

UDK 579.62:576.851.49:616-078:577.2(043.3)

mag. Branko Podpečan, dr. vet. med.

EPIDEMIOLOŠKA RAZISKAVA POVEZAVE MED
OKUŽBAMI Z BAKTERIJO
SALMONELLA ENTERICA SEROVAR ENTERITIDIS
PRI ŽIVALIH IN LJUDEH

Doktorska disertacija

EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF LINKS BETWEEN
INFECTION WITH
SALMONELLA ENTERICA SEROVAR ENTERITIDIS
IN ANIMALS AND HUMANS

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2014

Branko Podpečan

Epidemiološka raziskava povezave med okužbami z bakterijo *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pri živalih in ljudeh

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani

Predstojnik inštituta prof. dr. Branko Krt

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: dr. Matjaž Ocepek

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršil avtorskih pravil in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Irena Zdovc

Članica: prof. dr. Katja Seme

Članica: znan. sod. dr. Mateja Pate

IZVLEČEK

Ključne besede: Salmonela, okužbe živali – epidemiologija – mikrobiologija; salmonela okužbe – epidemiologija – mikrobiologija; *Salmonella enteritidis* – izolacija in čiščenje – genetika; genotipizacija; elektroforeza gelska, pulzirajoče-polje, ljudje; živali

Okužbe z bakterijo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) so javno - zdravstveni problem, vir teh okužb so številne domače in divje živali. V naši raziskavi smo ugotavljali stopnjo genetske raznolikosti izolatov, razširjenost posameznih genotipov bakterije pri živalih ter kakšne so povezave med okužbami živali in ljudi. Za genotipizacijo smo uporabili metodo pulzne elektroforeze (PFGE) z restrikcijskim encimom *XbaI*. Pri tipizaciji z metodo PFGE smo ugotovili 60 različnih genotipov. Najpogosteje so bili ugotovljeni genotipi A1, A2 in B1, ki so skupaj predstavljali 65,37 % (219/335) izolatov v raziskavi. Izolati *S. Enteritidis*, ki so bili uvrščeni v raziskavo, so bili genetsko zelo homogeni. Širjenje in kroženje *S. Enteritidis* v prehranski verigi je bilo izrazito klonalno in je bilo bolj izraženo pri izolatih iz ljudi kot pri izolatih iz živali. Zaradi klonalnega širjenja in manjšega števila pasov v genotipu se je izkazalo, da je za epidemiološko raziskavo smiselno in učinkovito ločiti genotipe med seboj že na podlagi razlike v enem pasu. Za štiri najpogosteje ugotovljene genotipe v zbirki izolatov v raziskavi, A1, A2, B1 in C2, ki so razširjeni pri živalih in pri človeku, je bilo ugotovljeno, da zajamejo večino izolatov iz zbirke izolatov iz človeka, kokoši nesnic, brojlerjev in prašičev. Ugotovili smo jih tudi v mesnih izdelkih (A1, A2 in C2), fižolu (A2), v hlevu za rejo kokoši (B1) in kompostu (A1). Najštevilčnejši genotipi, ugotovljeni pri živalih in pri ljudeh, A1, A2 in B1, so bili prisotni v prehranski verigi najmanj 5 let. Pri brojlerjih je močno prevladoval genotip A1. Pri prašičih pa so prevladovali genotipi skupine D in genotip B5. Pri plazilcih smo ugotovili genotipa A6 in B1, pri nojih B1, pri mestnih golobih genotipa B1 in C2. Ugotovitve v rejah kokoši nesnic kažejo tudi na prenos okužbe iz okužene jate v novo jato. Pomembna je ugotovitev, da so v rejah kokoši hkrati lahko prisotni različni kloni istega serovara salmonel. Šest genotipov *S. Enteritidis* (A1, A2, A6, A8, B1 in C2) je bilo skupnih človeku in eni ali več vrstam živali. Rezultati nakazujejo, da so kokoši nesnice pogost vir okužbe s *S. Enteritidis*. Ugotovili smo še, da so lahko vir okužbe za ljudi tudi druge živali, ki so vir živil živalskega izvora. Zanimiva je tudi ugotovitev, da so vir okužbe za ljudi s *S. Enteritidis* lahko tudi plazilci.

