaktri ugodno vpliva spiranje trupov z vodo, še bolj pa hlajenje in zamrzovanje. Rezultati genotipizacije izolatov iz klavniškega okolja so pokazali, da v klavnici lahko prihaja do navzkrižne kontaminacije piščančjih trupov, vendar je njen pomen majhen.

Ob vzorčenju piščancev v prometu smo ugotovili 56% prevalenco. Večji del vzorcev je bil kontaminiran z nizkim številom kampilobaktrov. Rezultati testov odpornosti proti protimikrobnim zdravilom, še posebej ciprofloksacinu, kažejo, da se Slovenija uvršča med države EU z najpogostejšo odpornostjo bakterijskih izolatov iz piščančjega mesa.

Rezultati genotipizacije izolatov *C. jejuni*, tako iz klavniških vzorcev kakor iz svežega piščančjega mesa v prodajni mreži, s sekvenciranjem MLST hišnih genov in regije QRDR v genu *gyrA*, odgovornem za odpornost proti ciprofloksacinu, kažejo na klonalno širjenje odpornosti proti temu antibiotiku.

Z anketami za oceno tveganja, povezanih s pripravo piščančjega mesa, smo ugotovili nekatere pomanjkljivosti pri delu zaposlenih v perutninski proizvodni verigi. Poznavanje bakterij *Campylobacter* in njihovih lastnosti je slabo, in sicer še slabše pri potrošnikih kot pri delavcih.

ANG

The present research was designed to identify and study the critical points for introduction or spreading of the causative agent on poultry farms and for contamination of poultry carcasses and meat in poultry slaughterhouses and later in retail, therefore in the entire food-production and food-supply chain.

This study included three parent flocks, sampled for the faeces and eggs, and six broiler flocks, sampled for the environment prior to housing and later for the environment, feedstuffs, water and faeces three times in the first week after housing and then weekly till slaughter. At slaughtering, carcasses from the same flocks were sampled during the slaughtering process, along the entire slaughter line. All isolates were genotyped by PFGE method, and isolates from retail chicken were also tested for the resistance against antimicrobial agents. In addition, risk-assessment surveys were performed among employees in the poultry production chain and consumers.

*C. jejuni* was isolated from all faecal samples collected in parent flocks. Vertical transmission of campylobacters was excluded. In five of the

monitored broiler flocks, campylobacters were introduced one or two weeks before the end of rearing, and one flock remained negative to the last. In all positive flocks, PFGE profiles were linked to individual farms. Results of slaughterhouse sampling showed that the slaughterhouse environment is not contaminated with campylobacters prior to slaughtering. At the slaughter line, contamination of chicken carcasses most likely occurs already during plucking and during evisceration. The level of contamination with campylobacters decreases towards the end of the slaughter line. Carcass rinsing with water, cooling and refrigeration have a beneficial effect on the reduction of contamination. Results of genotyping of the isolates obtained from the slaughterhouse environment showed that cross-contamination of chicken carcasses at the slaughterhouse is possible, but is not significant. Sampling of retail chicken showed a prevalence of 56%. The larger part of the samples was contaminated by low numbers of campylobacters. Results of testing the resistance against antimicrobial agents showed that Slovenia ranks among EU states with the most common resistance of bacterial isolates from chicken meat. Genotyping results for the *C. jejuni* isolates, originating both from the slaughterhouse samples and from the fresh retail chicken meat, showed a clonal spread of resistance against ciprofloxacin after MLST sequencing of the housekeeping genes and QRDR region of *gyrA*, coding for the resistance against this antibiotic. Surveys for the assessment of risk, related to handling/preparation of chicken meat, showed some deficiencies at work performed by the employees in the poultry production chain. Knowledge on the Campylobacter bacteria and their properties is poor, both on the consumers and poultry industry employees side (though the latter show greater knowledge after all).

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

Glavni namen projekta je bil identificirati kritične točke in postopke v proizvodnji perutninskega mesa v Sloveniji, kjer bi lahko z ustreznimi ukrepi čimbolj učinkovito zmanjšali kontaminiranost živil perutninskega izvora s kampilobaktri. To bi v močni globalni konkurenci pomenilo pomembno prednost pri oskrbi trga s tovrstnimi izdelki. Za zmanjšanje pojavnosti kampilobakterioz pri ljudeh je bistvena tudi dobra praksa pri končni pripravi perutninskega mesa za uživanje, oz. osveščenost glede te problematike pri vseh, ki hrano pripravljajo, tako v obratih javne prehrane kot v domačih gospodinjstvih. Zato smo želeli s projektom ugotoviti tudi poznavanje te problematike v praksi, nato pa organizirati izobraževanje tistih akterjev, za katere se bo na osnovi rezultatov raziskave izobraževanje izkazalo za potrebno. Za doseg tega cilja smo najprej raziskali način in čas vnosa v jato ter dinamiko in stopnjo kolonizacije brojlerjev z bakterijo *Campylobacter jejuni* (CJ), povzročiteljem črevesne kampilobakterioze pri ljudeh. V klavnici smo definirali kritične točke oz. tehnološke postopke za kontaminacije perutninskega mesa med klanjem. Tovrstnih raziskav doslej pri nas še ni bilo, rezultati podobnih tujih študij pa se zelo razlikujejo, najverjetneje zaradi tega, ker so omenjene kritične točke za vsako posamezno klavnico specifične, ukrepe za zmanjšanje fekalne kontaminacije pa je treba temu ustrezno prilagoditi. Kampilobakte smo iz vzorcev izolirali in identificirali v skladu z modificirano standardno metodo ISO 10272-1:2006 (Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti termotolerantnih *Campylobacter* sp.). Kjer nas je zanimalo število TK na enoto vzorca, smo vsebnost kampilobaktrov določali v skladu z metodo ISO 10272-2:2006 (Horizontalna metoda za ugotavljanje števila termotolerantnih *Campylobacter* sp.) in s testom multipleks PCR. Genotipizacijo smo izvajali z metodama PFGE in MLST. V prvi fazi projekta smo vzorčili matične jate, nato pa še brojlerske reje, ki so izvirale iz teh matičnih jat. Vzorčili smo v tedenskih časovnih intervalih, začevši z 1 dan starimi piščanci, hkrati smo vzorčili tudi okolje brojlerskih rej. Skupno je bilo na farmah odvzetih 299 vzorcev, na katerih je bilo opravljenih 429 preiskav na prisotnost termofilnih kampilobaktrov (TK). Vsi izolirani sevi so bili molekularno tipizirani z metodo pulzne elektroforeze (PFGE). V drugi fazi projekta smo se osredotočili na linijo klanja. Vzorčili smo piščance neposredno pred klanjem in njihove trupe na posameznih točkah klavne linije kakor tudi po hlajenju in zamrzovanju. Skupno je bilo odvzeto 240 vzorcev kože, na katerih je bilo opravljeno prav toliko analiz na prisotnost in štetje TK, 60 vzorcev cekumov za 60 preiskav na prisotnost TK in

62 vzorcev klavniškega okolja (voda za omamljanje, voda za skubljenje, stroj za kloake, stroj za evisceracijo, razni trakovi, pladnji, odtoki) in zrak. Tudi v tej fazi smo vse izolate genotipizirali zaradi ugotavljanja morebitne navzkrižne kontaminacije na liniji klanja.

Z namenom ugotovitve stanja v maloprodaji smo vzorčili tudi 111 piščančjih izdelkov iz 8 prodajaln. Tudi izolate iz teh vzorcev smo genotipizirali in jim z metodo določanja minimalne inhibitorne koncentracije določili antibiotsko odpornost.

Analize vzorcev odvzetih na farmah kažejo, da so v matičnih jatah vse kokoši okužene s kampilobaktri, vendar do vertikalnega prenosa okužb na potomstvo oz. brojlerje ne prihaja. Med vzrejo se brojlerji praviloma kolonizirajo s kampilobaktri šele v zadnjih desetih dneh reje pred zakolom. Ko se kampilobakter pojavi v reji se zelo hitro, v enem tednu, razširi na vse piščance.

Analize vzorcev klavniškega okolja pred začetkom klanja kažejo, da so vsi vzorci (voda za omamljanje, voda za parjenje, stroj za odpiranje kloak, stroj za evisceracijo ter nekatere točke v razsekovalnici) negativni na TK.

Na vzorcih piščančjih trupov, odvzetih med klanjem je bil *C. jejuni* ugotovljen in kvantificiran na vseh trupih živali iz pozitivnih farm, raven kontaminacije pa se je gibala med  $1,6 \times 10^3$  in  $1,5 \times 10^4$  CFU/g. Rezultati kažejo, da do znatnega onesnaženja s kampilobaktri prihaja že pred postopkom evisceracije, najverjetneje med procesom skubljenja, druga kritična točka pa je sama evisceracija. Pri dveh od petih klavnih serij (KS) s pozitivnimi trupi je bila namreč največja povprečna stopnja kontaminacije ugotovljena neposredno po skubljenju (KS-C in KS-F;  $1,4 \times 10^4$  in  $8,9 \times 10^3$ ), pri dveh pa po evisceraciji (KS B in KS-E;  $4,4 \times 10^3$  in  $7,3 \times 10^3$ ). V splošnem se je stopnja kontaminacije z bližanjem koncu klavne linije oz. hladilnemu tunelu nižala, najverjetneje zaradi izdatnega spiranja trupov z vodo po evisceraciji. Najnižja stopnja onesnaženja v prostoru za evisceracijo je bila tako ugotovljena po končnem spiranju trupov oz. pred začetkom hlajenja (povprečje  $3,9 \times 10^3$  in 35% zmanjšano onesnaženje glede na predhodno mesto vzorčenja). Zelo pa se je stopnja kontaminacije zmanjšala po 3-dnevem hlajenju (povprečno ugotovljeno  $8,7 \times 10^2$  CFU/g; 78% zmanjšanje glede na CFU povprečje po končnem spiranju), še bolj pa po zamrzovanju (ugotovljeno povprečno 28 CFU/g, zmanjšanje za 96,8% glede na povprečje po hlajenju). Do zanimivega zaključka smo prišli, ko smo primerjali onesnaženost zaporednih klavnih serij na posameznih točkah klavne linije: ugotovili smo namreč izrazito naraščanje stopnje onesnaženja trupov glede na predhodno klavno serijo na vzorčevalnih mestih po skubljenju ter po evisceraciji, posledično pa tudi po tridnevem hlajenju. Kontaminacija trupov je bila torej na teh točkah iz serije v serijo večja, kar kaže na neko akumulacijo kontaminirajočih kampilobaktrov nekje na klavni liniji že pred prvim mestom vzorčenja.

Iste točke klavniškega okolja kot pred začetkom klanja smo vzorčili tudi po koncu klanja. Pri vseh vzorcih, z izjemo vode za parjenje, smo potrdili prisotnost TK oz. CJ. Kampilobaktre smo izolirali tudi iz aerosola, in sicer je bil pozitiven vzorec zraka v evisceracijskem delu klavne linije ob klanju zadnje analizirane klavne serije.

Z metodo PFGE je bilo tipiziranih 446 izolatov *C. jejuni*, in sicer 196 iz t.i. spomladanskega sklopa (85 farmskih izolatov iz treh rej in 111 klavniških izolatov), 204 iz t.i. jesenskega sklopa (47 farmskih izolatov iz dveh rej in 157 klavniških izolatov) ter 46 izolatov iz piščancev v prometu. Rezultati genotipizacije kažejo na relativno majhno genetsko heterogenost izolatov *C. jejuni* v okviru te raziskave. Med 400 izolati iz farm in klavnice smo lahko namreč potrdili zgolj pet različnih pulzotipov *C. jejuni* (A1, A2, B1, B2 in C1). Na treh farmah in pri treh klavnih serijah spomladanskega sklopa smo potrdili dva različna pulzotipa *C. jejuni* (A1 in B1), pri čemer sta farmi na isti lokaciji delili isti pulzotip. Tudi v jesenskem sklopu smo lahko na eni pozitivni farmi in pri dveh pozitivnih klavnih serijah potrdili le dva pulzotipa *C. jejuni* (A2 in ponovno B1). Preostala pulzotipa (B2 in C1) smo ugotovili samo pri izolatih iz vzorcev klavniškega okolja ob spomladanskem vzorčenju, pri katerih pa vzorčenja ni bilo mogoče izvajati neposredno po »naših«<sup>3</sup> treh klavnih serijah, temveč šele ob rutinski zaustavitvi klavne linije, tako da so lahko v teh vzorcih bili prisotni tudi *C. jejuni* iz nenadzorovanih rej, torej drugačni pulzotipi. Na posamezni farmi smo tako v fecesu kot tudi v vodi in nastilju praviloma ugotavljali le en sam, za tisto farmo značilni pulzotip, ki smo ga lahko potrdili tudi kasneje, v slepih črevesih teh živali na klavni liniji. Izjema je bila ena sama farma iz spomladanskega sklopa, kjer smo ves čas potrjevali pulzotip A1, ki je bil kasneje potrjen tudi pri vseh vzorcih slepega črevesa na dan klanja; 39. dan reje smo namreč poleg pulzotipa A1 ugotavljali tudi pulzotip B1, ki pa na dan klanja v slepih črevesih ni več bil prisoten. Genetska heterogenost izolatov CJ na klavni liniji je bila nizka: v petih pozitivnih jatah/serijah smo lahko potrdili le tri

različne dominantne PFGE profile, ki so bili tipični za posamezno jato/farmo/klavno serijo. Rezultati PFGE tipizacije izolatov iz klavniškega okolja kažejo, da je navzkrižna kontaminacija sicer možna (različni pulzotipi prisotni npr. v stroju za evisceracijo / odstranjevalcu črevesja). Ne glede na to pa navzkrižne kontaminacije nismo mogli potrditi pri trupih: analiza izolatov iz kože namreč kaže, da se koža trupov kontaminira praktično izključno s kampilobaktrom iz lastnega črevesja (pulzotip kožnih izolatov posamezne serije je bil praktično vedno enak pulzotipu izolatov iz črevesja tiste serije).

Med izolati piščancev v prometu je bilo ugotovljenih 9 skupkov z enakim profilom PFGE, ki so vključevali od 2 do 7 izolatov (5 po dva izolata, eden po štiri, dva po šest in eden po sedem). Profili PFGE ostalih izolatov so se medsebojno razlikovali. Pestrost pulzotipov je bila na splošno večja kot pri izolatih iz farm, kar pa ni presenetljivo, saj smo predhodno ugotovili, da so pulzotipi izolatov kampilobaktrov večinoma vezani na farmo, vzorčeni pa so bili piščanci več kot 54 različnih rejcev.

Iz rezultatov analiz MLST lahko povzamemo, da je bilo med 28 uspešno identificiranimi sekvenčnimi tipi ugotovljenih 11 različnih, najpogosteje ST-21, ST-353, ST-354 (po 5x), sledili pa so ST-45 (4x), ST-52 (3x), po enkrat pa ST-22, ST-658, ST-257, ST-206, ST-574 in ST-283. Rezultati genotipizacije izolatov *C. jejuni*, tako iz klavniških vzorcev iz kot svežega piščančjega mesa v prodajni mreži, s sekvenciranjem MLST hišnih genov in regije QRDR v genu *gyrA*, odgovornem za odpornost proti antibiotiku ciprofloksacinu, kažejo na klonsko širjenje odpornosti proti temu antibiotiku. Pri tem smo sodelovali s projektnimi partnerji EU OP7 projekta Promise, kar je bilo potrebno predvsem zaradi finančne podpore, saj materialnih sredstev v okviru projekta CRP V-1110 ni bilo dovolj za izvedbo laboratorijskih analiz. Rezultati opravljenih preiskav omogočajo primerjalno analizo uporabnosti tipizacijskih metod, ki se zelo razlikujejo po potrebnem času, delu in materialnih stroških, prav tako pa je možno ugotavljati raznolikost/sorodnost izolatov tako iz prodajne mreže, klavne linije in humanih kliničnih izolatov.

Ob vzorčenju piščancev v prometu smo ugotovili 56% prevalenco (63 pozitivnih med 111 preiskanimi vzorci). Po pričakovanjih oziroma v skladu z rezultati raziskav v klavnici je bil večji del vzorcev kontaminiran z nizkim številom kampilobaktrov. V dobrih 30 % vseh vzorcev oz. 34 vzorcih je bilo ugotovljano  $<1,0 \times 10$  CFU/g živila, v približno 16 % oz. 18 vzorcih, je bilo ugotovljeno  $\leq 1,0 \times 100$  CFU/g živila, le v 11 vzorcih oz. v približno 10 % pa je bilo ugotovljeno nad  $1,0 \times 100$  CFU/g živila. Identificiranih je bilo 51 izolatov vrste *C. jejuni*, Rezultati testov odpornosti proti protimikrobnim zdravilom so pokazali, da je bilo vseh 34 izolatov občutljivih za gentamicin in kloramfenikol, po en izolat je bil odporen proti eritromicinu in streptomycinu, dva izolata sta bila odporna na tetraciklin, 21 na nalidiksično kislino in kar 26 izolatov (76,5 %) na ciprofloksacin. Rezultati, še posebej visok delež odpornosti proti ciprofloksacinu, kažejo, da se uvrščamo med države EU z najpogostejšo odpornostjo bakterijskih izolatov iz piščančjega mesa.

Z anketami za oceno tveganja, ki ga predstavlja splošna slaba informiranost oz. poznavanje ljudi o mikrobioloških tveganjih, povezanih s pripravo piščančjega mesa, smo ugotovili nekatere pomanjkljivosti pri delu zaposlenih v perutninski proizvodni verigi. Poznavanje bakterij *Campylobacter* in njihovih lastnosti je slabo, in sicer še slabše pri potrošnikih kot pri delavcih. Za zmanjševanje kontaminacije perutninskega mesa je ključno zagotavljanje visoke stopnje usposobljenosti delavcev in informiranje potrošnikov o varnem rokovanju s perutninskim mesom. Na splošno smo prišli do zaključka, da potrebujemo boljši sistem osnovnega in vseživljenjskega izobraževanja na področju zagotavljanja varne hrane, s poudarkom na odgovornosti potrošnika kot enega od pomembnih dejavnikov tveganja za prenos okužb.

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

Uspelo nam je v celoti realizirati zastavljene cilje projekta.

Tako smo definirali kritične točke za vnos in širjenje kampilobaktrov na piščančjih farmah, za kontaminacijo piščančjih trupov v perutninski klavnici ter nato mesa v prometu, torej v celotni živilsko-proizvodni in prehransko-oskrbovalni verigi.