ABSTRACT

Key words: Salmonella infections, animal – epidemiology – microbiology; Salmonella infections – epidemiology – microbiology; *Salmonella enteritidis* – isolation and purification – genetics; genotyping; electrophoresis, gel, pulsed-field, humans, animals

Human infections with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) are a major public health issue, the source of infections are domestic and wild animals. In our epidemiological study, in order to understand molecular epidemiologic properties, we estimated the degree of genetic diversity of isolates, how the genetic types of bacteria are spread or disseminated in different animal species and which are the links between animals and human infections. To determine genetic diversities of isolates, we used Pulsed – field gel electrophoresis (PFGE) with restriction enzyme *XbaI*. With PFGE we differentiated 60 genotypes. The most commonly identified genotypes were A1, A2 and B1, which include 65.37 % (219/335) of isolates in the study. Isolates of *S. Enteritidis* which were selected from animals and humans, were genetically very homogeneous. Dissemination and circulation of *S. Enteritidis* in the food chain is highly clonal and more pronounced in humans isolates than in animal isolates. Due to the low number of bands in PFGE profile and highly clonal spread of *S. Enteritidis* in the food chain, it was reasonable to consider as a distinct PFGE pattern on basis of a single band difference. The total share of the four widespread and most common genotypes A1, A2, B1 and C2 found in the collection of isolates in the study captured the majority of isolates of *S. Enteritidis* from humans, layers hens, broilers and pigs. We also found them in meat products (A1, A2 and C2), beans (A2), in the chickens rearing barns (B1) and compost (A1). Most numerous genotypes found in animals and in humans A1, A2 and B1, were present in the food chain at least 5 years. With the broilers, the highly prevalent was the genotype A1. The majority of isolates from pigs have genotypes D and B5. In reptiles we found genotypes A6 and B1, in ostriches B1 and in city pigeons genotypes B1 and C2. Findings in laying hens flocks indicate the possible transmission of infection from an infected flock to a new flock. It is also important to note that in the infected flock different clones of the same *Salmonella* serovar can be present at the same time. Six genotypes of *S. Enteritidis* (A1, A2, A6, A8, B1 and C2) were common to humans and one or more species of animals. The results indicate that laying hens are a common source of infection for humans. The source of infection can also be other animals used for food. It is also interesting to note that the source of infection with *S. Enteritidis* for humans could be reptiles.

VSEBINA

IZVLEČEK	4
ABSTRACT	5
KAZALO TABEL	9
KAZALO SLIK	12
OKRAJŠAVE	15
1 UVOD	16
2 PREGLED LITERATURE	19
2.1 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	19
2.1.1 Razvrstitev salmonel	19
2.1.2 Lastnosti <i>S. Enteritidis</i>	20
2.1.3 <i>S. Enteritidis</i> v okolju	21
2.1.4 Odpornost <i>S. Enteritidis</i> proti vročini	22
2.1.5 Odpornost <i>S. Enteritidis</i> proti protimikrobnim zdravilom	23
2.1.6 Genom <i>S. Enteritidis</i>	24
2.2 Okužbe s <i>S. Enteritidis</i>	25
2.2.1 Zgodovina okužb s <i>S. Enteritidis</i>	25
2.2.2 Okužbe pri živalih	26
2.2.2.1 Kokoši nesnice	28
2.2.2.2 Brojlerji	31
2.2.2.3 Purani	32
2.2.2.4 Prašiči	33
2.2.2.5 Ovece in govedo.....	34
2.2.3 Okužbe pri ljudeh	35
2.2.4 <i>S. Enteritidis</i> v živilih živalskega izvora	38
2.2.4.1 Kokošja jajca	39
2.2.4.2 Izdelki iz jajc	42
2.2.4.3 Meso perutnine	43
2.2.4.4 Meso prašičev	44
2.3 Epidemiološke metode za preučevanje okužb s salmonelami	45
2.3.1 PFGE in njena uporabnost za tipizacijo <i>S. Enteritidis</i>	49
2.4 Metode zaščite živali pred okužbami s <i>S. Enteritidis</i>	51
2.4.1 Biovarstveni ukrepi	52
2.4.2 Kompetitivni antagonizem	52
2.4.3 Zaščitno cepljenje.....	53
2.4.4 Razkuževanje krme	54
2.4.5 Uporaba probiotikov	54
2.5 Metode zaščite ljudi pred okužbami s <i>S. Enteritidis</i>	54
3 MATERIAL IN METODE	56
3.1 Izolati iz živali	56
3.1.1 Izolati iz kokoši nesnic	56
3.1.2 Izolati iz brojlerjev	56
3.1.3 Izolati iz puranov	56
3.1.4 Izolati iz prašičev	57
3.1.5 Izolati iz drugih živali	58
3.1.6 Izolati iz drugih vzorcev	58
3.2 Izolati iz ljudi	58
3.3 Epidemiološka analiza.....	58

3.4	Genotipizacija s pulzno elektroforezo – PFGE	59
3.5	Kriteriji za opredelitev genotipov.....	62
4	REZULTATI	63
4.1	Genotipizacija izolatov iz kokoši nesnic	63
4.2	Genotipizacija izolatov iz brojlerjev	66
4.3	Genotipizacija izolatov <i>S. Enteritidis</i> iz puranov	68
4.4	Genotipizacija izolatov iz prašičev.....	70
4.5	Genotipizacija izolatov iz ostalih živali	72
4.5.1	Plazilci.....	72
4.5.2	Mestni golobi, noji, ovca in miš.....	73
4.6	Genotipizacija izolatov iz ljudi.....	74
4.7	Analiza okužb.....	78
4.7.1	Okužbe pri kokoših nesnicah	78
4.7.1.1	Gospodarstvo GA.....	78
4.7.1.2	Gospodarstvo GB	79
4.7.1.3	Gospodarstvo GC	80
4.7.1.4	Gospodarstvo GD.....	81
4.7.1.5	Gospodarstvo GE	82
4.7.1.6	Gospodarstvo GF.....	83
4.7.1.7	Gospodarstvo GG.....	84
4.7.1.8	Gospodarstvo GH.....	85
4.7.1.9	Gospodarstvo GI	86
4.7.1.10	Analiza okužb gospodarstev za rejo kokoši nesnic	87
4.7.2	Okužbe pri brojlerjih	88
4.7.2.1	Gospodarstvo GB1	88
4.7.2.2	Gospodarstvo GB2	89
4.7.3	Okužbe pri prašičih	90
4.7.3.1	Gospodarstvo GP1.....	90
4.7.3.2	Gospodarstvo GP2.....	92
4.7.3.3	Gospodarstvo GP3.....	93
4.7.3.4	Analiza okužb gospodarstev za rejo prašičev	94
4.7.4	Analiza izbruhov okužb pri človeku	95
4.7.4.1	Izbruh okužbe s <i>S. Enteritidis</i> v letu 2008.....	96
4.7.4.2	Izbruh okužbe s <i>S. Enteritidis</i> v letu 2009.....	97
4.8	Genotipizacija drugih izolatov	98
4.9	Genotipizacija in epidemiološka analiza vseh izolatov <i>S. Enteritidis</i>	100
4.10	Epidemiološke povezave med okužbami s <i>S. Enteritidis</i> pri živalih in ljudeh.....	105
5	RAZPRAVA	110
5.1	Epidemiološka analiza okužb kokoši nesnic	112
5.2	Epidemiološka analiza okužb brojlerjev	113
5.3	Epidemiološka analiza okužb puranov	114
5.4	Epidemiološka analiza okužb prašičev.....	115
5.5	Epidemiološka analiza okužb plazilcev, mestnih golobov, nojev, ovc in miši	116
5.6	Epidemiološka analiza okužb ljudi	117
5.7	Epidemiološka analiza okužb s <i>S. Enteritidis</i> pri živalih in pri ljudeh.....	118
5.7.1	Okužbe pri živalih	118
5.7.2	Okužbe pri ljudeh.....	120
5.8	Epidemiološke povezave med okužbami živali in ljudi s <i>S. Enteritidis</i>	121
6	SKLEPI	125
7	POVZETEK.....	126