Ugotovili smo, da so matične jate kokoši okužene s kampilobaktrom, vendar do vertikalnega

prenosa okužb na jate brojlerjev ne prihaja.

Brojlerji se praviloma kolonizirajo s kampilobaktri v zadnjih desetih dneh pred zakolom.

Negativni rezultati analiz klavniškega okolja pred klanjem kažejo, da sta čiščenje in dezinfekcija, kot se rutinsko izvajata pri našem največjem proizvajalcu perutninskega mesa, po zaključku klanja učinkovita.

Ugotovili smo, da se med klavnim procesom pozitivnih klavnih serij onesnažijo praktično vsi trupi, največji delež kontaminacije pa se zgodi še pred vstopom v evisceracijski del klavne linije, torej med omamljanjem, parjenjem in skubljenjem. Druga potrjena kritična točka je sama evisceracija.

S primerjavo stopnje kontaminacije zaporednih klavnih serij na istih mestih vzorčenja smo ugotovili, da onesnaženje trupov pri zaporednih klavnih serijah narašča.

Tipizacija izolatov iz klavniškega okolja je v omenjenem projektu pokazala, da je navzkrižna kontaminacija sicer možna, vendar na trupih ni pogosta.

Potrdili smo, da obstoječi klasični tehnološki postopki (spiranje, hlajenje) stopnjo kontaminacije zmanjšujejo, ter da bi lahko kontaminacijo z dodatnimi in/ali intenzivnejšimi tovrstnimi ukrepi še zmanjšali.

Kljub visoki prevalenci kontaminiranih trupov piščancev v klavnici je ugotovljeno število kampilobaktrov na posameznih trupih ob zaključku obdelave relativno nizko, po postopku hlajenja pa v povprečju celo nižje od najverjetnejšega higienskega kriterija, ki ga najpogosteje omenja EK (1000 CFU/g).

Ob vzorčenju piščancev v prometu smo ugotovili 56% prevalenco.

Rezultati testov odpornosti proti protimikrobnim zdravilom, še posebej odpornosti proti ciprofloksacinu, kažejo, da se uvrščamo med države EU z najpogostejšo odpornostjo bakterijskih izolatov iz piščančjega mesa.

Rezultati genotipizacije izolatov *C. jejuni*, tako iz klavniških vzorcev kakor iz svežega piščančjega mesa v prodajni mreži, s sekvenciranjem MLST hišnih genov in regije QRDR v genu *GyrA*, odgovornem za odpornost proti ciprofloksacinu, kažejo na klonsko širjenje odpornosti proti temu antibiotiku.

Z anketami za oceno tveganja, ki ga predstavlja splošna slaba informiranost oz. poznavanje ljudi o mikrobioloških tveganjih, povezanih s pripravo piščančjega mesa, smo ugotovili nekatere pomanjkljivosti pri delu zaposlenih v perutninski proizvodni verigi. Poznavanje bakterij *Campylobacter* in njihovih lastnosti je slabo, in sicer še slabše pri potrošnikih kot pri delavcih.

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

Program raziskovalnega projekta se ni spreminjal. V eni raziskovalni skupini (20106-001 PERUTNINA PTUJ reja perutnine, proizvodnja krmil, perutninskega mesa in izdelkov, trgovina in storitve d.d.) je prišlo do zamenjave dveh članov projektne skupine. Vzrok za spremembo je bilo prenehanje, oziroma zamenjava delovnega mesta. V projektno skupino se je v drugi polovici projekta kot tehnična sodelavka vključila dr. Urška Jamnikar Ciglenečki, ki je delno nadomestila Urško Zajc, dr.vet.med., ki je odšla na porodniški dopust, delno pa je s svojim poznavanjem predvsem molekularnih tehnik pripomogla k uspešnemu zaključku raziskav na projektu.

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

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	4335992	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Klonsko širjenje rezistence proti kinolonom pri bakterijah <i>Campylobacter jejuni</i>
		<i>ANG</i>	The evidence for clonal spreading of quinolone resistance with a particular clonal complex of <i>Campylobacter jejuni</i>
			Na 52 sevih <i>Campylobacter jejuni</i> , izoliranih iz različnih virov, vključujoč vzorce iz proizvodno-oskrbovalne verige piščančjega mesa v Sloveniji, smo preučevali odpornost proti antibiotikom v povezavi z genotipi. Klonski



	Opis	SLO	kompleks (KK) 21 je bil v študiji potrjen kot genetska skupina z najvišjo pojavnostjo izolatov odpornih proti kinolonom. Nadaljnja raziskava širjenja kinolonske odpornosti na podlagi sekvenčne analize regije za zagotavljanje odpornosti QRDR v genu gyrA je razkrila močno genetsko sorodnost med proti kinolonom odpornimi izolati znotraj KK 21. S tem smo dokazali, da gre za klonsko širjenje odpornosti proti kinolonom.
		ANG	Antibiotic resistance in association with genotypes was investigated on 52 <i>Campylobacter jejuni</i> strains isolated from different sources including samples from chicken meat supply chain in Slovenia. The MLST clonal complex (CC) 21 was identified as the genetic group with the highest incidence of quinolone resistant isolates. Furthermore, the quinolone resistance spreading was characterized by sequence analysis of quinolone resistance determining region (QRDR) within gyrA. Based on the high genetic relatedness of QRDR among isolates from CC 21, we confirmed the clonal spreading of quinolone resistance.
	Objavljeno v		Cambridge University Press; Epidemiology and Infection; 2014; Vol. 142; str. 2595-2603; Impact Factor: 2.491; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.984; WoS: NE, NN; Avtorji / Authors: Kovač Jasna, Čadež Neža, Lušicky Marija, Moller Nielsen Eva, Ocepek Matjaž, Raspor Peter, Smole Možina Sonja
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	3586426	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Trenutno sodelovanje in rezultati: vpogled v kontaminacijo s kampilobaktri in ocene tveganja v perutninski verigi v Sloveniji
		ANG	Current cooperation and results: insight into <i>Campylobacter</i> contamination and risk assessment in poultry chain in Slovenia
	Opis	SLO	Termotolerantni kampilobaktri, predvsem vrsta <i>Campylobacter jejuni</i> , so glavni dejavnik tveganja za kampilobakterioze, ki se prenašajo predvsem z uživanjem in rokovanjem s perutninskim mesom. V raziskave se morajo vključevati različni strokovnjaki in ustanove, ker je potrebno preučiti vse stopnje perutninske verige od farm do vilic. Sodelovanje med Veterinarsko fakulteto, Inštitutom za mikrobiologijo in parazitologijo, in Biotehniško fakulteto, Oddelkom za živilstvo, poteka od leta 2008 z več projekti – bilateralni s Srbijo se je zaključil z letom 2011, potekata pa dva o odpornosti bakterij živalskega izvora proti antibiotikom in problemih kontaminacije perutnine in perutninskega mesa s kampilobaktri v Sloveniji. Za zmanjšanje pogostnosti in odpornosti kampilobaktrov v proizvodni verigi perutninskega mesa se morajo k boljšim preventivnim ukrepom obvezati tako rejci, veterinarji, živilci kot tudi potrošniki.
		ANG	Since the primary risk factor associated with intestinal campylobacteriosis is consuming and handling <i>Campylobacter</i> – contaminated poultry meat all stages of poultry production chain should be considered and different professionals and institutions must be involved in joint research of <i>Campylobacter</i> contamination and risk assessment. Cooperation between the Veterinary Faculty, Institute of Microbiology and Parasitology, and the Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology, is well running since 2008 with several projects – a bilateral one with Serbia has finished in 2011, but current research projects include antibiotic resistance in bacteria of animal origin and <i>Campylobacter</i> contamination and risk assessment of poultry and poultry meat production. All stakeholders of the poultry production chain as well as the consumers must oblige for better preventive measures to keep the prevalence and antimicrobial resistance of campylobacters in acceptable limits.
			Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil; Biotechnology and microbiology for

	Objavljeno v	knowledge and benefit; 2012; Str. 277-286; Avtorji / Authors: Ocepek Matjaž, Gruntar Igor, Zdovc Irena, Smole Možina Sonja, Pate Mateja, Mićunović Jasna, Golob Majda, Kušar Darja	
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljeni predavanja)	
3.	COBISS ID	3694970	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Kampilobaktri v rejah pitovnih piščancev v Bosni in Hercegovini: Prevalenca in genetska raznolikost
		ANG	Campylobacters in broiler flocks in Bosnia and Herzegovina: Prevalence and genetic diversity
	Opis	SLO	Ta študija je preučevala razširjenost termotolerantnih kampilobaktrov pri pitovnih piščancev na perutninskih farmah (62,0%) in na trupih pitovnih piščancev na klavni liniji (58,1%) v Bosni in Hercegovini. Genetska raznolikost izolatov je bila omejena: v posameznih pozitivnih rejah so bili ugotovljeni enaki ali zelo podobni profili. Pri vzorcih s klavne linije ni bilo mogoče dokazati navzkrižne kontaminacije: genetski profili izolatov iz trupov in iz slepega črevesa iste serije pitovnih piščancev so bili enaki.
		ANG	This study studied the prevalence of thermotolerant Campylobacter in broilers at poultry farms (62.0 %) and in broiler carcasses at slaughter line (58.1 %) in Bosnia and Herzegovina. Genetic diversity of isolates was limited: identical or very similar profiles were detected on individual Campylobacter-positive farms. Carcass cross contamination could not be observed in slaughter line samples: carcass isolates showed identical profiles to campylobacters from caeca from the same broiler batch.
	Objavljeno v	Veterinarska fakulteta; Slovenian veterinary research; 2013; Vol. 50, no. 2; str. 45-55; Impact Factor: 0.314; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.019; WoS: ZC; Avtorji / Authors: Hadžiabdić Sead, Rešidbegović Emina, Gruntar Igor, Kušar Darja, Pate Mateja, Zahirović Lejla, Kustura Aida, Gagić Abdulah, Goletić Teufik, Ocepek Matjaž	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	3607418	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Kampilobakterioza - pojavnost in nadzor pri ljudeh in perutnini v Sloveniji
		ANG	Campylobacteriosis - occurrence and monitoring of humans and poultry in Slovenia
	Opis	SLO	Namen našega prispevka je prikazati mikrobiološko in epidemiološko situacijo v zvezi s kampilobaktri pri ljudeh in pitovnih piščancih v Sloveniji v obdobju 2007-2011 ter primerjati podatke o odpornosti na protimikrobna zdravila za človeške in piščančje izolate C. jejuni. Pojavnost kampilobakterioze pri ljudeh v Sloveniji se od leta 2008 povečuje in je ves čas višja od evropskega povprečja. V letu 2010 je znašala 49,9 primerov na 100.000 prebivalcev. Stopnja kolonizacije s kampilobaktri pri pitovnih piščancih, kontaminacija piščančjih trupov in mesa se je gibala v razponu od 73% do 88%, 81% do 93% in 49% do 79%. Odpornost človeških in perutninskih izolatov C. jejuni 2007-2011 je bila ves čas zelo nizka proti gentamicinu in eritromicinu. Odpornost proti tetraciklinu je bila zmerna do visoka pri ljudeh in zelo visoka pri perutnini. Odpornost proti ciprofloksacinu je bila ves čas zelo visoka in stabilna pri ljudeh in izjemno visoka pri pitovnih piščancih. Visoka stopnja kolonizacije s kampilobaktri pri pitovnih piščancih, visok delež kontaminiranih trupov in piščančjega mesa ter izjemno visoka odpornost C. jejuni proti ciprofloksacinu pri ljudeh in pitovnih piščancih v Sloveniji so zaskrbljujoči.



			the period 2007-2011, and to compare data on antimicrobial resistance of human and broiler <i>C. jejuni</i> isolates. The incidence of campylobacteriosis in humans in Slovenia is increasing since 2008 and is all the time superior to European average. In 2010 it was 49.9 cases per 100,000 population. The rate of campylobacter colonization in broilers, chicken carcass contamination and meat contamination ranged from 73% to 88%, 81% to 93% and 49% to 79%. Resistance of human and poultry <i>C. jejuni</i> isolates has always been very low against gentamicin and erythromycin. Resistance to tetracycline was moderate to high in humans and very high in poultry. Resistance to ciprofloxacin has been very high and stable in humans and is particularly high in broilers. High campylobacter colonization rate in broilers, high proportion of contaminated carcasses and chicken meat and extremely high <i>C. jejuni</i> resistance to ciprofloxacin in humans and broilers have become a problem in Slovenia.
	Objavljeno v	Medicinski razgledi; Zoonoze; Medicinski razgledi, Supplement; 2012; Letn. 51, supl. 6; str. 45-53; Avtorji / Authors: Berce Ingrid, Gruntar Igor	
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
5.	COBISS ID	3558778	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Molekularne metode v diagnostiki in nadzoru veterinarskih kužnih bolezni
		ANG	Molecular techniques used in diagnosis and control of veterinary infectious diseases
	Opis	SLO	Predstavljene so bile prednosti in pomanjkljivosti molekularnih metod, kim se uporabljajo v diagnostiki in nadzoru veterinarskih kužnih bolezni.
		ANG	Advantages and disadvantages of molecular techniques used in diagnosis and control of veterinary infectious diseases were shown.
	Objavljeno v	Veterinary Faculty; 15th Congress of the International Society for Animal Clinical Pathology [also] 14th Conference of the European Society of Veterinary Clinical Pathology, 3rd-7th July, 2012, Ljubljana, Slovenia; 2012; Str. 70-74; Avtorji / Authors: Ocepek Matjaž, Toplak Ivan, Kušar Darja	
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)	

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

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	3443834	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Genetska raznolikost izolatov <i>Campylobacter jejuni</i> iz fecesa in s trupov pitovnih piščancev v Sloveniji
		ANG	Genetic diversity of <i>Campylobacter jejuni</i> isolated from broiler feces and broiler carcasses in Slovenia
	Opis	SLO	Rezultati genotipizacije in epizootiološki podatki potrjujejo veliko genetsko pestrost izolatov <i>C. jejuni</i> v Sloveniji, tako pri izolatih iz različnih rej kot tudi znotraj posameznih rej. Sevi, izolirani iz fecesa in trupa iste živali so imeli v več kot polovici primerov enak genetski profil, kar pomeni neposredno kontaminacijo trupa na klavni liniji; lahko pa se trupi kontaminirajo tudi navzkrižno. Nekateri sevi z določenim genetskim profilom vendarle prevladujejo, bodisi v nekem geografsko omejenem prostoru ali pa v posameznih klavnicah.
			Genotyping results and epidemiological data confirm the high genetic diversity of <i>C. jejuni</i> isolates in Slovenia, both in isolates from different

			breeders as well as within individual breeders. Strains isolated from faecal contents and carcass of the same animals had in more than half the cases the same genetic profile, which points to the direct contamination of the carcass on the slaughter line, but suggests also the possibility of cross-contamination of carcasses. Some strains with specific genetic profile, however, dominate, either in a particular geographical area or in individual slaughterhouses.
	Šifra	B.03	Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	Veterinarska fakulteta; Program in zbornik referatov; Slovenian veterinary research; 2011; Vol. 48, suppl. 13; str. 121-124; Impact Factor: 0.216; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.939; WoS: ZC; Avtorji / Authors: Pate Mateja, Gruntar Igor, Kušar Darja, Mićunović Jasna, Biasizzo Majda, Grebenc Stanka, Krt Branko, Ocepek Matjaž	
	Tipologija	1.08	Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
2.	COBISS ID	3990392	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Campylobacter jejuni pri ljudeh, živalih, hrani in okolju v Sloveniji
		ANG	Campylobacter jejuni in humans, animals, food and environment in Slovenia
	Opis	SLO	Kljub ugotovljeni izraziti genetski heterogenosti izolatov C. jejuni so bili enaki PFGE profili pogosto potrjeni tako pri izolaih iz ljudi, živali in iz hrane perutninskega izvora, kar kaže, da so glavni vir okužbe živali. Različni PFGE profili C. jejuni na istih farmah, vendar v različnih obdobjih kažejo na to, da posamezni sevi na farmah ne persistirajo. Enaki PFGE profili klavniških izolatov C. jejuni na trupih različnih rejcev kažejo na to, da na klavni liniji prihaja do navzkrižne kontaminacije. Ugotovljena je bila visoka stopnja kontaminacije perutninskega mesa v prodaji, kakor tudi visoka stopnja odpornosti izolatov proti antibiotikom, zlasti proti kinolonom in tetraciklinom.
		ANG	Despite the observed pronounced genetic heterogeneity of C. jejuni isolates, identical PFGE profiles were often confirmed in the isolates of human, animal and poultry food origin, indicating at animals as the main source of infection. Different PFGE profiles of C. jejuni isolates from on the same farm but from different production batches show that individual strains do not persist on farms. Identical PFGE profiles of C. jejuni isolates from the carcasses of different breeders show that cross-contamination on the slaughter line is possible. A high level of C. jejuni contamination was found in retail poultry meat, as well as high level of resistance of C. jejuni to antibiotics, especially against quinolones and tetracyclines.
	Šifra	B.03	Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	Udruženje mikrobiologa Srbije = Serbian Society for Microbiology; Microbiologia Balkanica 2011; 2011; Str. [1]; Avtorji / Authors: Ocepek Matjaž, Pate Mateja, Gruntar Igor, Kušar Darja, Golob Majda, Mićunović Jasna, Zdovc Irena, Biasizzo Majda, Grebenc Stanka, Krt Branko, Berce Ingrid, Trkov Marija, Mioč Verica, Rupel Tatjana, Paragi Metka, Žohar Čretnik Tjaša, Štorman Alenka, Lušicky Marija, Kovač Jasna, Raspor Peter, Smole Možina Sonja	
	Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
3.	COBISS ID	3611770	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Kontaminacija perutnine in perutninskega mesa s kampilobaktri v Sloveniji
		ANG	Contamination of poultry and poultry meat with campylobacters in Slovenia
			Odpornost bakterije CJ proti ciprofloksacinu, tetraciklinu in nalidiksinski kislini je v Sloveniji dosegla zaskrbljujoče razsežnosti. Sposobnost bakterij