8	SUMMARY	128
9	ZAHVALA	130
10	LITERATURA	131
11	PRILOGA	146

KAZALO TABEL

Tabela 1: Okužbe ljudi s salmonelami od leta 2005 do leta 2008 v Sloveniji.	
Table 1: <i>Salmonella</i> infections in humans from 2005 to 2008 in Slovenia.....	37
Tabela 2: Izolati iz živali.	
Table 2: The isolates obtained from animals	57
Tabela 3: Pregled števila ugotovljenih genotipov pri izolatih iz kokoši nesnic.	
Table 3: Overview of the number of identified genotypes of the laying hens' isolates.....	64
Tabela 4: Genotipi, ugotovljeni pri izolatih iz brojlerjev.	
Table 4: Genotypes identified in isolates from broilers.....	66
Tabela 5: Prikaz zbirke izolatov iz brojlerjev uvrščenih v raziskavo.	
Table 5: Illustration of collection of the isolates from broilers.....	67
Tabela 6: Izolati iz puranov in ugotovljeni genotipi.	
Table 6: The isolates from turkeys and identified genotypes.....	69
Tabela 7: Prikaz števila izolatov <i>S. Enteritidis</i> , pridobljenih pri prašičih, po vrsti vzorca in letu izolacije.	
Table 7: List of isolates of <i>S. Enteritidis</i> isolated from pigs by type of sample and year of isolation.....	70
Tabela 8: Seznam izolatov <i>S. Enteritidis</i> , izoliranih pri prašičih.	
Table 8: List of isolates of <i>S. Enteritidis</i> isolated from pigs.....	71
Tabela 9: Genotipi, ugotovljeni pri izolatih iz prašičev.	
Table 9: Genotypes identified in the isolates from pigs.....	72
Tabela 10: Izolati iz mestnih golobov, nojev, ovce in miši.	
Table 10: Isolates from pigeons, ratites, sheep and mice.....	73
Tabela 11: Skupine in genotipi, ugotovljeni pri izolatih iz ljudi.	
Table 11: Clusters and genotypes found in the isolates from humans.....	74
Tabela 12: Deleži najpogostejših genotipov prikazanih po geografskih področjih Novo mesto, Murska Sobota in Maribor.	
Table 12: The most frequently detected genotypes by geographical areas Novo Mesto, Murska Sobota and Maribor.....	76
Tabela 13: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GA, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi.	
Table 13: Samples taken on holding GA in the monitoring and control of <i>S. Enteritidis</i> in laying hens flocks and identified genotypes.....	78
Tabela 14: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GB, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi.	
Table 14: Samples taken on holding GB in the monitoring and control of <i>S. Enteritidis</i> in laying hens flocks and identified genotypes.....	79
Tabela 15: Vzorci odvzeti na gospodarstvu GC, v monitoringu pri kokoših nesnicah, za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi.	
Table 15: Samples taken on holding GC in the monitoring and control of <i>S. Enteritidis</i> in laying hens flocks and identified genotypes.....	80
Tabela 16: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GD, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi.	
Table 16: Samples taken on holding GD in the monitoring and control of <i>S. Enteritidis</i> in laying hens flocks and identified genotypes.....	81

Tabela 17: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GE, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi. Table 17: Samples taken on holding GE in the monitoring and control of <i>S. Enteritidis</i> in laying hens flocks and identified genotypes.....	82
Tabela 18: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GF, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi. Table 18: Samples taken on holding GF in the monitoring and control of <i>S. Enteritidis</i> in laying hens flocks and identified genotypes.....	83
Tabela 19: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GG, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi. Table 19: Samples taken on holding GG in the monitoring and control of <i>S. Enteritidis</i> in laying hens flocks and identified genotypes.....	84
Tabela 20: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GH, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi. Table 20: Samples taken on holding GH in the monitoring and control of <i>S. Enteritidis</i> in laying hens flocks and identified genotypes.....	85
Tabela 21: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GI, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi. Table 21: Samples taken on holding GI in the monitoring and control of <i>S. Enteritidis</i> in laying hens flocks and identified genotypes.....	86
Tabela 22: Pregled ugotovljenih genotipov po gospodarstvih za rejo kokoši nesnic, kjer je bila ugotovljena okužba s <i>S. Enteritidis</i> in je bil izoliran več kot en izolat. Table 22: Overview of identified genotypes in infected laying hens flocks where <i>S. Enteritidis</i> has been isolated from more than one sample.....	88
Tabela 23: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GB1 za rejo brojlerjev, za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi. Table 23: Samples taken on broiler rearing holding GB1 for analysis to detect <i>S. Enteritidis</i> and identified genotypes.....	89
Tabela 24: Vzorci odvzeti na gospodarstvu GB2 za rejo brojlerjev, za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi. Table 24: Samples taken on broiler rearing holding GB2 for analysis to detect <i>S. Enteritidis</i> and identified genotypes.....	89
Tabela 25: Vzorci odvzeti na gospodarstvu GP1 pri plemenskih prašičih za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi. Table 25: Samples taken from the breeding pigs holding GP1 for analysis to detect <i>S. Enteritidis</i> and identified genotypes.....	91
Tabela 26: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GP2 pri plemenskih prašičih za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> , in ugotovljeni genotipi. Table 26: Samples taken from the breeding pigs holding GP2 for analysis to detect <i>S. Enteritidis</i> and identified genotypes.....	93
Tabela 27: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GP3 pri plemenskih prašičih za preiskavo na <i>S. Enteritidis</i> in ugotovljeni genotipi. Table 27: Samples taken from the breeding pigs holding GP3 for analysis to detect <i>S. Enteritidis</i> and identified genotypes.....	94
Tabela 28: Število izolatov <i>S. Enteritidis</i> iz vzorcev fecesa na gospodarstvih za rejo plemenskih prašičev po ogradah in kategorijah prašičev. Table 28: The number of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from faecal samples on pigs holdings in pens and categories of pigs.....	95

Tabela 29: Pregled ugotovljenih genotipov po gospodarstvih za rejo prašičev, kjer je bila ugotovljena okužba s <i>S. Enteritidis</i> in je bil izoliran več kot en izolat. Table 29: Overview of identified genotypes in infected pig breeding holdings, where <i>S. Enteritidis</i> has been isolated from more than one sample	95
Tabela 30: Izolati, pridobljeni v okviru raziskave izbruha okužbe s <i>S. Enteritidis</i> v letih 2008 in 2009. Table 30: Isolates obtained from an epidemiological study of an outbreak of infection with <i>S. Enteritidis</i> in years 2008 and 2009.....	95
Tabela 31 : Izolati <i>S. Enteritidis</i> iz mesnih izdelkov, krme, fižola in komposta. Table 31: Isolates of <i>S. Enteritidis</i> from meat products, animal feed, beans and compost.....	98
Tabela 32: Ugotovljeni genotipi pri izolatih <i>S. Enteritidis</i> iz živali in človeka (n = 368). Table 32: Observed genotypes of isolates <i>S. Enteritidis</i> in humans and animals (n = 368)..	100
Tabela 33: Pregled izolatov z genotipi glede na vrsto vzorca ter vrsto in kategorijo živali. Table 33: Overview of the isolates with genotypes according to specimen type, species and category of animal.....	102
Tabela 34: Najpogosteje ugotovljeni genotipi pri izolatih iz živali, prikazani po geografskih področjih. Table 34: The most frequently detected genotypes in isolates from animals shown by geographical areas.....	103
Tabela 35: Prikaz števila izolatov (n = 174) in deležev najpogosteje ugotovljenih genotipov A1, A2, B1 in C2 pri izolatih <i>S. Enteritidis</i> iz ljudi. Table 35: The number of isolates (n = 174) and shares of the most prevalent identified genotypes A1, A2 and B1 in isolates of <i>S. Enteritidis</i> in humans.....	104