Opis	SLO	Campylobacter za pridobivanje odpornosti proti kinolonom je znana in dokumentirana, vendar je treba razloge za tako visok delež odpornih izolatov dodatno raziskati, vključno z možnostjo neprimerne uporabe antibiotikov v proizvodnji perutnine, da bi izpostavili vse pomembne okoliščine in možne posledice.
	ANG	CJ resistance to ciprofloxacin, tetracycline and nalidixic acid in Slovenia reached alarming proportions. The ability of Campylobacter to acquire resistance to quinolones is well known and documented, but the reasons for such a high proportion of resistant isolates must be further explored, including the possibility of inappropriate use of antibiotics in poultry production, to expose all the relevant circumstances and likely consequences.
Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
Objavljeno v	Komisija za perutnino; Strokovno izobraževalni seminar Komisije za perutnino; 2012; Str. [1-6]; Avtorji / Authors: Gruntar Igor	
Tipologija	1.07 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)	
4.	COBISS ID	4347000   Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Zavedanje o mikrobioloških tveganjih za varnost piščančjega mesa pri kupcih in delavcih v perutninski proizvodni verigi
	ANG	The awareness of microbiological risks connected with fresh poultry meat among consumers and workers in poultry meat production
Opis	SLO	V anketni raziskavi smo preverjali zavedanje slovenskih potrošnikov in delavcev o mikrobioloških tveganjih z bakterijo Campylobacter in njihovo znanje o pravilnem rokovanju s piščančjim mesom. Sodelovalo je 158 kupcev in 170 delavcev v Perutnini Ptuj. Rezultati raziskave kažejo na pomanjkljivo zavedanje potrošnikov in znanje o varni pripravi in shranjevanju perutninskega mesa.
	ANG	The awareness of microbiological risks connected with fresh poultry meat was checked among consumers and workers in poultry meat production. In total, 158 consumers and 170 workers answered the questionnaires, which revealed their poor knowledge about safe preparation and storage of poultry meat and general awareness about microbiological risks connected to consumption of fresh poultry meat.
Šifra	B.06 Drugo	
Objavljeno v	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty; Design and development of food models with well characterised micro- and macro- structure and composition - What will be next step?; 2013; Str. 40-41; Avtorji / Authors: Smole Možina Sonja, Zorko Špela, Vujanović Annamaria, Raspor Peter, Ocepek Matjaž	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
5.	COBISS ID	3954810   Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Zagotavljanje varne hrane: problematika kontaminacije perutnine in perutninskega mesa s kampilobaktri v Sloveniji
	ANG	Ensuring food safety: problems of Campylobacter contamination of poultry and poultry meat in Slovenia
Opis	SLO	Zaključno poročilo o izvedbi in rezultatih raziskovalnega projekta V4-1110 pripravljeno po naročilu Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.
	ANG	The final report on the implementation and results of the research project V4-1110, prepared after request of the Ministry of agriculture, forestry and food.
Šifra	D.11 Drugo	

Objavljeno v	Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta; 2014; 37 str.; Avtorji / Authors: Ocepek Matjaž, Bandelj Petra, Biasizzo Majda, Dobeic Martin, Dovč Alenka, Glaser Roman, Gruntar Igor, Jamnikar Ciglencečki Urška, Kiraly A., Kirbiš Andrej, Krt Branko, Kušar Darja, Mićunović Jasna, Mioč Verica, Pahor Bojan, Pate Mateja, Paragi Metka, Pintarič Štefan, Raspor Lainšček Petra, Smole Možina Sonja, Trkov Marija, Grebenc Stanka, Zajc Urška, Zdovc Irena, Zorman-Rojs Olga
Tipologija	2.12 Končno poročilo o rezultatih raziskav

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

Članstvo v uredniških odborih revij:

Člani projektne skupine (Peter Raspor, Sonja Smole Možina, Metka Paragi in Matjaž Ocepek) so člani uredniških odborov več kot dvajsetih različnih nacionalnih in mednarodnih revij.

Mentorstva:

Člani projektne skupine so bili tekom projekta mentorji pri osemnajstih zaključenih doktoratih, trinajst magistrskih in trideset diplomskih delih, ter somentorji pri šestih doktoratih, osmih magistrskih in enajstih diplomskih delih.

Marija Trkov, Metka Paragi: sodelovanje v projektu European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) molecular surveillance pilot for Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses (FWD) in uspešna vključitev v molekularno bazo ECDC Tessa MSS (molecular surveillance service).

Igor Gruntar: Vodja nacionalnega referenčnega laboratorija za kampilobakte.

Sonja Smole Možina: namestnica koordinatorja EU projekta "PROMISE" (FP7-265877), Protection of consumers by microbial risk mitigation through combating segregation (2012-2014)

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

### 10.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>3</sup>

SLO

Metodološko je bila ena od bistvenih razlik naše raziskave od drugih podobnih študij v konceptu/načinu vzorčenja: pri vsaki klavni seriji smo namreč na predvidenih mestih vzorčili vedno istih 10 trupov, kar se nam zdi bistveno za oceno dinamike onesnaženja in določitev kritičnih točk. Zaradi zelo skrbnega načrtovanja frekvence vzorčenja (5-minutni interval med dvema zaporednima vzorčenjema trupov), menimo, da na ta način zbrani vzorci omogočajo realnejši vpogled v dinamiko kontaminacije trupov brojlerjev kot če bi, tako kot vse ostale tovrstne študije, na posameznih mestih vzorčenja primerjali različne trupe ali različne skupine trupov. Kolikor vemo, tak pristop še ni bil nikoli uporabljen prej.

Z molekularno-genetsko karakterizacijo specifičnih genomski regij, odgovornih za antibiotsko odpornost (npr. nukleotidnega polimorfizma QRDR regije gena *gyrA*) in multilokusno sekvenčno tipizacijo sevov smo najprej evidentirali ozko sorodne skupine sevov na ožjem (slovenskem) geografskem področju, kar je omogočilo nadaljevanje raziskovalnega dela v tej smeri in potrditev klonskega širjenja odpornosti proti ciprofloksacinu bakterij *C. jejuni* tudi v širšem srednje-evropskem prostoru. To je pomemben doprinos k razumevanju mehanizmov širjenja in ohranjanja bakterijske odpornosti proti antibiotikom tudi ob omejeni uporabi.

ANG

Methodologically, one of the most essential differences of our research, in comparison to other similar studies regarding the concept/plan of sampling, is: for each of the slaughter series at the defined locations, namely, always the same 10 carcasses were sampled, which we found essential for the assessment of the dynamics of contamination and for the identification of the critical points. Due to a very careful planning of the sampling frequency (5-min interval

between the two consecutive samplings of the carcasses), it is believed that in this way the collected samples allowed more realistic insight into the dynamics of contamination of broiler carcasses as if, like in all of the other similar studies, different carcasses or groups of carcasses were compared at the selected sampling points. To the best of our knowledge, this approach has never been used before.

With the molecular-genetic characterization of specific genomic regions responsible for the antibiotic resistance (e.g. of the nucleotide polymorphism of the region QRDR in the gene *gyrA*) and by the multilocus sequence typing (MLST) of the strains, the groups with high genetic relatedness were first identified at the local (Slovene) geographical area, which enabled the continuation of the research in the same direction and the confirmation of clonal spreading of the resistance of *C. jejuni* bacteria against ciprofloxacin also in the broader Central-European region. This is an important contribution to understanding the mechanisms of spreading and persistence of the bacterial resistance against antibiotics even when their usage is limited.

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

SLO

Poznavanje kritičnih točk za kontaminacijo piščančjih trupov je predpogoj za zmanjšanje kontaminacije živil perutninskega izvora s kampilobaktri. To bo vsekakor imelo pozitiven učinek na mednarodno konkurenčnost naše perutninske proizvodnje, ki sodi med najpomembnejše kmetijske panoge v Sloveniji. Nenazadnje pa bomo s tem tudi zmanjšali tveganje za okužbo s kampilobaktri pri končnih potrošnikih, povečali varnost živil perutninskega izvora in tako posredno vplivali na izboljšanje zdravstvenega stanja glede najpogostejše zoonoze pri nas in v EU. Z zmanjšanjem kontaminacije s kampilobaktri bi omejili tudi nevarnost prenosa genov za rezistenco proti različnim antibiotikom na druge bakterije. S pridobljenimi podatki o številu in lastnostih (genotipov, rezistence) kampilobaktrov v proizvodni in prodajni mreži pa lahko že sedaj bolje načrtujemo ukrepe za zaščito potrošnikov.

ANG

Knowing the critical points for contamination of the chicken carcasses is a prerequisite for reducing the contamination of the food of poultry origin with campylobacters. Certainly, this will have a positive impact on the international competitiveness of our poultry production, which is one of the most important agricultural branches in Slovenia. In addition, this will also reduce the risk of infection with campylobacters for the final consumers and will increase the safety of the food of poultry origin, and thus indirectly influence the improvement of the health status with regard to the most common zoonosis in our country and in the EU. By reducing the contamination with campylobacters, the risk of transmission of the genes for resistance against different antibiotics to other bacteria would also be diminished. With the obtained data on the number and characteristics (genotypes, resistance) of campylobacters in the processing and retail network, a better planning of the measures for the protection of consumers can already be achieved today.

## 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>

Gospodarske institucije iz proizvodno-oskrbovalne verige s piščančjim mesom.  
Javne institucije s področja javnega zdravstva in varne hrane kot sta Nacionalni inštitut za javno zdravje in Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.

### 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>

Sodelovanje je potekalo z Univerzo za veterinarsko medicino na Dunaju (VUW), kot nosilko EU FP7 projekta, ki je poleg UL in VUW vključeval še 17 institucij iz 10 evropskih držav. Slovenija je bila zadolžena za vsebinski del projekta, ki je bil vezna na kontaminacijo hrane z bakterijami *Campylobacter*. Gruntar I. vodi NRL za kampilobakte (Nacionalni Referenčni Laboratorij), ki je del mreže evropskih referenčnih laboratorijev pod okriljem EURL *Campylobacter* (EU Reference Laboratory).

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

Rezultati so skupne znanstvene publikacije in predstavitve raziskovalnih dosežkov na mednarodnih kongresih in drugih dogodkih, skupna organizacija znanstvenih in izobraževalnih dogodkov, preko katerih se lahko v mednarodno okolje vključujejo predvsem mladi raziskovalci, itd. NRL za kampilobakte je kot član delovne skupine CEN/TC275/WG6/TAG19 - *Campylobacter* pod mandatom CEN M381 v letu 2013 sodeloval v vseevropski validaciji standarda ISO 10272.

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

**12.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Klonsko širjenje odpornosti proti kinolonom pri *C. jejuni*

Z namenom preučitve širjenja antibiotične odpornosti smo na 52 sevih *C. jejuni*, izoliranih iz različnih virov, vključujoč proizvodno-oskrbovalno verigo piščančjega mesa v Sloveniji, preučevali njihovo odpornost proti antibiotikom v povezavi z multilokusno sekvenčno tipizacijo MLST in *flaA* genotipizacijo. MLST klonski kompleks ST21 je bil v študiji potrjen kot genetska skupina z izjemno visoko pojavnostjo izolatov, odpornih proti kinolonskima antibiotikoma ciprofloxacinu in nalidiksični kislini. Nadaljnja raziskava na osnovi analize nukleotidnega polimorfizma QRDR regije gena *gyrA* je razkrila močno genetsko sorodnost proti kinolonom odpornih izolatov znotraj klonskega kompleksa 21, kar je nakazovalo mehanizem klonskega širjenja odpornih sevov, kar smo kasneje tudi potrdili s preiskavami bistveno večjega števila bakterijskih izolatov z istim tipom odpornosti, sevi pa so bili pridobljeni s širšega srednje-evropskega prostora.

**12.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek**

Organizacija kongresa

Od 24. do 26. 9. 2014 je v so organizaciji Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani (VF) in Slovenskega mikrobiološkega društva (SMD) na Bledu potekal 6. kongres SMD. Na kongresu so bili prisotni strokovnjaki iz vseh vej mikrobiologije. Poudarek je bil na povezavi znanosti s prakso in različnih področij mikrobiologije med seboj in s sorodnimi panogami. Približno 160 udeležencev se je udeležilo okrogle mize Izzivi sodobne mikrobiološke diagnostike, 49 predavanj in si ogledalo 98 predstavitev v obliki posterjev. V okviru kongresa so bila podeljena priznanja in plakete za uspešno delo na področju mikrobiologije ter Plenčičevo odličje za življenjsko delo, ki ga je prejel prof. dr. Peter Raspor.

**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

Matjaž Ocepek

**ŽIG**

Kraj in datum: 

Ljubljana	13.3.2015
-----------	-----------

**Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/1**

<sup>1</sup> 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](#)



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

D9-9B-41-C3-FA-39-87-03-9A-2F-B4-3C-6F-61-F3-BE-05-EF-4A-9C

## Zagotavljanje varne hrane: problematika kontaminacije perutnine in perutninskega mesa s kampilobaktri v Sloveniji

### Ensuring food safety: problems of *Campylobacter* contamination of poultry and poultry meat in Slovenia

Ključne besede: kampilobaktri, zoonoza, varna hrana, perutnina

#### **Povzetek**

Črevesna kampilobakterioza je najpogostejša bakterijska zoonoza v Evropi in drugod v razvitem svetu. Glavni povzročitelj tega s hrano prenosljivega akutnega gastroenteritisa je *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), običajni prebivalec črevesja industrijske perutnine, glavni vir okužbe pa je med industrijskim postopkom klanja fekalno onesnaženo perutninsko meso, bodisi zaradi preslabe termične obdelave ali pa zaradi navzkrižne kontaminacije termično že obdelanih živil s termično neobdelanimi. Z našimi raziskavami smo želeli ugotoviti in raziskati kritične točke za vnos in širjenje povzročitelja na piščančjih farmah, za kontaminacijo piščančjih trupov in mesa v perutninski klavnici ter nato v prometu, torej v celotni živilsko-proizvodni in prehransko-oskrbovalni verigi.

V raziskavo smo vključili tri matične jate, v katerih smo vzorčili feces in jajca, ter šest jat brojlerjev, kjer smo vzorčili okolje pred vselitvijo, nato pa okolje, krmo, vodo in feces trikrat v prvem tednu po vselitvi in nato tedensko do zakola. Ob zakolu smo brojlerje oz. trupe piščancev iz istih jat vzorčili med samim klavnim procesom, vzdolž celotne klavne linije. Trupe oz. meso piščancev istega proizvajalca smo nato vzorčili še v prometu. Preiskave na farmah so bile kvalitativne na prisotnost kampilobaktrov, na trupih piščancev pa smo, zaradi razumevanja dinamike kontaminacije na klavni liniji, kampilobaktre tudi kvantificirali. Vse izolate smo genotipizirali z metodo PFGE, izolate iz piščancev v prometu pa smo preiskali tudi na odpornost proti protimikrobnim zdravilom. Poleg tega so bile opravljene ankete za oceno tveganja med zaposlenimi v perutninski proizvodni verigi in potrošniki.

*C. jejuni* smo izolirali iz vseh vzorcev fecesa odvzetih v matičnih jatah. Ker pa so bila jajca in zamrtki tako na začetku kot tudi ob koncu valilnega obdobja na kampilobaktre negativni in ker so bili negativni tudi eno in šestdnevni piščanci izvaljeni iz teh jajc, sklepamo, da do vertikalnega prenosa kampilobaktrov na potomstvo ne prihaja in da se piščanci v brojlerskih rejah torej okužujejo iz drugih virov. V petih spremljanih brojlerskih jatah je do vnosa kampilobaktrov prišlo teden oz. dva pred koncem reje, šesta jata pa je ostala do konca reje negativna. V jatah, v katerih je prišlo do vnosa kampilobaktrov, se je okužba v tednu dni razširila na vse piščance. Profili PFGE (pulzotipi) so bili pri vseh pozitivnih jatah vezani na posamezne farme.

Rezultati vzorčenja na klavnici so pokazali, da klavniško okolje oz. klavna linija pred začetkom klanja ni kontaminirana s kampilobaktri in da v primeru klanja jate, ki je negativna na kampilobaktre, takšna tudi ostane. Trupi piščancev se na klavni liniji najverjetneje kontaminirajo že med procesom skubljenja ter med evisceracijo. Raven kontaminacije s kampilobaktri se v splošnem niža z bližanjem koncu klavne linije, izgleda pa, da se povprečna stopnja onesnaženosti trupov z vsako klavno serijo povečuje. Na zmanjšanje onesnaženja s kampilobaktri ugodno vpliva spiranje trupov z vodo, še bolj pa hlajenje in zamrzovanje.

Rezultati genotipizacije izolatov iz klavniškega okolja so pokazali, da v klavnici lahko prihaja do navzkrižne kontaminacije piščančjih trupov, vendar je njen pomen majhen. Analize izolatov iz kože vratu namreč kažejo, da se trupi onesnažujejo praviloma s kampilobaktri iz lastnega črevesja oz. s samo enim, za tisto jato značilnim genotipom.

Ob vzorčenju piščancev v prometu smo ugotovili 56% prevalenco. Po pričakovanjih oz. v skladu z rezultati raziskav v klavnici je bil večji del vzorcev kontaminiran z nizkim številom kampilobaktrov. Rezultati testov odpornosti proti protimikrobnim zdravilom, še posebej ciprofloksacinu, kažejo, da se Slovenija uvršča med države EU z najpogostejšo odpornostjo bakterijskih izolatov iz piščančjega mesa.

Rezultati genotipizacije izolatov *C. jejuni*, tako iz klavniških vzorcev kakor iz svežega piščančjega mesa v prodajni mreži, s sekvenciranjem MLST hišnih genov in regije QRDR v genu *gyrA*, odgovornem za odpornost proti ciprofloksacinu, kažejo na klonalno širjenje odpornosti proti temu antibiotiku.

Z anketami za oceno tveganja, ki ga predstavlja splošna slaba informiranost oz. poznavanje ljudi o mikrobioloških tveganjih, povezanih s pripravo piščančjega mesa, smo ugotovili nekatere pomanjkljivosti pri delu zaposlenih v perutninski proizvodni verigi. Poznavanje bakterij *Campylobacter* in njihovih lastnosti je slabo, in sicer še slabše pri potrošnikih kot pri delavcih. Za zmanjševanje kontaminacije perutninskega mesa in s tem povezanih problemov je ključno zagotavljanje visoke stopnje usposobljenosti delavcev in informiranje potrošnikov o varnem rokovanju s perutninskim mesom. Prišli smo do splošnega zaključka, da potrebujemo boljši sistem osnovnega in vseživljenjskega izobraževanja na področju zagotavljanja varne hrane, s poudarkom na odgovornosti potrošnika kot enega od pomembnih dejavnikov tveganja za prenos okužb.

## **Abstract**

Intestinal campylobacteriosis is the most frequently reported bacterial zoonosis in Europe and elsewhere in the developed world. The main causative agent of this foodborne acute gastroenteritis is *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), a common intestinal inhabitant of industrial poultry. The main source of infection during the industrial slaughtering procedure is faecally contaminated poultry meat, due to either inadequate thermal treatment or cross-contamination between thermally treated products and untreated. The present research was designed to identify and study the critical points for introduction or spreading of the causative agent on poultry farms and for contamination of poultry carcasses and meat in poultry slaughterhouses and later in retail, therefore in the entire food-production and food-supply chain.