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema razvrstitve salmonel, podatki so povzeti po Guibourdenche in sod., 2010. Figure 1: <i>Salmonella</i> classification scheme, data are taken from the Guibourdenche et al., 2010.....	20
Slika 2: Shematski prikaz epidemiološke analize izolatov <i>S. Enteritidis</i> . Figure 2: Schematic view of the epidemiological analysis of isolates of <i>S. Enteritidis</i>	59
Slika 3: Primerjava najpogostejših genotipov, ugotovljenih pri izolatih iz kokoši nesnic. Figure 3: Comparison of genotypes found in isolates from laying hens.	63
Slika 4: Na sliki je primer rezultatov genotipizacije izolatov iz kokoši nesnic in brojlerjev. Figure 4: The figure is an example of results of genotyping isolates of from laying hens and broilers	64
Slika 5: Prikaz deležev ugotovljenih genotipov pri izolatih iz kokoši nesnic. Figure 5: Illustration of proportions of genotypes found in isolates from laying hens.....	65
Slika 6: Primerjava genotipov izolatov iz brojlerjev. Figure 6: Comparison of genotypes of isolates from broilers	146
Slika 7: Pregled ugotovljenih genotipov pri izolatih iz brojlerjev. Figure 7: Overview of identified genotypes in the isolates from broilers.....	68
Slika 8: Primerjava genotipov, ugotovljenih pri izolatih iz puranov. Figure 8: Comparison of genotypes found in isolates from turkeys.....	69
Slika 9: Primerjava ugotovljenih genotipov pri izolatih iz prašičev. Figure 9: Comparison of genotypes found in isolates from pigs.....	147
Slika 10: Primerjava genotipov, ugotovljenih pri izolatih iz plazilcev in ljudi. Figure 10: Comparison of genotypes found in isolates from reptiles and humans.....	73
Slika 11: Primerjava genotipov, ugotovljenih pri izolatih iz mestnih golobov, nojev, ovce in miši. Figure 11: Comparison of genotypes found in the isolates from pigeons, ratites, sheep and mice	74
Slika 12: Na sliki so prikazani rezultati genotipizacije izolatov <i>S. Enteritidis</i> iz ljudi: primerjava 24 značilnih genotipov. Figure 12: The figure shows the results of genotyping of isolates of <i>S. Enteritidis</i> in humans: comparison of 24 representative genotypes.....	75
Slika 13: Pregled ugotovljenih genotipov pri izolatih iz ljudi. Figure 13: Overview of identified genotypes in the isolates from humans.....	76
Slika 14: Primer rezultatov genotipizacije izolatov iz človeka. Figure 14: Example of results of genotyping isolates from humans.....	77
Slika 15: Prikaz deležev prevladujočih genotipov A1, A2 in B1. Slika 15: Illustration of proportions of most prevalent genotypes A1, A2 and B1.....	77
Slika 16: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GA Figure 16: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GA.....	79
Slika 17: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GB. Figure 17: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GB.....	80
Slika 18: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GC. Figure 18: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GC.....	81
Slika 19: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GD. Figure 19: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GD.....	82
Slika 20: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GE. Figure 20: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GE.....	83
Slika 21: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GF.	