This study included three parent flocks, sampled for the faeces and eggs, and six broiler flocks, sampled for the environment prior to housing and later for the environment, feedstuffs, water and faeces three times in the first week after housing and then weekly till slaughter. At slaughtering, broilers/carcasses from the same flocks were sampled during the slaughtering process, along the entire slaughter line. In addition, carcasses or chicken meat from the same manufacturer were also sampled later at retail. At the farm level, research was by nature qualitative for the presence of campylobacters. However, to understand the dynamics of contamination at the slaughter line, campylobacters present on the chicken carcasses were quantified. All isolates were genotyped by PFGE method, and isolates from retail chicken were

also tested for the resistance against antimicrobial agents. In addition, risk-assessment surveys were performed among employees in the poultry production chain and consumers.

*C. jejuni* was isolated from all faecal samples collected in parent flocks. However, due to the fact that eggs and dead-in-shell embryos were negative for campylobacters both at the beginning and at the end of the hatching period, and also one- and six-day-old chickens that hatched from these eggs, vertical transmission of campylobacters to progeny can be excluded. Therefore, different source of contamination can be presumed for broiler flocks. In five of the monitored broiler flocks, campylobacters were introduced one or two weeks before the end of rearing, and one flock remained negative to the last. In flocks with campylobacters introduced, the contamination spread to all chickens within a week. In all positive flocks, PFGE profiles (pulsotypes) were linked to individual farms.

Results of slaughterhouse sampling showed that the slaughterhouse environment or slaughter line is not contaminated with campylobacters prior to slaughtering, and that the negative flock remains negative for campylobacters till the end of the process. At the slaughter line, contamination of chicken carcasses most likely occurs already during plucking and during evisceration. The level of contamination with campylobacters in general decreases towards the end of the slaughter line. However, it seems that the average level of carcass contamination increases with each slaughter batch. Carcass rinsing with water and, to a greater extent, cooling and refrigeration have a beneficial effect on the reduction of contamination with campylobacters. Results of genotyping of the isolates obtained from the slaughterhouse environment showed that cross-contamination of chicken carcasses at the slaughterhouse is possible, but has little significance. Namely, analyses of the neck-skin isolates showed that carcasses as a rule become contaminated with campylobacters from their own intestines or with only one genotype that is characteristic of the particular flock.

Sampling of retail chicken showed a prevalence of 56%. As expected, or in congruence with the results obtained from the slaughterhouse research, a larger part of the samples was contaminated by low numbers of campylobacters. Results of testing the resistance against antimicrobial agents, especially ciprofloxacin, showed that Slovenia ranks among EU states with the most common resistance of bacterial isolates from chicken meat.

Genotyping results for the *C. jejuni* isolates, originating both from the slaughterhouse samples than from the fresh retail chicken meat, showed a clonal spread of resistance against ciprofloxacin after MLST sequencing of the housekeeping genes and QRDR region of *gyrA*, coding for the resistance against this antibiotic.

Surveys for the assessment of risk, generated by generally poor public awareness of microbiological risks related to handling/preparation of chicken meat, showed some deficiencies at work performed by the employees in the poultry production chain. Knowledge on the Campylobacter bacteria and their properties is poor, both on the consumers and poultry industry employees side (though the latter show greater knowledge after all). Assurance of high-level competence of employees and education of consumers on safe handling the poultry meat is essential for lowering the contamination of poultry meat and for reducing the related problems. A general conclusion could be made that a better system of elementary and lifelong education in the field of safe-food assurance is needed, giving emphasis on the responsibility of consumers as one of the important risk factors for the transmission of infections.

## 1. Uvod

Bakterije iz rodu *Campylobacter* so od leta 2004, ko so po številu primerov okužb prehiteli salmonele, najpogostejše povzročiteljice gastrointestinalnih okužb pri ljudeh v EU. Za razliko od salmoneloz se pojavnost kontaminacij perutninskega mesa in okužb pri človeku s kampilobaktri v EU še vedno povečuje. Po zadnjih uradnih podatkih EFSA (za l. 2012) je trenutna prevalenca tovrstnih obolenj 55,49 na 100.000 prebivalcev EU (okužbe s *Salmonella* sp.: 22,2 na 100.000), medtem ko je bila v Sloveniji prevalenca v tem letu stabilna na 46,83/100.000 (EFSA 2012).

Intestinalna kampilobakterioza v večini primerov poteka v obliki blažje nekajdnevne vodene driske z bolečinami v trebuhu, slabostjo, vročino in glavobolom. Zdravljenje ob takšnem poteku ni potrebno. V redkih primerih so možni zapleti v obliki reaktivnega artritisa in živčnih motenj, nekateri pa okužbo s kampilobaktri navajajo tudi kot predispozicijski faktor za sindrom Guillain-Barre. Bolezen se običajno pojavlja v obliki velikega števila posamičnih primerov; večji izbruhi so redki: v letu 2009 so kampilobaktri povzročili le 6% vseh izbruhov alimentarnih okužb v EU, pri čemer so bili le-ti večinoma omejeni na družine oz. manjše skupine. Ljudje se najpogosteje okužijo s preslabo termično obdelanim perutninskim mesom (pikniki) ter zaradi nepoznavanja primernih higienskih postopkov v kuhinji oz. ob pripravi mesa (navzkrižna kontaminacija termično že obdelanih živil s termično neobdelanimi).

Termotolerantni kampilobaktri so v naravi široko razširjeni – kot komezali so prisotni v prebavnem traktu domačih in divjih živali, zlasti perutnine (*C. jejuni*) in prašičev (*C. coli*), od koder med postopkom klanja kontaminirajo meso in mesne proizvode. Kontaminaciji trupov se je zaradi tehnologije klanja praktično nemogoče izogniti in sodeč po rezultatih temeljne študije iz leta 2008 je odstotek s termofilnimi kampilobaktri kontaminiranih piščančjih trupov ob zaključku klavniškega postopka v večini držav udeleženk večji od odstotka prevalence termofilnih kampilobaktrov v brojlerskih jatah pred klanjem (prisotnost termofilnih kampilobaktrov v črevesju teh živali). Posamezne raziskave potrjujejo, da se lahko trupi brojlerjev kontaminirajo ne le s kampilobaktri iz lastnega črevesja, temveč tudi medsebojno. Zaradi tehnologije klanja bi tako lahko s kampilobaktri močno kolonizirani piščanci kontaminirali tudi sicer negativne piščance, ki jim sledijo na liniji klanja. Postavlja se torej vprašanje, kje in kako vpeljati učinkovit nadzor in učinkovite tehnološke ukrepe tudi znotraj perutninske klavnice, ki je ena od pomembnih faz proizvodnje perutninskega mesa, za največjim potencialom navzkrižne kontaminacije z mikrobi. Če pa gledamo celotno živilsko-prehransko oskrbovalno verigo, pa je potrebno upoštevati tudi distribucijo in prodajo, predvsem pa potrošnika in način končne priprave perutninskega mesa za uživanje. Seznam kritičnih kontrolnih točk se tako še dodatno podaljša in poglobi, saj je to dejanska končna kritična točka za preprečevanje okužb s kampilobaktri. Pri tem velja omeniti, da je infekcijska doza za *C. jejuni* relativno nizka (cca 500 bakterij), kar povečuje potrebo, da se stopnja kontaminacije perutninskega mesa zmanjša na najmanjšo možno mero.

Rezervoar okužb ljudi s *C. jejuni* je torej prvenstveno perutnina oz. izdelki iz perutninskega mesa, ki so tako v Sloveniji kot drugod v EU skorajda vsakodnevno na jedilniku. Ker so ptice oz. perutnina naravni gostitelj termofilnih kampilobaktrov, je *C. jejuni* pogosto prisoten tudi v prebavilih brojlerjev v industrijskih perutninskih rejah. Način vnosa bakterije v brojlerske reje ostaja kljub mnogim raziskavam uganka. Ker *C. jejuni* ni pretirano izbirčen glede svojih gostiteljev in ker je relativno pogost tudi v okolju (voda, vlaga), lahko bakterijo vnesemo v reje na zelo različne načine – z obleko in obutvijo, preko miši in podgan, z žuželkami, preko divjih

ptic, z vodo za napajanje, preko prezračevalnega sistema, s kontaminirano krmo ter na druge načine. V zadnjem času se kot možne vektorje prenosa v raziskovanju možnih virov kolonizacije prebavil in kot rezervoar *C. jejuni* v pitni vodi (vključno z biofilmi na vodovodnih ceveh in napajalnikih) omenja tudi praživali. Brojlerji do dveh tednov starosti običajno še niso kolonizirani s kampilobaktri; po tej starosti pa prekuženost s časom eksponentno narašča. Kaže, da na prevalenco termofilnih kampilobaktrov v brojlerskih rejah vpliva tudi geografska širina oz. podnebje (Smole Možina in sod., 2011).

Rezultati temeljne študije iz leta 2008 so pokazali oz. potrdili, da je odstotek kolonizacije v severnoevropskih državah bistveno nižji od srednje- ali južnoevropskih. Najnižji odstotek *C. jejuni* v brojlerskih rejah dosegajo Estonija, Norveška in Finska (2%, 3% in 4%); v srednjeevropskih državah je odstotek že bistveno višji (npr Nemčija: 48,9%, Velika Britanija 75%, Francija 76%, Slovenija 78,2%), medtem ko je prekuženost na Portugalskem 86%, v Španiji 88%, na Malti pa kar 96%. Vertikalni prenos v izvaljene piščance še ni bil dokazan, zato večina raziskovalcev v Evropi podpira tezo, da je odločujoč horizontalni prenos iz okolja. Dejstvo pa je, da je zaradi izredno pestrega nabora možnosti vnosa obvladovanje tega problema v celotni verigi reje perutnine (matične živali - valilnica - brojlerji) zelo težavno.

Evropska komisija prepušča ukrepanje glede zmanjševanja tveganja prenosa bolezni na ljudi državam članicam samim, vendar so doslej konkretne aktivnosti izvajale le skandinavske države, ki ukrepajo pretežno v smeri preprečevanja vnosa *C. jejuni* na farme, s spodbujanjem rejcev z izplačevanjem višje odkupne cene za jate, proste kampilobaktrov, in s ciljanim izobraževanjem potrošnikov. Šolski primer uspešnega ukrepanja je Islandija, ki je pred nekaj leti z učinkovito akcijo v omenjenih smereh v kratkem času preprečila epidemično širjenje kampilobaktrov v reji perutnine in tako močno zmanjšala število humanih okužb (EFSA, 2006). Dejstvo pa je, da je strategija ukrepanja odvisna do stopnje prevalence – enak pristop bi bil v srednje- ali južnoevropskih državah odločno predrag, učinek pa najmanj vprašljiv.

Glavni namen našega projekta je bil dejansko omogočiti zmanjšanje kontaminiranosti živil perutninskega izvora s kampilobaktri v Sloveniji. Realizacija tega cilja nam bi dala pomembno prednost v močni globalni konkurenci pri oskrbi trga s perutninskimi izdelki. Seveda je za zmanjšanje števila okužb s kampilobaktri pri ljudeh tudi zelo pomembna dobra praksa pri končni pripravi perutninskega mesa za uživanje. Pri tem je ključnega pomena znanje in osveščenost tistih, ki hrano pripravljajo, bodisi v družbeni prehrani ali domačih gospodinjstvih. Zato smo želeli s projektom najprej raziskati realno stanje v praksi, nato pa organizirati izobraževanje tistih akterjev, za katere se bo na osnovi rezultatov raziskave izobraževanje izkazalo za potrebno. Znanje in zavedanje o tveganjih je po dosedanjih izkušnjah med različnimi skupinami potrošnikov zelo različno (Jevšnik in sod., 2008a, b, c, d; Raspor in Jevšnik, 2008).

Za doseg tega cilja smo morali najprej izpeljati raziskave za ugotovitev osnovnih dejstev v zvezi s kolonizacijo prebavnega trakta industrijske perutnine s *C. jejuni*, in sicer način in čas vnosa v jato ter dinamiko in stopnje kolonizacije živali s to bakterijo. V klavnici smo definirali kritične tehnološke stopnje, točke oz. postopke, ki privedejo do kontaminacije perutninskega mesa med klanjem. Tovrstnih raziskav doslej pri nas še ni bilo, rezultati podobnih študij strokovnjakov v tujini pa se glede na področje razlikujejo in ne dajejo enoznačnih odgovorov (Smole Možina in sod., 2011), kar ne odpira možnosti za hitre in učinkovite rešitve. Možno je tudi, da so omenjene kritične točke specifične za vsako posamezno klavnico, zaradi česar bi bilo treba tudi ukrepe temu ustrezno prilagoditi.

V slovenskih razmerah so termotolerantni kampilobaktiri na brojlarskih farmah prisotni v skoraj 80% pregledanih jat, podobna pa je tudi stopnja kontaminiranosti piščančjih trupov ob zaključku klavnega procesa, vendar z relativno nizko ugotovljeno koncentracijo kampilobaktrov na pregledanih trupih, zato so se naša največja pričakovanja navezovala ravno na rezultate raziskav klavniškega procesa in okolja. V naših razmerah se med klavnim procesom torej onesnaži velik odstotek trupov, vendar je število kontaminirajočih kampilobaktrov nizko, kar pomeni, da bi lahko to število po določitvi in analizi kritičnih točk in uvedbi ustreznih korekcijskih higienskih ali tehnoloških ukrepov še dodatno, morda celo odločilno zmanjšali. Enako velja za končno pripravo perutninskega mesa za uživanje.

Z našimi raziskavami smo želeli, skladno z opisanimi cilji v razpisu, ugotoviti in raziskati kritične točke za kontaminacijo s kampilobaktiri v celotni živilsko-proizvodni in prehransko-oskrbovalni verigi, in sicer v naslednjih pomembnih stopnjah:

- v matičnih jatah za preveritev oz. ovržbo vertikalnega prenosa okužbe s kampilobaktiri pri živalih;
- v brojlarskih jatah za določitev časovnega okvira, načina širjenja in stopnje okužbe brojlerjev, pri čemer je pomembna tudi prisotnost kampilobaktrov v okolju brojlerskih jat (voda, žuželke, glodavci, krma, prostoživeče ptice),
- v klavnici – raziskali smo kritične točke kontaminacije in navzkrižne kontaminacije na različnih točkah/stopnjah tehnološkega procesa klanja živali kot zadnje in ključne proizvodne stopnje izdelka-perutninskega mesa,
- v prodaji in končni pripravi perutninskega mesa za uživanje, kjer je ključnega pomena znanje in zavedanje o tveganjih pri vseh tistih, ki meso pripravljajo za končno uživanje.

Podatki zbrani v sklopu te raziskave bodo podlaga za pripravo strategije uradnega nadzora nad tem pomembnim povzročiteljem pri nas.

## 2. Podatki iz literature

Bakterije iz družine *Campylobacteriaceae*, rod *Campylobacter*, so nesporogene gramsko negativne in oksidazno pozitivne palčke, velikosti 0,2-0,8  $\mu\text{m}$  x 0,5-5  $\mu\text{m}$ . Njihove bakterijske celice so pleomorfne: v logaritmični fazi rasti so to značilne, vitke, zakrivljene ali spiralno zavite oblike (spirili), ki se z zvijanjem vzdolž daljše osi živahno gibljejo s pomočjo bička na enem polu celice (monotrihni) ali bičkov na obeh polih (amfotrihni). S staranjem kulture je spirilov vse manj, zamenjajo jih kokoidne ali cistične oblike (Barrow and Feltham, 1993).

V splošnem kampilobaktiri ne rastejo v običajnih aerobnih ali anaerobnih razmerah rasti in ne fermentirajo ali oksidirajo sladkorjev. So kapnofilne bakterije (za rast potrebujejo 4-10 %  $\text{CO}_2$ ), zelo občutljive na kisik, ki ga sme biti v atmosferi največ 10 % (optimalno 5–10 %, torej mikroaerofilna atmosfera: 5–10 %  $\text{O}_2$ , 4-10 %  $\text{CO}_2$ , ostalo  $\text{N}_2$ ), ter na prisotnost vodikovega peroksida ali superoksidnih anionov; v ta namen se zaradi nevtralizacije teh toksičnih molekul dodajata v gojišča za izolacijo in kultivacijo lizirana kri in FBP (Fe-sulfat, Na-metabisulfit in Na-piruvat, vsakega po 0,025 %; ICMSF, 1996). Prav ta krhkost kampilobaktrov in posledična zahtevnost za kultivacijo je verjetno odgovorna za relativno težavno in drago diagnostiko obolenj, ki jih te bakterije povzročajo, ter za razmeroma majhen odstotek potrjenih okužb (Smole Možina in Uzunović-Kamberović, 2005).

Vrsti, ki najpogosteje kontaminirata živila in sta odgovorni za akutne enterokolitise oz. intestinalno kampilobakteriozo pri ljudeh, sta *C. jejuni* (93-96 % kampilobakterioznih drisk pri ljudeh), s podvrstama *jejuni* (pogostejši povzročitelj obolenj) in *doylei*, ter v manjši meri *C. coli*



(3-7 %). Enteropatogeni vrsti sta za ljudi še *C. lari* in *C. upsaliensis* (skupaj 1%; Barrow and Feltham, 1993; Nielsen et al., 1997; Wooldridge & Ketley, 1997; Anon, 1999c, Humphrey et al., 2007).

Od večine ostalih kampilobaktrov se omenjene za človeka patogene vrste razlikujejo po visoki optimalni temperaturi rasti (42-43°C), od tod tudi izraz termofilni oz. termotolerantni kampilobaktiri.

#### Preživetje termofilnih kampilobaktrov

Termofilni kampilobaktiri so sposobni razmnoževanja in rasti pri temperaturi 32-45°C (optimum 42-43°C), pH 4,9-9 (optimum 6,5-7,5), deležu NaCl 0-1,5 % (optimum 0,5), vodni aktivnosti ( $a_w$ ) nad 0,987 (optimum 0,997) in v atmosferi s 5-10 % O<sub>2</sub> ter 10 % CO<sub>2</sub> (ICMSF, 1996). Iz tega izhaja, da se kampilobaktiri med klanjem npr. piščancev oz. na liniji klanja ne razmnožujejo, prav tako ne po obdelavi mesa, med transportom in na policah trgovin (pogoj: hladna veriga!). Lahko pa ti kontaminanti preživijo na ali v mesu in v izdelkih iz perutninskega mesa, ki se hranijo pri 4°C ali zamrznjeni, tudi več mesecev (ICMSF, 1996). Isti vir pa navaja občutljivost na sušenje, nizek pH (<5,1), koncentracijo soli nad 1,5 % in pasterizacijo oz. toplotno obdelavo (D-vrednosti so 0,21-2,25 minut pri 55-60°C). Kampilobaktiri v t.i. fazi VBNC (Viable but Not Culturable Cells; Beumer, 1992; Jackson, 2009) v teh podatkih niso obravnavani, so pa predmet tudi večletnih slovenskih raziskav sodelujoče skupine projekta (Klančnik et al., 2006, 2008, 2009).

*C. jejuni* lahko v vlažnem okolju pri 4°C preživi več tednov, hitreje pa propada pri sobni temperaturi (Bolton, 1987). V fecesu preživi najmanj 20 dni pri 35°C, pri 4°C pa 8 tednov. Pasterizacije ne preživi (Van der Walt, 2004).

#### Rezervoar okužbe

Osnovni rezervoar termotolerantnih *Campylobacter* spp. je prebavni trakt domačih in divjih ptic in sesalcev (Anon., 1999). Glavni vir *C. jejuni* so ptice (brojlerji: 2-100% pozitivnih jat; EFSA BS report 2010; purani: 10-89,7% pozitivnih jat; Anon., 2010, Anon., 2011); prevalenca je, zlasti v nordijskih državah, višja v poletnih mesecih (30 % pozitivnih jat brojlerjev pozimi, 70 % poleti; Wedderkopp, 2001). Vir *C. coli* so prašiči (24,8-79,6 % pozitivnih rej; Boes, 2005). Pri govedu se pojavlja predvsem *C. jejuni* (do 61 % rej; Besser, 2005), prav tako pri psih (0-37 %) in mačkah (1,7-5,1 %; Fox, 1990). Kampilobaktre so izolirali tudi iz glodavcev, hroščev in muh (Cabrita et al., 1992; Jacobs-Reitsma et al., 1995; Berndtson, 1996).

Piščanci, starejši od enega tedna po navadi ne zbolijo (Lam et al., 1992). Peroralna okužba povzroči kolonizacijo distalnega dela jejunuma, cekuma in kloake (Shane, 2000). Na splošno se okužba znotraj jate hitro raznese; prevalenca je v kloakalnih brisih narasla z 2 % 10. dan na 80 % 20. dan, kasneje pa celo do 100 % (Genigeorgis, 1986; Evans, 2000). Jate so lahko okužene z več različnimi sevi *C. jejuni*, vendar običajno eden med njimi prevlada (Petersen, 2001).

Kampilobaktiri naj se ne bi prenašali niti vertikalno z valilnimi jajci niti horizontalno iz ene jate v drugo z zaostalimi kampilobaktiri v hlevih po depopulaciji. Glavni vir je kontaminirano okolje (Jacobs-Reitsma, 1997). Možen je posredni mehanski prenos *C. jejuni* preko osebjaja (obleka, obutev in oprema kontaminirana s svežim fecesom), nastilja, prosto živečih ptic (*Columbae*, *Galliformes* in *Anseriformes*), črvov, glodavcev in hišnih muh (Shane, 2000). Vir okužbe za

piščance je tudi kontaminirana voda (Kapperund et al, 1993). Zaradi majhne vsebnosti vode (pod 0,8 a<sub>w</sub>) krmil ne prištevajo med možne vire okužbe, lahko pa se krma kontaminira v krmilnikih v objektu z izločki ali fecesom živali in tako postane vir okužb še za druge (Shane, 2000). Jajca, zamazana z iztrebki, posebno še, če je hkrati poškodovana lupina, so ob neustreznih higieni lahko vir okužbe valilnice (Shane, 2000).

Pomembno vlogo v ekologiji bakterije *Campylobacter* sp. igra voda: različne vrste *Campylobacter* sp. so bile v prevalenci do 50% izolirane iz površinskih vod, rek in jezer (Bolton et al., 1987; Arvanitidou et al., 1995). Vse to nakazuje na prisotnost kampilobaktrov v netretirani pitni vodi in v kopališčih. Vir kontaminacije vode so sanitarne odplake ter feces divjih ptic in sesalcev (Brennhovd et al., 1992; Blaser et al., 1980). Podatki o kontaminaciji slovenskih vzorcev površinskih vod in pitne vode so bili zbrani tudi v mednarodnih projektih z udeležbo slovenskih raziskovalcev iz sodelujoče skupine v tem projektu (Smole Možina et al., 2008; Kurinčič et al., 2009).

V vodi in drugih okoljih z neoptimalnimi pogoji za rast preidejo kampilobaktri v t.i. fazo VBNC: v takšni obliki so bakterije žive, vendar jih z znanimi metodami ni mogoče kultivirati (Jackson, 2009). Patogenost kampilobaktrov v tej fazi za ljudi še ni znana, prav tako še ni pojasnjena vloga VBNC kampilobaktrov v živilih. Njihov pomen pri kontaminaciji mesa oz. živil ter pri prenosu okužbe na človeka je predmet raziskav tekočega podoktorskega projekta sodelujoče raziskovalne skupine tega projekta.

#### Dejavniki tveganja

Okužbe s termofilnimi kampilobaktri so le izjemoma epidemičnega značaja; v takšnih primerih je določitev vira okužbe običajno enostavna. V večini primerov so okužbe sporadične; vsak posamičen primer je specifičen, vir pa ostaja največkrat neznan. Za določanje vira okužbe se uporabljajo različne metode za tipizacijo kampilobaktrov, od seroloških (serotipizacija), viroloških (fagotipizacija) do modernih molekularnih metod (PFGE, AFLP, RAPD; Fitzgerald, 2001; Čadež in Štorman, 2004; Gruntar et al., 2010; Smole Možina et al., 2010).

Glavni dejavnik tveganja je uživanje s kampilobaktri kontaminiranih toplotno neobdelanih živil (zlasti perutninskega mesa in nepasteriziranega mleka) ali neustrezno obdelane vode (Hänninen et al., 1999). Pogoste so okužbe na potovanjih (Adak et al., 1995). Neposreden prenos s človeka na človeka je zelo redek (Skirrow, 1998). Zelo pomembna je osebna higiena, zlasti pogosto umivanje rok ter zmanjševanje možnosti navzkrižne kontaminacije pri pripravi hrane (Luber, 2009).

Poglavitni vir okužbe s kampilobaktri je kontaminirano perutninsko meso. Do kontaminacije tega prihaja na klavni liniji, ko med avtomatiziranim klavnim procesom prihaja do neizogibne kontaminacije s črevesno vsebino tako trupov kot tudi klavniškega okolja (Mead, 1995). Kritičnih mest je več: kopel za omamljanje, parjenje, skubljenje, evisceracija, hlajenje in druga (Fluckey, 2003; Uhan, 2011). Visoko stopnjo kontaminacije slovenskega perutninskega mesa v prodaji izkazujejo dosedanje raziskave udeleženih skupin tega projekta in uradna poročila (Zorman in Smole Možina, 2002; Kurinčič et al., 2005; Smole Možina et al., 2011; IVZ, 2010; EFSA, 2010).

Po klanju pozitivne jate so lahko trupi ob zaključku klavnega postopka kontaminirani s preko 10<sup>5</sup> CFU/ g (Anon., 2010), na takšni klavni liniji pa se seveda lahko kontaminirajo tudi trupi iz

sicer negativnih rej. Sicer negativne jate se lahko okužijo med transportom v klavnico, v nezadostno očiščenih in razkuženih transportnih kletkah.

### **3. Material in metode dela**

V izvedbo projekta so bili vključeni raziskovalci različnih raziskovalnih skupin Veterinarske fakultete (VF) in Biotehniške fakultete (BF) Univerze v Ljubljani ter raziskovalci in strokovnjaki Perutnine Ptuj d.d. in strokovnjaki Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH).

V prvi fazi projekta je potekalo vzorčenje v matičnih jatah, ki ga je v sodelovanju s strokovnjaki Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine VF izvedla Veterinarska ambulanta Perutnina Ptuj Veterinarstvo d.o.o. Mikrobiološke preiskave so bile opravljene na Inštitutu za higieno živil in na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo VF. Pozneje smo vzorčili brojlerske reje, ki so izvirale iz teh že pregledanih matičnih jat. Vzorčili smo v tedenskih časovnih intervalih, začenši z 1 dan starimi piščanci. Hkrati smo vzorčili tudi okolje brojlerskih rej. Preiskali smo vzorce vode, krme, žuželk, glodavcev, prostoživečih ptic in druge vzorce, za katere smo menili, da bi bili lahko vir okužbe za brojlerje. Raziskave smo z nosilci proizvodnje oziroma njihovimi kooperanti uskladili tako, da smo preiskali različne reje, ki so se istočasno klale v isti klavnici. Vsi izolirani sevi so bili molekularno tipizirani z metodo pulzne elektroforeze (PFGE), ki se je izvajala na VF.

V drugi fazi projekta smo se osredotočili na vzorčenje na liniji klanja. Vzorčili smo piščance neposredno pred klanjem in njihove trupe na posameznih točkah klavne linije. Tudi v tej fazi smo vse izolate genotipizirali zaradi ugotavljanja morebitne navzkrižne kontaminacije na liniji klanja. Pri tem smo za relevantno število izolatov uporabili dve različni metodi molekularne tipizacije, in sicer pulzno elektroforezo (PFGE) ter novejšo metodo tipizacije na osnovi sekvenciranja multilokusnih zaporedij (MLST). Vzorčili smo tudi trupe piščancev po zamrzovanju. Dodatno smo z namenom ugotovitve trenutnega stanja, vzorčili piščančje izdelke iz prometa. Preiskave smo opravili na VF, BF in v NLZOH.

#### **3.1. Vzorčenje**

##### **3.1.1. Farme**

###### **Matične jate**

Vzorčili smo v dveh matičnih jatah. V vsaki jati smo odvzeli 25 skupnih vzorcev fecesa kokoši in petelinov iz treh objektov. Da bi preverili kontaminacijo jajčne lupine smo v istih jatah vzorčili tudi skupinske vzorce površine jajc iz 25 pladnjev (25x 30 jajc), tako na začetku kot tudi na koncu valilnega obdobja. Vzorčili in analizirali smo tudi 10 zamrtkov iz omenjenega valilnega ciklusa.

###### **Brojlerske jate**

Tik pred vselitvijo so bili tako v spomladanskem kot v jesenskem ciklusu na farmah odvzeti in obdelani vzorci nastilja, krme, vode za napajanje, ventilacijskega sistema, žuželke in iztrebki glodalcev. Skupno je bilo v predvselitveni fazi pregledanih 45 vzorcev, povsod pa je bil rezultat negativen na kampilobakte. Po vselitvi smo v prvem tednu vzorčili večkrat, in sicer en dan

stare piščance, nato 3 dni in še 6 dni stare piščance, kasnejša vzorčenja pa so bila izvedena v tedenskih časovnih intervalih, vse do 39 dne starosti, dva dni pred samim zakolom. Ob vsakem vzorčenju smo na vsaki farmi odvzeli po 10 vzorcev kloakalnih brisov ali vzorcev fecesa, skupni vzorec nastilja in skupni vzorec krme in vode za napajanje. Izolacijo iz vzorcev vode, nastilja in krme smo, da bi določili najučinkovitejšo metodo, vsakič izvajali na tri različne načine, izolacija iz fecesa pa je potekala na standarden način. Skupno je bilo tako izvedenih 5 tedenskih vzorčenj, odvzetih je bilo skupno 195 vzorcev, opravljenih pa 285 preiskav na kampilobakte.

Skupno je bilo na farmah o vselitvi piščancev odvzetih 299 vzorcev, na katerih je bilo opravljenih 429 preiskav na prisotnost termofilnih kampilobaktrov (TK).

### 3.1.2. Klavnica

Na dan vzorčenja smo pred začetkom klanja najprej odvzeli vzorce na klavni liniji, in sicer vodo za omamljanje, vodo za skubljenje, stroj za odpiranje kloak, stroj za evisceracijo ter nekatere točke v razsekovalnici (brisi miz za razkosevanje, pladnjev, tekočega traku). V jesenskem terminu smo med zakolom vzorčili tudi zrak za analizo prisotnosti TK v aerosolu, in sicer in sicer na mestu skubljenja in na mestu evisceracije. Iste točke klavne linije in razsekovalnice smo vzorčili tudi po koncu klanja klavnih serij, ki smo jih tisti dan spremljali. Med samim zakolom smo pri vsaki klavni seriji vzorčili kožo vratnega dela trupa desetih piščancev, vsakega na štirih izbranih kritičnih točkah klavne linije: po skubljenju, po evisceraciji, po spiranju pred hlajenjem ter po trodnevnem hlajenju oz. zamrzovanju. Pri teh vzorcih smo ugotavljali prisotnost in stopnjo (CFU) kontaminacije trupa s TK na posameznih mestih klavne linije. Ob evisceraciji smo odvzeli tudi slepa črevesa vzorčenih trupov in jih pregledali na prisotnost in genetski tip TK. V dogovoru s proizvajalcem smo v jesenskem terminu na klavno linijo najprej poslali negativno rejo, nato pozitivno in kot tretjo še rejo, pri kateri so bili na farmi kampilobaktri ugotovljeni zgolj v vodi. Skupno je bilo odvzeto 240 vzorcev kože, na katerih je bilo opravljeno prav toliko analiz na prisotnost in štetje TK, 60 vzorcev cekumov za 60 preiskav na prisotnost TK in 62 vzorcev klavniškega okolja (voda za omamljanje, voda za skubljenje, stroj za kloake, stroj za evisceracijo, razni trakovi, pladnji, odtoki) in zrak.

### 3.1.3. Promet

V obdobju od 5. 11. 2012 do 17. 6. 2013 smo v 8 prodajalnah izvedli 12 vzorčenj večinoma trupov ali pa dele trupov piščancev s kožo in sicer zgolj enega izbranega proizvajalca. Med posameznim vzorčenjem smo pazili, da nismo izbirali vzorcev istih rejcev. Med skupno 111 izbranimi vzorci, smo identificirali 54 različnih rejcev za 75 vzorcev. Vsi ti vzorci so bili embalirani, eden v kontrolirani atmosferi. Za 36 vzorcev rejce nismo identificirali, saj je bilo 34 od teh vzorcev neembaliranih (rinfuza; piščančja perut, krača, bedro), dva pa sta bila embalirana v kontrolirani atmosferi, vendar rejec ni bil naveden.

## 3.2. Način vzorčenja in obdelava vzorcev

### 3.2.1. Feces

Feces smo vzorčili bodisi iz svežih iztrebkov na farmah ali iz slepih čreves, odvzetih na klavni liniji. Vzorce svežih iztrebkov smo vzorčili in shranili v posodice za blato, slepa črevesa pa smo v celoti shranjevali v dobro zaprte plastične vrečke. Vzorce smo shranili na hladnem in jih tako tudi transportirali v laboratorij. Pregledali smo jih na prisotnost TK.

### 3.2.2. Koža, meso

Kožo smo vzorčili tako, da smo s sterilnimi škarjami in pinceto način odrezali košček kože na vratnem delu trupa, velikosti cca 2 cm<sup>2</sup> in teže vsaj 1 g. Meso smo vzorčili tako, da smo na sterilni način odrezali košček mesa s površine, teže vsaj 1 g. Vzorce smo hranili na hladnem v zaprtih sterilnih posodah (npr. ustrezne epruvete); pregledali smo jih na prisotnost in število TK.

### 3.2.3. Voda

Vodo smo vzorčili v količini 1 litra; vzorec je bil takoj ohlajen na 4°C in tako tudi dostavljen v laboratorij. V laboratoriju smo vzorec centrifugirali pri 10.000g, sediment smo pregledali na prisotnost in število TK.

### 3.2.4. Bris

Vzorec v obliki brisa smo odvzeli z veliko vatenko, ki smo jo predhodno navlažili v obogatitvenem gojišču za izolacijo termofilnih kampilobaktrov (Bolton bujon, BB), temeljito smo obrisali 25 cm<sup>2</sup> preiskovane površine. Vatenko smo nato odlomili v epruveto z 9 ml BB, ki smo jo dobro zaprto in na hladnem dostavili v laboratorij, kjer smo ugotavljali prisotnost in število TK.

### 3.2.5. Zrak

Zrak smo vzorčili z vzorčevalnikom Coriolis Delta air sampler (Coriolis), ki deluje na ciklonskem principu vzorčenja v tekoči medij. Posamezen vzorec smo vzorčili 30 minut s pretokom 300 l/min.

Vsi odvzeti vzorci so bili takoj ohlajeni na 4°C in še isti dan transportirani v laboratorij. V laboratoriju so šli v obdelavo takoj oziroma najpozneje v roku 24 ur od odvzema.

## 3.3. Metode dela

### 3.3.1. Bakteriološke metode: izolacija, determinacija in štetje bakterij

Kampilobakte smo izolirali iz vzorcev v skladu z modificirano standardno metodo ISO 10272-1:2006 (Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti termotolerantnih *Campylobacter* sp.), in sicer s cepljenjem na tekoča selektivno-obogatitvena gojišča, z njih pa na trdna selektivna gojišča, za vzorce, v katerih se pričakuje visoka vsebnost kampilobaktrov (feces), pa z direktno inokulacijo vzorca na trdna selektivna gojišča. Pri bakterijah iz sumljivih kolonij smo z mikroskopsko preiskavo nativnega preparata opazovali za kampilobakte značilno vejičasto obliko, gibljivost in velikost. Sumljive kolonije smo za pridobitev čiste kulture precepljali na neselektivno gojišče. Čisto kulturo na kampilobakte sumljivih bakterij smo z ustreznimi biokemijskimi preiskavami in preizkušanjem občutljivosti na nalidiksinsko kislino in cefalotin

identificirali najprej do rodu in nato do vrste. Vse determinirane izolate smo za potrebe nadaljnjih analiz shranjevali pri  $-70^{\circ}\text{C}$ . V vzorcih, v katerih nas je zanimalo število TK na enoto vzorca, smo vsebnost kampilobaktrov določali v skladu z metodo ISO 10272-2:2006 (Horizontalna metoda za ugotavljanje števila termotolerantnih *Campylobacter* sp.).

### Izolacija TK

Za preiskavo fecesa smo nasadili eno bakteriološko zanko neposredno na selektivni gojišči za izolacijo kampilobaktrov (mCCDA in Skirrow) ter inkubirali 40-48 ur pri  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  v mikroaerofilni atmosferi.

Za preiskavo tkiva/organov smo vzorec v količini 1 g dobro homogenizirali in prenesli v epruveto z 9 ml BB. Če smo želeli pregledati več kot 1g ali 1 ml vzorca, smo ustrezno prilagodili količino BB (9-kratnik količine vzorca v preiskavi). Inkubirali smo 42-48 ur pri  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Po eno bakteriološko zanko suspenzije vzorca v BB smo nato cepili na selektivni gojišči za izolacijo kampilobaktrov (mCCDA in Skirrow) ter inkubirali 40-48 ur pri  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  v mikroaerofilni atmosferi.

Za preiskavo brisa površine smo tega v celoti prenesli v epruveto z 9 ml BB. Epruvete z vzorci v BB smo dobro zaprli in inkubirali 42-48 ur pri  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Po eno bakteriološko zanko suspenzije vzorca v BB smo nato cepili na selektivni gojišči za izolacijo kampilobaktrov (mCCDA in Skirrow) ter inkubirali 40-48 ur pri  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  v mikroaerofilni atmosferi.

Za preiskavo vode, smo le-to centrifugirali pri  $10.000\text{g} / 10'$ , sediment v celoti prenesli v epruveto z 9 ml BB. Epruvete z vzorci v BB smo dobro zaprli in inkubirali 42-48 h pri  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Po 1 bakteriološko zanko suspenzije vzorca v BB smo nato cepili na selektivni gojišči za izolacijo kampilobaktrov (mCCDA in Skirrow); ki smo ju nato inkubirali 40-48 ur pri  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  v mikroaerofilni atmosferi.

Plošče smo po inkubaciji pregledali na prisotnost značilnih kolonij: na obeh gojiščih so sumljive kolonije sive ali prosojne, ploščate, z zelenkastim ali rumenorjavim odtenkom, velikosti 1 – 3 mm, gladke ali razlite, v gosti rasti in pri podaljšanji inkubaciji pogosto opalescirajo.

### Determinacija (določitev vrste) TK

Za potrjevanje smo izbrali najmanj dve in največ pet\* tipičnih ali sumljivih kolonij (\*ko sta bila prisotna več kot dva tipa sumljivih kolonij) iz vseh inokuliranih plošč. Rod *Campylobacter* smo potrdili z mikroskopsko preiskavo nativnega preparata (pokrita kapljica) in oksidaznim preizkusom izbranih in suspendiranih kolonij. Če smo na ploščah potrdili rod *Campylobacter*, smo nadaljevali s postopkom identifikacije do nivoja vrste in sicer na podlagi rezultatov katalaznega preizkusa (vsi TK pozitivni, razen *C. upsaliensis*, ki je lahko negativen), indoksil-acetatnega preizkusa (vsi pozitivni, razen *C. lari*, ki je negativen) in preizkusa hidrolize hipurata (pozitiven samo *C. jejuni*).

### Štetje TK

Za ugotavljanje števila TK na kožah smo najprej pripravili primarno suspenzijo vzorca tako, da smo vzorcu dodali 9 kratno količino raztopine (puferirana peptonska voda) za redčenje ter

vzorec homogenizirali. Ustrezni volumen osnovne suspenzije ter dodatnih decimalnih redčenj smo cepili na selektivno trdno gojišče mCCDA. Za preiskavo posameznega vzorca smo izvajali cepitev najmanj dveh decimalnih redčenj.

Po inkubaciji smo plošče pregledali na prisotnost značilnih kolonij: na gojišču mCCDA so sumljive kolonije sive ali prosojne, ploščate, lahko s kovinskim sijajem, velikosti 1 – 3 mm ter gladke ali razlite. Značilne kolonije smo prešteli. Glede na rezultate štetja pri posameznih redčenjih smo izračunali končno število TK, ki smo ga interpretirali v CFU/g. Meja detekcije metode pri preiskavi vzorcev kože je 10 cfu/g.

### 3.3.2. Identifikacija s PCR

Kolonije termofilnih kampilobaktrov smo identificirali v enem koraku z uporabo testa multipleks PCR, ki so ga prvi opisali Wang et al. (2002). Test temelji na ugotavljanju gena *hipO* (za hipurikazo) pri vrsti *C. jejuni* ter gena *glyA* (za serin hidrosimetiltransferazo) pri vrstah *C. coli*, *C. lari* in *C. upsaliensis*. Reakcijsko mešanico za en vzorec v skupni količini 25 µl smo pripravili iz naslednjih sestavin: 12,5 µl encimske mešanice Multiplex PCR kit (Qiagen), 2,5 µl raztopine Q, 7,95 µl sterilne destilirane vode, 1 µl izolirane DNA vzorca, po 0,0625 µl začetnih oligonukleotidov za identifikacijo vrst *C. jejuni* in *C. lari*, po 0,025 µl začetnih oligonukleotidov za ugotavljanje gena 23S rRNA rodu *Campylobacter*, po 0,125 µl začetnih oligonukleotidov za identifikacijo vrste *C. coli* in po 0,25 µl začetnih oligonukleotidov za identifikacijo vrste *C. upsaliensis*. Pomnoževanje DNA je potekalo v termopomnoževalniku po naslednjem programu: začetna denaturacija 15 minut pri 95°C, 30 ciklov s koraki denaturacija 30 sekund pri 95°C, prileganje začetnih oligonukleotidov 30 sekund pri 59°C in podaljševanje 30 sekund pri 72°C ter končno podaljševanje 7 minut pri 72°C. Encimsko reakcijo smo zaustavili z ohladitvijo mešanice na 4°C. Velikost pomnoženih odsekov DNA smo ugotovili z elektroforezo. Pričakovane velikosti pomnoženih odsekov so: za rod *Campylobacter* 650 bp, za vrsto *C. jejuni* 323 bp, za vrsto *C. lari* 251 bp, za vrsto *C. upsaliensis* 204 bp in za vrsto *C. coli* 126 bp.

### 3.3.3. Genotipizacija z metodo PFGE

Za izolacijo DNA smo čisto bakterijsko kulturo dan pred izvajanjem nasadili na krvni agar in gojišča inkubirali čez noč. V pufer PBS smo suspendirali toliko kulture s trdnega gojišča, da je bila optična gostota suspenzije (OD 610) med 0,570 in 0,820. V 400 µl suspenzije smo dodali 20 µl proteinaze K (20 mg/ml), premešali, dodali še 400 µl 1% raztopine agaroze ter nežno premešali. Z mešanico smo napolnili posebne modelčke in počakali, da so se agarozne ploščice strdile. Nato smo jih inkubirali v mešanici 5 ml pufru za lizo celic in 25 µl proteinaze K (20 mg/ml), in sicer 30 minut pri 54°C v vodni kopeli s stresanjem. Po inkubaciji smo tekočino odlili, nato pa dolili 15 ml ogrete sterilne destilirane vode (SDV) in vzorce zopet inkubirali, tokrat 15 min pri 54°C v vodni kopeli s stresanjem. Ta korak smo ponovili še dvakrat, agarozne ploščice pa po končani izolaciji DNA do nadaljnje obdelave shranili v pufru TE v hladilniku. Za cepitev z restrikcijsko endonukleazo *SmaI* smo najprej pripravili razredčitev ustreznega restrikcijskega pufru s SDV v razmerju 1:10 ter po 100 µl mešanice prenesli v epruvetke, v katere smo dodali približno 2 mm široke koščke agaroznih ploščic. Vzorce smo inkubirali 10 minut pri 25°C, vmes pa pripravili cepitveno mešanico (SDV, pufer in encim). Po končani inkubaciji smo odstranili ves pufer in dodali po 100 µl cepitvene mešanice ter vzorce inkubirali 4 ure pri 25°C.



Elektroforeza je potekala v 1% agaroznem gelu. Koščke agaroznih ploščic smo iz cepitvene mešanice prenesli na glavniček za elektroforezo, jih osušili in zalili z ogreto 1% raztopino agaroze. Glavniček smo vstavili v ustrezen model in ga napolnili z 1% raztopino agaroze, da je nastal gel. Ko se je ta strdil, smo previdno odstranili glavniček, jamice, ki so pri tem nastale, pa zalili z 1% raztopino agaroze. Gel smo prenesli v napravo za pulzno elektroforezo (CHEF-DR II, BioRad) ter nastavili parametre: temperatura 14°C, napetost 6 V/s, začetni pulzni čas 6,7 sekunde, končni pulzni čas 35,4 sekunde, trajanje 18 ur. Po končani elektroforezi smo gel 30 minut barvali v raztopini etidijevega bromida (10 mg/ml), ga nato spirali v 500 ml vode 90 minut, nato pa rezultate zabeležili v temni komori z UV presvetljevalnikom, povezanim s kamero. Rezultate v digitalni obliki smo prenesli v računalniški program BioNumerics (Applied Maths), ki omogoča primerjavo genetskih profilov posameznih izolatov, računanje stopnje podobnosti med njimi in izdelavo dendrogramov. Za normalizacijo slik smo kot referenčni material uporabili z *Xba*I cepljeno DNA seva *Salmonella* Braenderup H9812.

#### 3.3.4. Genotipizacija z metodo MLST

V genotipizacijsko analizo sekvenc multilokusnih zaporedij izbranih sevov *Campylobacter*, pridobljenih iz različnih stopenj prireje brojlerjev in proizvodnje piščančjega mesa, smo vključili analizo nukleotidnega zaporedja lokusov hišnih genov *aspA*, *glnA*, *glzA*, *glyA*, *pgmA*, *tkat*, *uncA* in *flaA*, katerih fragmente v dolžini od 417 do 1120 bp smo pridobili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki – podrobnejši podatki so dostopni v podatkovni bazi na spletni strani <http://mlst.zoo.ox.ac.uk>. Na osnovi pridobljenih sekvenc, ki smo jih obdelali s programom BioNumerics, smo posamezne lokuse razvrstili po alelnih skupinah, nato pa s kombinacijo teh določili posamezne sekvenčne tipe (ST) analiziranih sevov. Nadalje smo te uvrstili v klonske komplekse, na osnovi katerih smo lahko kompleksno ovrednotili raznolikost sevov v posameznih vzorcih in sledili populacijsko dinamiko bakterij vzdolž proizvodne verige. To je omogočilo ovrednotenje vpliva oz. pomena posamezne faze s stališča kontaminacije s TK in s tem k oceni tveganja oz. zmanjšanju tega na posameznih stopnjah proizvodnega procesa.

#### 3.3.5. Testiranje občutljivosti za protimikrobna zdravila

Uporabili smo mikrodilucijsko metodo na komercialno pripravljene mikrotitrskih ploščicah Sensititre. Preverili smo odpornost proti gentamicinu, ciprofloksacinu, tetraciklinu, eritromicinu, nalidiksični kislini, kloramfenikolu in streptomycinu.

#### 3.3.6. Ovrednotenje človeškega dejavnika tveganja vzdolž živilsko prehranske oskrbovalne verige do potrošnika

Z metodo anketiranja in ogleda smo ovrednotili razumevanje navzkrižne kontaminacije in kontaminacije z bakterijami kampilobakter vzdolž živilsko-prehranske oskrbovalne verige pri vseh ključnih stopnjah, ki so bile spoznane za potencialno nevarne za kontaminacijo s kampilobaktri. Ustrezne vprašalnike primerne ravni zahtevnosti dela in izobrazbeni strukturi smo oblikovali, aplicirali in nato zbrali podatke pri različnih delavcih, vključenih v verigo proizvodnje perutninskega mesa. Ena od ambicij tega projektne delo je bila preveriti realno znanje in veščine, ki so potrebne, da bi potencialne kontaminacije minimizirali z znanjem in večino dela zaposlenih v verigi.

### 3.3.7. Ovrednotenje človeškega dejavnika tveganja pri končni pripravi perutninskega mesa za uživanje

Z metodo anketiranja smo najprej pripravili ustrezne vprašalnike in nato zbrali podatke pri različnih skupinah potrošnikov svežega perutninskega mesa. Pri tem smo zajeli tako obrate družbene prehrane kot različne tipe gospodinjstev. Ena od ambicij tega projektnega dela je bila preveriti znano hipotezo iz literature, da k neobičajni rizični skupini za okužbo s kampilobakri (to so mladi moški med 15. in 25. letom) prispeva nepoznavanje higienskih pravil varne priprave hrane.

## 4. Rezultati in razprava

### 4.1. Matične jate

Skupno je bilo pregledanih 25 skupinskih vzorcev fecesa kokoši in petelinov iz šestih objektov z različnimi tehnologijami reje ter reprezentativen vzorec sveže izvaljenih jajc iz omenjenih objektov. Po pričakovanjih (gre za starejše, odrasle živali, na vrhuncu proizvodnega ciklusa) smo *C. jejuni* izolirali iz vseh vzorcev fecesa (100 %), medtem ko so bila vsa jajca negativna, tako ob uporabi direktne kot tudi obogatitvene metode izolacije. Ne glede na to, da prihajajo jajca od *C. jejuni*-pozitivnih kokoši, sta njihova vsebina in površina *C. jejuni*-negativni, najverjetneje zaradi odsotnosti vlage ter zaradi baktericidne aktivnosti oz. obrambnih mehanizmov jajca. Jajca oz. zamrtke iz omenjenih objektov smo vzorčili tudi ob zaključku valilnega obdobja; tudi pri teh vzorcih so bile vse preiskave negativne. Ker so bili tudi piščanci izvaljeni iz teh jajc prvi, tretji in šesti dan negativni, sklepamo, da do vertikalnega prenosa kampilobaktrov na potomstvo ne prihaja. Torej se piščanci v brojlerskih rejah okužujejo iz drugih virov, kar se sklada s trditvami nekaterih raziskovalcev.

### 4.2. Brojlerji

Rezultate vzorčenja na farmah brojlerjev prikazujemo v Tabeli 1.

Tabela 1: Rezultati vzorčenja brojlerskih farm, vzorci fecesa, prisotnost *C. jejuni*, ugotovljeni pulzotipi

Farma	pred vhlevitvijo*	1. dan	3. dan	6. dan	11. dan	17. dan	25. dan	32./35.# dan	klavnica
Farma A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. jejuni</i> , tip A1	<i>C. jejuni</i> , tip A1
Farma B	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. jejuni</i> , tip A1, B1	<i>C. jejuni</i> , tip A1
Farma C	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. jejuni</i> , tip B1
Farma D#	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Farma E#	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. jejuni</i> , tip A2	<i>C. jejuni</i> , tip A2
Farma F#	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. jejuni</i> ,** tip B1	<i>C. jejuni</i> , tip B1

\* = vzorčeni nastilj, voda, krma, iztrebki, miši, žuželke; kasneje po vselitvi feces, nastilj, krma, voda

# = jesensko vzorčenje

\*\* = pozitivna je bila samo voda v napajalnikih

V pomladanskem ciklusu je na dveh farmah prišlo do vnosa *C. jejuni* med 25. in 32. dnem reje, na eni farmi pa med 32. in 39. dnem reje; v vseh treh primerih se je v enem samem tednu *C. jejuni* razširil na praktično vse živali v reji in v reji perzistiriral vse do zakola. Profili PFGE so bili vezani na posamezne farme. V jesenskem ciklusu je ostala ena farma (farma D) ves čas reje negativna, ena farma (farma E) je postala pozitivna ob zadnjem vzorčenju in starosti piščancev

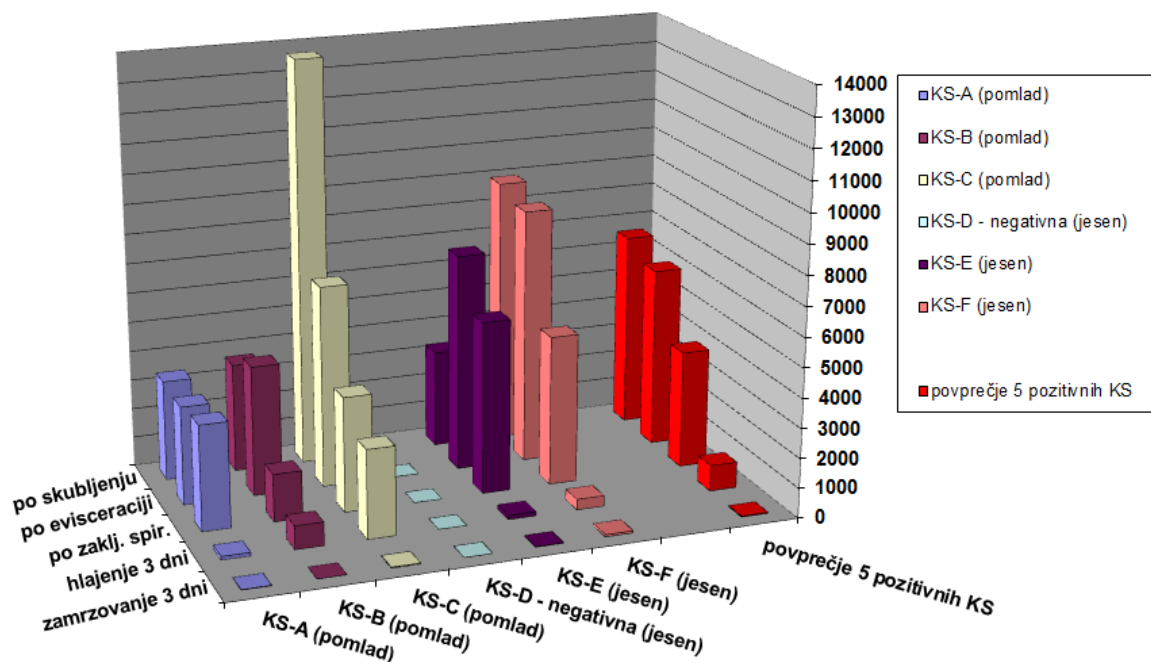
35 dni (kampilobaktri so bili ugotovljeni v vseh odvzetih vzorcih fecesa ter v vodi in nastilju), medtem ko smo pri farmi F našli kampilobaktrre samo v vodi iz napajalnikov, prav tako ob zadnjem vzorčenju. Rezultati drugega sklopa vzorčenj na farmah torej kažejo, da tudi jeseni prihaja do vnosa *C. jejuni* na farme šele proti koncu reje, med 25. in 35. dnevom. Podatek, da smo pri farmi F izolirali *C. jejuni* samo iz napajalne vode v 5. tednu reje, ob dejstvu, da so bili 7 dni pozneje, ob vzorčenju na klavni liniji, pri živalih iz iste reje vsi vzorci fecesa pozitivni, pa navaja k hipotezi, da je širjenje okužbe v reji povezano prav s kontaminirano vodo. Tudi tokrat so bile v enem samem tednu po vnosu s *C. jejuni* kolonizirane vse pregledane živali. Vse izolirane seve smo determinirali kot *C. jejuni*) in jih ustrezno shranili za potrebe poznejših analiz (PFGE, MLST). Primarnega vzroka vnosa oz. začetka širjenja kolonizacije kampilobaktrov na farmi nismo uspeli ugotoviti. Glede na dejstvo, da je pri vseh petih pozitivnih rejah prišlo do začetka in širjenja kolonizacije v zadnjih 7-10 dneh oz. zadnji četrtini vzreje, ter da v tem obdobju ni bilo bistvenih epizootioloških dogodkov/sprememb na farmah (obnašanje osebja, selitve, sprememba tehnologije reje itd), je možno tudi, da so bili kampilobaktri v minimalnih količinah prisotni na farmi že daljši čas pred masovno namnožitvijo v črevesju brojlerjev, do katere pa je morda prišlo zaradi fizioloških sprememb v prebavilih brojlerjev ali pa zaradi morebitnih sprememb v prehrani oz. spremenjenem režimu dodajanja prehranskih dodatkov brojlerjem 10 dni pred zakolom. Za razjasnitev tega pomembnega podatka bi potrebovali nadaljne usmerjene raziskave.

#### 4.3. Klavnica

Pred začetkom klanja so bili tako v spomladanskem in kot jesenskem terminu vsi vzorci (voda za omamljanje, voda za parjenje, stroj za odpiranje kloak, stroj za evisceracijo ter nekatere točke v razsekovalnici) negativni na TK. V jesenskem terminu smo pred zakolom vzorčili tudi zrak za analizo prisotnosti TK v aerosolu, in sicer na delu klavne linije, kjer poteka skubljenje, in na delu, kjer poteka evisceracija; tudi ti vzorci so bili negativni.

Med procesom klanja smo pri vsaki klavni seriji, vzorčili kožo vratnega dela trupa desetih piščancev, vsakega na štirih izbranih potencialno kritičnih točkah klavne linije: po skubljenju, po evisceraciji, po spiranju pred hlajenjem ter po trodnevem hlajenju in zamrzovanju. Pri teh vzorcih smo ugotavljali prisotnost in stopnjo (CFU) kontaminacije trupa s TK na posameznih mestih klavne linije. Povprečne ugotovljene stopnje kontaminacije s TK (CFU/g) za posamezne klavne serije so prikazane v Grafu 1.

**Dinamika kontaminacije piščančjih trupov s *C. jejuni* med postopkom klanja (CFU/g, povprečje 10 trupov na klavno serijo (KS))**



V jesenskem terminu je bila na kampilobaktri negativna farma (D) zaklana kot prva na dnevnem razporedu; rezultati so pokazali, da je negativna farma ostala negativna tudi na klavni liniji – na trupih zaklanih piščancev iz te reje nismo mogli dokazati prisotnosti TK. Pri ostalih vzorcih je bil *C. jejuni* ugotovljen in kvantificiran na vseh 50 trupih s pozitivnih farm, raven kontaminacije pa se je gibala med  $1,6 \times 10^3$  in  $1,5 \times 10^4$  CFU/g. Rezultati kažejo, da očitno prihaja do znatnega onesnaženja s kampilobaktri že pred postopkom evisceracije, najverjetneje med procesom skubljenja, druga kritična točka pa je sama evisceracija. Pri dveh od petih klavnih serij (KS) s pozitivnimi trupi je bila namreč največja povprečna stopnja kontaminacije ugotovljena neposredno po skubljenju (KS-C in KS-F;  $1,4 \times 10^4$  in  $8,9 \times 10^3$ ), pri dveh pa po evisceraciji (KS B in KS-E;  $4,4 \times 10^3$  in  $7,3 \times 10^3$ ). V splošnem se je raven kontaminacije nižala z bližanjem koncu klavne linije oz. hladilnemu tunelu, najverjetneje zaradi izdatnega spiranja trupov z vodo po evisceraciji. Najnižja stopnja onesnaženja v prostoru za evisceracijo je bila tako ugotovljena po končnem spiranju trupov oz. pred začetkom hlajenja (povprečje  $3,9 \times 10^3$  in 35% zmanjšano onesnaženje glede na predhodno mesto vzorčenja). Zelo pa se je stopnja kontaminacije zmanjšala po 3-dnevnem hlajenju (povprečno ugotovljeno od  $8,7 \times 10^2$  CFU/g; 78% zmanjšanje glede na povprečje po končnem spiranju z  $3,9 \times 10^3$  CFU/g), še bolj pa po zamrzovanju (ugotovljeno od 4 do 76 CFU/g, povprečno 28 CFU/g, zmanjšanje za 96,8 glede na povprečje pri hlajenju). Do zanimivega in pomembnega zaključka pa pridemo, če primerjamo onesnaženost zaporednih klavnih serij na posameznih točkah klavne linije oz. mestih vzorčenja: opazimo lahko namreč izrazito naraščanje stopnje onesnaženja trupov glede

na predhodno klavno serijo na vzorčevalnih mestih po skubljenju ter po evisceraciji, posledično pa tudi po tridnevnem hlajenju. Z drugimi besedami – tako v pomladanskem kot v jesenskem terminu je bila kontaminacija trupov na teh točkah iz serije v serijo večja, kar kaže na neko akumulacijo kontaminirajočih kampilobaktrov nekje na klavni liniji že pred prvim mestom vzorčenja.

Ob evisceraciji smo odvzeli in analizirali tudi pripadajoča slepa črevesa: pozitivnih je bilo 49 od 60 vzorcev – praktično vsi vzorci, razen tistih iz že omenjene negativne reje.

Iste točke klavniškega okolja kot pred začetkom klanja smo tako spomladi kot jeseni vzorčili tudi po koncu klanja. Pri vseh vzorcih, z izjemo vode za parjenje, smo potrdili prisotnost TK oz. *C. jejuni*. Kampilobaktrre smo izolirali tudi iz aerosola, in sicer je bil pozitiven vzorec zraka v evisceracijskem delu klavne linije ob klanju zadnje analizirane klavne serije.

Skupno je bilo izoliranih in za nadaljnje analize shranjenih 265 sevov izoliranih iz vzorcev odvzetih v klavnici.

#### 4.5. Promet

Prisotnost kampilobaktrov je bila ugotovljena v dobrih 56% oz. 63 od 111 preiskanih vzorcev. Po pričakovanju oziroma v skladu z rezultati raziskav v klavnici je bil večji del vzorcev okužen z nizkim številom kampilobaktrov. V dobrih 30 % vseh vzorcev oz. 34 vzorcih je bilo ugotovljeno  $<1,0 \times 10$  CFU/g živila, v približno 16 % oz. 18 vzorcih, je bilo ugotovljeno  $\leq 1,0 \times 100$  CFU/g živila, le v 11 vzorcih oz. v približno 10 % pa je bilo ugotovljeno nad  $1,0 \times 100$  CFU/g živila. Identificiranih je bilo 51 izolatov vrste *C. jejuni*, od tega je bila pri enem vzorcu ugotovljena tudi prisotnost vrste *C. coli*, pri dveh vzorcih pa je izolat med shranjevanjem odmrl.

#### 4.6. Genotipizacija

##### 4.6.1. PFGE

Z metodo pulzne elektroforeze (PFGE) je bilo tipiziranih skupno 446 izolatov *C. jejuni*, in sicer 196 iz t.i. spomladanskega sklopa (85 farmskih izolatov *C. jejuni* iz treh rej in 111 klavniških izolatov), 204 iz t.i. jesenskega sklopa (47 farmskih izolatov iz dveh rej in 157 klavniških izolatov) ter 46 izolatov iz piščancev v prometu. Rezultati genotipizacije kažejo na relativno majhno genetsko heterogenost izolatov *C. jejuni* v okviru te raziskave. Med 400 izolati iz farm in klavnice smo lahko namreč potrdili zgolj pet različnih pulzotipov *C. jejuni*, ki smo jih označili z oznakami A1, A2, B1, B2 in C1. Na treh farmah in pri treh klavnih serijah spomladanskega sklopa smo potrdili dva različna pulzotipa *C. jejuni* (A1 in B1), pri čemer sta farmi na isti lokaciji delili isti pulzotip. Tudi v jesenskem sklopu smo lahko na eni pozitivni farmi in pri dveh pozitivnih klavnih serijah potrdili le dva pulzotipa *C. jejuni* (A2 in ponovno B1). Preostala dva pulzotipa (B2 in C1) smo ugotovili samo pri izolatih iz vzorcev klavniškega okolja ob spomladanskem vzorčenju (voda za omamljanje, stroj za odpiranje kloak, nekateri vzorci iz razsekovalnice), pri katerih pa vzorčenja ni bilo mogoče izvajati takoj po »naših«  
treh klavnih serijah, temveč šele ob rutinski zaustavitvi klavne linije, tako da so lahko v teh vzorcih bili prisotni tudi *C. jejuni* iz nenadzorovanih rej, torej drugačni pulzotipi. Na posamezni farmi smo tako v fecesu kot tudi v vodi in nastilju praviloma ugotavljali le en sam, za tisto farmo značilni pulzotip, ki smo ga lahko potrdili tudi kasneje, v slepih črevesih teh živali na klavni liniji. Izjema je bila ena sama farma iz spomladanskega sklopa, na kateri smo ves čas potrjevali pulzotip A1, in sicer v fecesih vzorčenih 32. in 39. dan reje, ki je bil kasneje potrjen tudi pri

vseh vzorcih slepega črevesa na dan klanja; pri vzorcih 39. dne smo namreč poleg pulzotipa A1 ugotavljali tudi pulzotip B1, ki pa na dan klanja v slepih črevesih ni več bil prisoten.

Genetsko raznolikost izolatov *C. jejuni*, pridobljenih v klavnici prikazuje Tabela 2.

Tabela 2: rezultati PFGE genotipizacije izolatov *C. jejuni*, pridobljenih v klavnici

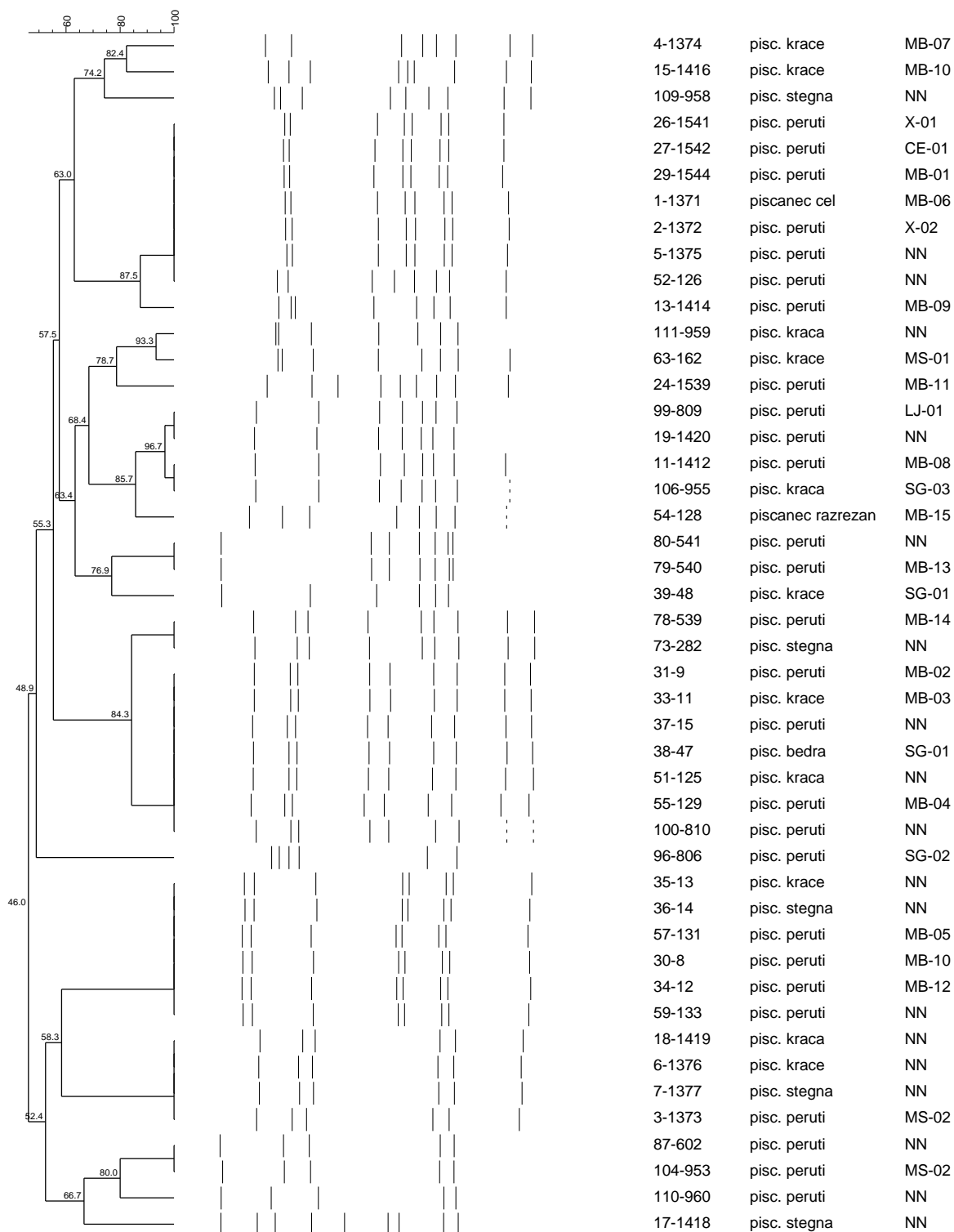
Klavna serija	Pulzotip <i>C. jejuni</i>		
	Slepa črevesa (n=10)	Koža trupov (n=40)	Klavniško okolje (n=20)
KS-A (pomlad)	A1 (100%)	A1 (100%)	B1 (75%), A1 (10%), B2 (10%) <sup>b</sup> , C1 (5%) <sup>b</sup>
KS-B (pomlad)	A1 (100%)	A1 (100%)	
KS-C (pomlad)	B1 (100%)	B1 (100%)	
KS-E (jesen)	A2 (100%)	A2 (100%)	B1 (100%)
KS-F (jesen)	B1 (100%)	B1 (87.5%), A2 (12.5%) <sup>a</sup>	

Genetska heterogenost izolatov CJ je bila nizka: v petih pozitivnih jatah/serijah smo lahko potrdili le tri različne dominantne PFGE profile, ki so bili tipični za posamezno jato/farmo/klavno serijo. Rezultati PFGE tipizacije izolatov iz klavniškega okolja kažejo, da je navzkrižna kontaminacija možna (različni pulzotipi prisotni npr. v stroju za evisceracijo / odstranjevalcu črevesja). Ne glede na to pa navzkrižne kontaminacije nismo mogli potrditi pri trupih: analiza izolatov iz kože namreč kaže, da se koža trupov kontaminira praktično izključno s kampilobaktri iz lastnega črevesja (pulzotip kožnih izolatov posamezne serije je bil skoraj vedno enak pulzotipu izolatov iz črevesja tiste serije).

Med izolati piščancev v prometu je bilo ugotovljenih 9 skupkov z enakim profilom PFGE, ki so vključevali od 2 do 7 izolatov (5 po dva izolata, eden po štiri, dva po šest in eden po sedem). Profili PFGE ostalih izolatov so se medsebojno razlikovali. Pestrost pulzotipov je bila na splošno večja kot pri izolatih iz farm, kar pa ni presenetljivo, saj smo predhodno ugotovili, da so pulzotipi izolatov kampilobaktrov večinoma vezani na farmo, vzorčeni pa so bili piščanci več kot 54 različnih rejcev. Za ugotavljanje morebitnih vplivov lastnosti sevov na preživetje v prehrambeni verigi bi morali preiskati precej večje število vzorcev, česar nam omenjena finančna sredstva niso omogočala. Dendrogram izolatov prikazujemo v Sliki 1.

Smal

Smal



Slika 1: Dendrogram izolatov iz piščančjega mesa iz prometa

Legenda: NN – rejec ni znan, rinfuza v trgovini; X – rejec znan, ne pa tudi kraj reje

#### 4.6.2. MLST

Iz rezultatov analiz MLST lahko povzamemo, da je bilo med 28 uspešno identificiranimi sekvenčnimi tipi ugotovljenih 11 različnih, najpogostejše ST-21, ST-353, ST-354 (po 5×), sledili pa so ST-45 (4×), ST-52 (3×), po enkrat pa ST-22, ST-658, ST-257, ST-206, ST-574 in ST-283. Sedem analiziranih sekvenc ni bilo možno identificirati v bazi podatkov zaradi morebitno nepopolne sekvence ali pa se je le-ta razlikovala od vseh sekvenčnih podatkov, shranjenih v bazi.

Rezultati genotipizacije izolatov *C. jejuni*, tako iz klavniških vzorcev iz kot svežega piščančjega mesa v prodajni mreži, s sekvenciranjem MLST hišnih genov in regije QRDR v genu *gyrA*, odgovornem za odpornost proti antibiotiku ciprofloksacinu, kažejo na klonsko širjenje odpornosti proti temu antibiotiku. Pri tem smo sodelovali s projektnimi partnerji EU OP7 projekta Promise, kar je bilo potrebno predvsem zaradi finančne podpore, saj materialnih sredstev v okviru projekta CRP V-1110 ni bilo dovolj za izvedbo laboratorijskih analiz. Rezultati opravljenih preiskav omogočajo primerjalno analizo uporabnosti tipizacijskih metod, ki se zelo razlikujejo po potrebnem času, delu in materialnih stroških, prav tako pa je možno ugotavljati raznolikost/sorodnost izolatov tako iz prodajne mreže, klavne linije in humanih kliničnih izolatov. Ti so bili zajeti v širšo raziskavo, izvedeno v okviru evropskega projekta, ki je še v teku. Primerjalne analize bodo opravljene po zaključku vsega eksperimentalnega dela. Prav tako bomo lahko na osnovi analizirane sledljivosti sevov vzdolž proizvodno-oskrbovalne verige sklepali na tveganje prenosa in s tem ogrožanje zdravja potrošnikov, kar je bil v končni fazi namen obeh, mednarodnega in domačega raziskovalnega projekta.

#### 4.7. Testiranje na občutljivost za protimikrobna zdravila

Štiriintrideset izolatov *C. jejuni* iz piščančjega mesa iz prometa smo testirali na občutljivost za protimikrobna zdravila. Vsi izolati so bili občutljivi za gentamicin in kloramfenikol, po en izolat je bil odporen proti eritromicinu in streptomycinu, dva izolata sta bila odporna na tetraciklin, 21 na nalidiksično kislino in kar 26 izolatov (76,5 %) na ciprofloksacin. Rezultati testov odpornosti proti protimikrobnim zdravilom, še posebej odpornosti proti ciprofloksacinu, kažejo, da so primerljivi s podatki EFSA za Slovenijo, ko je skupno poročilo EFSA te podatke še vključevalo (zadnja poročila jih namreč ne). Tako se uvrščamo med države EU z najpogostejšo odpornostjo bakterijskih izolatov iz piščančjega mesa, odpornih proti temu zdravilu, ki se uporablja v klinični praksi za zdravljenje težjih črevesnih okužb.

#### 4.8. Ankete

Skupno je bilo zbranih in obdelanih 409 anket za oceno tveganja, ki ga predstavlja splošna slaba informiranost oz. poznavanje ljudi o mikrobioloških tveganjih, povezanih s pripravo piščančjega mesa. Rezultati kažejo na pomanjkljivo zavedanje potrošnikov in pomanjkljivo znanje o varni pripravi in shranjevanju perutninskega mesa, še posebej pri moških, ženske izkazujejo večjo previdnost pri pripravi mesa. Ugotovili smo tudi nekatere pomanjkljivosti pri delu zaposlenih v perutninski proizvodni verigi. Poznavanje bakterij *Campylobacter* in njihovih lastnosti je slabo in sicer slabše pri potrošnikih kot pri delavcih. Za zmanjševanje kontaminacije perutninskega mesa je ključno zagotavljanje visoke stopnje usposobljenosti delavcev in informiranje potrošnikov o varnem rokovanju s perutninskim mesom. Rezultate smo predstavili na domači strokovni konferenci. Na splošno smo prišli do zaključka, da potrebujemo boljši sistem osnovnega in vseživljenjskega izobraževanja na področju zagotavljanja varne hrane, s poudarkom na odgovornosti potrošnika kot enega od pomembnih dejavnikov tveganja za prenos okužb.



## 5. Zaključki

Ugotovili smo, da so matične jate kokoši okužene s kampilobaktri, vendar do vertikalnega prenosa okužb na jate brojlerjev ne prihaja.

Brojlerji se praviloma kolonizirajo s kampilobaktri v zadnjih desetih dneh pred zakolom. Ko se kampilobakter pojavi v reji se zelo hitro, v enem tednu, razširi na vse piščance. Razloga za tako pozno kolonizacijo nismo uspeli ugotoviti, za razjasnitev bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

Negativni rezultati analiz klavniškega okolja pred klanjem pričajo o tem, da sta čiščenje in dezinfekcija po zaključku klanja učinkovita, v klavniškem okolju ne zaostajajo kampilobaktri iz klavnih serij, zaklanih v preteklih dneh. Trupi brojlerjev iz jat, potrjeno negativnih na *Campylobacter*, bodo torej ostali negativni, če bodo takšne jate prve na dnevnem razporedu klanja.

Do znatnega onesnaženja trupov s kampilobaktri prihaja že pred evisceracijsko fazo klanja (omamljanje, parjenje, skubljenje), druga kritična točka pa je sama evisceracija.

Naraščanje stopnje onesnaženja, ki smo ga na posameznih mestih vzorčenja zaznali pri zaporednih klavnih serijah, zahteva nadaljnje raziskave.

Zmanjševanje števila CJ (CFU/g) na koži trupov, ki smo ga ugotovili vzdolž klavne linije pri vsaki nadaljnji fazi obdelave trupov, dokazuje, da končno spiranje, 3-dnevno hlajenje ter/ali 3-dnevno zamrzovanje pomembno znižujejo stopnjo kontaminacije s kampilobaktri in s tem tudi tveganje za okužbo.

Pozitivni rezultati analiz klavniškega okolja po klanju in hkratna prisotnost različnih pulzotipov v istem vzorcu nakazuje, da se lahko različni sevi kampilobaktrov iz različnih klavnih serij nabirajo / zastajajo na določenih mestih (npr. voda za omamljanje, odpiralec kloak, odstranjevalec črevesja). Kljub temu, da je navzkrižna kontaminacija torej možna, pa so rezultati pokazali, da se trupi brojlerjev na klavni liniji onesnažujejo v največji meri s kampilobaktri iz lastnega črevesja: na koži in v slepih črevesih smo namreč praviloma vedno ugotavljali enak genetski tip *C. jejuni*.

Kljub visoki prevalenci kontaminiranih trupov piščancev v klavnici, je ugotovljeno število kampilobaktrov na posameznih trupih ob zaključku obdelave relativno nizko. Naši rezultati so identificirali nekatere za kontaminacijo s *C. jejuni* kritične faze/točke klavnega procesa. Z nekaj dodatnimi ukrepi na teh mestih klavne linije, katerih učinkovitost bi preverili v nadaljnjih raziskavah bi lahko število kampilobaktrov na trupih še dodatno zmanjšali, kar bi lahko v skladu s trendi v EU in uvedbo higienskih kriterijev v bodoče prineslo prednost v proizvodnji in trgovini s perutninskim mesom.

Kampilobaktri izolirani iz perutnine imajo visoko stopnjo odpornosti proti protimikrobnim zdravilom, še posebej proti ciprofloksacinu. Potreben je poostren nadzor nad uporabo antibiotikov v perutninski proizvodnji, oziroma iskati rešitve za zmanjšanje njihove uporabe.

Poznavanje bakterij *Campylobacter* in njihovih lastnosti je slabo, in sicer še slabše pri potrošnikih kot pri delavcih v perutninski proizvodnji. Potrebujemo boljši sistem osnovnega in

vseživljenjskega izobraževanja na področju zagotavljanja varne hrane, s poudarkom na odgovornosti potrošnika kot enega od pomembnih dejavnikov tveganja za prenos okužb.

## 6. Literatura

Adak, G.K., Cowden, J.M., Nicholas, S., and Evans, H.S. The public health laboratory service national case-control study of primary indigenous sporadic cases of *Campylobacter* infection. *Epidemiol. Infect.*, 1995; 115, 15-22.

Anonymous (1999). Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedstuffs, food and man in the European Union in 1997. Part 1. Document No. VI/8495/98 – Rev. 2 of the European Commission, Community Reference Laboratory on the Epidemiology of Zoonoses, BgVV, Berlin, Germany.

Anonymous. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008; Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal* 2010; 8(03): 1503

Anonymous. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011; 9(3): 2090

Arvanitidou, M., Stathopoulos, G.A., Constantinidis, T.C., and Katsouyannopoulos, V. The occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. in river and lake waters. *Microb. Res.*, 1995; 150, 153-158.

Barrow, G. H., R. K. A Feltham. *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*. Third edition. Cambridge University Press, Cambridge. 1993, pp. 331.

Berndtson, E. (1996) *Campylobacter* in broiler chickens. The mode of spread in chicken flocks with special reference to food hygiene. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Food Hygiene. SLU Repro, Uppsala.

Besser, T.E., Le Jeune, J.T., Rice, D.H., Berg, J., Stilborn, R.P., Kaya, K., Bae, W., Hancock, D.D. Increasing Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Feedlot Cattle through the Feeding Period. *Appl Environ Microbiol.*, 2005 October; 71(10): 5752–5758.

Beumer, R.R., de Vries, J., and Rombouts, F.M. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int. J. Food Microbiol.*, 1992; 15, 153-163.

Blaser, M.J., Hardesty, H.L., Powers, B., Wang, W.L. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *J Clin Microbiol.*, 1980 Apr; 11(4):309-13.

Boes, J., Nersting, L., Nielsen, E.M., Kranker, S., Enøe, C., Wachmann, H.C., Baggesen, D.L. Prevalence and diversity of *Campylobacter jejuni* in pig herds on farms with and without cattle or poultry. *J Food Prot.*, 2005 Apr; 68(4):722-7.

Bolton, F.J., Coates, D., and Hutchinson, D.N., and Godfree, A.F. A study of thermophilic *campylobacters* in a river system. *J. Appl. Bacteriol.*, 1987; 62, 167-176.

Brennhovd, O., Kapperud, G., and Langeland, G. Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. *Int. J. Food. Microbiol.*, 1992; 15, 327-338.

Cabrera, J., Rodrigues, J., Braganca, F., Morgado, C., Pires, I., and Goncalves, A.P. Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from northeast Portugal. *J. Appl. Bacteriol.*, 1992; 73, 279-285.

Čadež, N., Štorman, A. 2004. Metodologija mikrobiološke analitike s poudarkom na novejših mikrobioloških metodah = Methodology of microbiological analyses with emphasis on novel microbiological methods. V: GAŠPERLIN, Lea (ur.), ŽLENDER, Božidar (ur.). 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004 = 22nd Food Technology

Days 2004 dedicated to prof. F. Bitenc, 18. in 19. marec 2004, Radenci. *Varnost živil*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, str. 81-92.

EFSA. 2006. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union 2004. Parma, EFSA European Food Safety Authority. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/310anr.pdf>

EFSA. 2010e. National Zoonoses Countries reports in the European Union in 2008. Parma, EFSA - European Food Safety Authority. <http://www.efsa.europa.eu/en/reportingonzoonoses/zoonosescomsumrep.htm>

Evans, S.J., and Sayers, A.R. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.*, 2000; 46, 209–223.

Fluckey, W.M., Sanchez, M.X., McKee, S.R., Smith, D., Pendleton, E., and Brashears, M.M. Establishment of a microbiological profile for an air-chilling poultry operation in the United States. *J. Food Prot.*, 2003; 66, 272–279

Fitzgerald, C., Stanley, K., Andrew, S., and Jones, K. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Flagellin Gene Typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001; 67, 1429–1436.

Fox, J.G. (1990) *Campylobacteriosis* in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (4): 765-8.

Genigeorgis, C., Hassunch, M., Collins, P. *Campylobacter jejuni* infection on poultry farms and its effect on poultry meat contamination during slaughtering. *J. Food Protec.*, 1986; 49: 895-903.

Gruntar, I., Ocepek, M., Avberšek, J., Mićunović, J., Pate, M. A pulsed-field gel electrophoresis study of the genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry flocks in Slovenia. *Acta Vet. Hung.* (Bp. 1983), 2010, vol. 58, no. 1, 19-28. [COBISS.SI-ID 3161978]

Hänninen, M.L., Perko-Mäkela, P., Pitkälä, A., Rautelin, H. A three-year Study of the Distribution of *Campylobacter jejuni* / *coli* in Domestically Acquired Human Infections and Chicken Meat Samples from Helsinki Area. Proceedings from the 10th International Workshop on CHRO, p.54, Baltimore, Maryland, September 12-16, 1999.

Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M. *Campylobacters* as Zoonotic Pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 2007; 117: 237-257.

IVZ. 2010. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2009. Ljubljana, IVZ [http://www.ivz.si/Mp.aspx/tukaj.pdf?ni=29&pi=5&\\_5\\_attachmentID=2491&\\_5\\_attachmentName=tukaj&\\_5\\_mimeType=application%2Fpdf&\\_5\\_action=DownloadAttachment&pl=29-5.3](http://www.ivz.si/Mp.aspx/tukaj.pdf?ni=29&pi=5&_5_attachmentID=2491&_5_attachmentName=tukaj&_5_mimeType=application%2Fpdf&_5_action=DownloadAttachment&pl=29-5.3).

Jackson, D.N., Davis, B., Tirado, S.M., Duggal, M., Van Frankenhuyzen, J.K., Deaville, D., Wijesinghe, M.A.K., Tessaro, M., Trevors, J.T. Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2009; 96:377–394

Jacobs-Reitsma WF. Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet Q* 19 (3), 1997; 113-7.

Jevšnik, M., Hlebec, V., Raspor, P. 2008a. Consumer interpretation of the term food safety. *Acta aliment.* 37, 437-448.

Jevšnik, M., Hoyer, S., Raspor, P. 2008b. Food safety knowledge and practices among pregnant and non-pregnant women in Slovenia. *Food control*. 19, 526-534.

Jevšnik, M., Hlebec, V., Raspor, P. 2008c. Consumers' awareness of food safety from shopping to eating. *Food control*. 19, 737-745.

Jevšnik, M., Hlebec, V., Raspor, P. 2008d. Food safety knowledge and practices among food handlers in Slovenia. *Food control*. 19, 1107-1118.

Kapperund, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S.M., Potter, M. Epidemiological investigation of risk factors for campylobacter colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol. Infect.*, 1993; 111, 245-55.

Klančnik, A., Botteldoorn, N., Herman, L., Smole Možina, S. Survival and stress induced expression of groEL and rpoD of *Campylobacter jejuni* from different growth phases. *Int. j. food microbiol.*, 2006; 112, 200-207. [COBISS.SI-ID 3056504]

Klančnik, A., Zorman, T., Smole Možina, S. The effect of low temperature, starvation and oxidative stress on physiology of *Campylobacter jejuni* cells. *Croat. chem. acta*, 2008; 81, 41-46. [COBISS.SI-ID 3312760]

Klančnik, A., Guzej, B., Jamnik, P., Vučković, D., Abram, M., Smole Možina, S. Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. *Res. microbiol.*, 2009; 160, 345-352, doi: 10.1016/j.resmic.2009.05.002. [COBISS.SI-ID 3635064]

Kurinčič, M., Berce, I., Zorman, T., Smole Možina, S. 2005. The prevalence of multiple antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. from retail poultry meat. *Food technol. biotechnol.*, 43, 2, 157-163.

Kurinčič, M., Lušicky, M., Uzunović-Kamberović, S., Smole Možina, S. Epidemiologija in antibiotska odpornost bakterij *Campylobacter* iz vzorcev vod in piščančjega mesa V: Raspor, P. (ur.), Petković, H.(ur.). Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Protimikrobne snovi, (Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 06). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2009, str. 205-214.

Lam K.M., DaMassa A.J., Morishita T.Y., Shivaprasad H.L., Bickford A.A. Pathogenicity of *Campylobacter jejuni* for turkeys and chickens. *Avian Dis.*, 1992; 36, 359-363.

Luber P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs - which risks need to be managed first? *Int J Food Microbiol.* 2009 Aug 31; 134(1-2):21-8. Epub 2009 Feb 23. Review.

Mead, G. C., Hudson W. R., and Hinton M. H. Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. *Epidemiol. Infect.*, 1995; 115, 495-500.

Nielsen, E.M., Engberg, J., and Madsen, M. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish patients, poultry, cattle, and swine. *FEMS Immuno. Med. Microbiol.*, 1997; 19, 47-56.

Petersen, L., Nielsen, E.M., and On , S.L. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Vet. Microbiol.* 2001; 82, 141-154.

Raspor, P., Jevšnik, M. 2008. Good nutritional practice from producer to consumer. *Crit. rev. food sci. nutr.*, 48, 276-292.

Shane S.M. *Campylobacter* infection of commercial poultry. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 19 (2), 2000; 376-95.

Skirrow M.B. Infection with *Campylobacter* and *Arcobacter* in: Hausler JW, Sussman M (ed.) Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections , 9th ed. vol. 3. Bacterial infections. 1998; 567-80.

Smole Možina, S., Uzunović-Kamberović, S. 2005. *Campylobacter* spp. as emerging food-borne pathogen - incidence, detection and resistance. A review. *Med. Glas. Ljek. Komore*, 1, 2-15.

Smole Možina, S., Kurinčič, M., Kramar, A., Zorman, T., Zelenik, K., Lušicky, M., Uzunović-Kamberović, S., Prevalence and mechanisms of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. from water and poultry meat samples. V: WIRTANEN, Gun (ur.), SALO, Satu (ur.). Risk assessment of microbial problems and preventive actions in food industry : 2nd Open seminar arranged by SAFOODNET-Food Safety and Hygiene Networking within new member states and associated candidate countries, October 22-23, 2007, Istanbul, Turkey : FP6-

022808-2006 : [ESPOO 2008], (VTT Symposium, 251). Helsinki: VTT Technical Research Centre of Finland, 2008, str. 35-37.

Smole Možina, S., Klančnik, A., Raspor, P. 2010b. Izzivi raziskav mikroorganizmov v živilih in odmevnejši dosežki v slovenskih raziskavah V: Raspor, Peter (ur.), Matos, Tadeja (ur.). *Mikrobiologija od včeraj za jutri : 50 let SMD, Ljubljana, 24. november 2010*, (Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 08). Ljubljana: Slovensko mikrobiološko društvo, str. 57-70.

Smole Možina, S., Kurinčič, M., Klančnik, A., Mavri, A. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. *Trends food sci. technol.*, 2011; 22, 91-98, [COBISS.SI-ID 3740280]

Smole Možina, S., Kovač, J., Lušicky, M. Prevalence and antibiotic resistance of thermotolerant *Campylobacter* spp. in retail chicken meat - trends in Slovenia and EU. V: Kofer, Schobesberger (eds). *Proceedings of the 15th International Congress of the International Society for Animal Hygiene, July 3 - 7, Vienna, Austria. XV ISAH Congress 2011. Animal hygiene and sustainable livestock production : innovations in hygiene, nutrition and housing for healthy food from healthy animals.* Dunaj: ISAH, 2011, 169-171. [COBISS.SI-ID 3932280]

Uhan, V. Ugotavljanje kritičnih kontrolnih točk za analizo mikrobioloških tveganj v klavnici perutnine : diplomsko delo, univerzitetni študij. *Determination of critical control points for microbiological risk analysis in the poultry slaughterhouse : graduation thesis, university studies*, (Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Diplomske naloge, 1421, ment. S. Smole Možina). Ljubljana, 2011. X, 64 f., [COBISS.SI-ID 3920760]

Van der Walt, M.L. (2004) *Campylobacter jejuni* infection. V: *Infectious diseases of livestock*. ED. Coetzer JAW in Tustin RC. Vol 3, Oxford University Press, Cape Town, 1479-83.

VTT. 2007. *HYGRAM - semiquantitative model for assessment of most important hygienic and microbiological hazards in companies.* Espoo, VTT Technical Research Centre of Finland.

Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L., Rodgers, F.G. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *Fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40, 4744-4747.

Wedderkopp, A., Gradel K. O., Jorgensen J. C., and Madsen, M. Pre-harvest surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in Danish broiler flocks: a 2-year study. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 68, 53-59.

Wooldridge, K.G. and Ketley, J.M. *Campylobacter* – host cell interactions. *Trends Microbiol.* 1997; 5, 96-102.

Zorman T., Smole Možina S. 2002. Classical and molecular identification of thermotolerant *Campylobacters* from poultry meat. *Food technol. biotechnol.*, 40, 3, 177-183.