Figure 21: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GF.....	84
Slika 22: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> , na gospodarstvu GG.	
Figure 22.: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GG.....	85
Slika 23: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> , na gospodarstvu GH.	
Figure 23: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GH.....	86
Slika 24: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GI.	
Figure 24: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GI.....	87
Slika 25: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GB1.	
Figure 25: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GB1.....	89
Slika 26: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GB2	
Figure 26: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GB2.....	90
Slika 27: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GP1.	
Figure 27: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GP1.....	92
Slika 28: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GP2.	
Figure 28: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from holding GP2.....	93
Slika 29: Primerjava genotipov izolatov <i>S. Enteritidis</i> na gospodarstvu GP3.	
Figure 29: Comparison of genotypes of isolates of <i>S. enteritidis</i> from holding GP3.....	94
Slika 30: Primerjava izolatov <i>S. Enteritidis</i> iz ljudi, živila in iz jate kokoši nesnic, pridobljenih v okviru raziskave izbruha okužbe v letu 2008.	
Figure 30: Comparison of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from humans, food and from flock of laying hens obtained in the survey of an outbreak of infection in 2008.....	96
Slika 31: Primerjava izolatov <i>S. Enteritidis</i> iz ljudi in živila, pridobljenih v okviru raziskave izbruha okužbe v letu 2009 in iz jate kokoši nesnic, pridobljenih v okviru raziskave izbruha okužb v letih 2008 in 2009.	
Figure 31: Comparison of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from humans and food obtained in the survey of an outbreak of infection in 2009 and from flock of laying hens obtained in the survey of an outbreaks of infection in 2008 and 2009.....	97
Slika 32: Primerjava genotipov, ugotovljenih pri izolatih <i>S. Enteritidis</i> iz mesnih izdelkov, krme, fižola in komposta.	
Picture 32: Comparison of genotypes found in isolates of <i>S. Enteritidis</i> in meat products, animal feed, beans and compost.....	98
Slika 33: Deleži genotipov A1, A2, A6, A8, B1 in C2 iz zbirke izolatov <i>S. Enteritidis</i> iz živali in ljudi, ki smo jih uvrstili v izračun deležev (n = 335).	
Figure 33: Shares of genotypes A1, A2, A6, A8, B1 and C2 in collection of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from animals and humans, which we have used in the calculation of the shares (n = 335).....	101
Slika 34: Deleži genotipov A1, A2, A6, A8, B1 in C2 iz zbirke izolatov <i>S. Enteritidis</i> iz živali, ki smo jih uvrstili v izračun deležev (n = 161).	
Figure 34: Shares of genotypes A1, A2, A6, A8, B1 and C2 in collection of isolates of <i>S. Enteritidis</i> from animals, which we have used in the calculation of the shares (n = 161).....	103
Slika 35: Na sliki je prikazana primerjava 24 značilnih genotipov.	
Figure 35: The figure shows comparison of 24 typical genotypes.....	148
Slika 36: Na sliki je primer rezultatov genotipizacije izolatov <i>S. Enteritidis</i> iz živali.	
Figure 36: Example of results of genotyping isolates of <i>S. Enteritidis</i> from animals.....	104
Slika 37: Prikaz deležev prevladujočih genotipov pri izolatih <i>S. Enteritidis</i> iz ljudi, živali (vsi vzorci iz živali) ter posebej kokoši nesnic in brojlerjev.	
Figure 37: Shares of dominant genotypes in isolates of <i>S. Enteritidis</i> from humans, animals, (all isolates from animals) and separately laying hens and broilers.....	105

- Slika 38:** Prikaz deležev genotipov, ugotovljenih pri človeku (Čn =174), kokoših nesnicah (KNn = 78), brojlerjih (Bn = 33) in prašičih (Pn = 24).
Figure 38: Proportion of genotypes identified in the man (Čn = 174), laying hens (KNn = 78), broilers (Bn = 33) and pigs (Pn = 24).....106
- Slika 39:** Prikaz deležev genotipov A1, A2, B1 in C2 skupaj, ugotovljenih pri človeku (n = 174), vseh živali (n = 161), kokoših nesnicah (n = 78), brojlerjih (n = 33) in prašičih (n = 24), vse živali – vsi izolati iz živali skupaj.
Figure 39: Shares of genotypes A1, A2, B1 and C2, together identified in humans (n = 174), all animals (n = 161), laying hens (n = 78), broilers (n = 33) and pigs (n = 24), all animals - all isolates from animals.....107
- Slika 40:** Shematski prikaz ugotovljenih genotipov pri izolatih *S. Enteritidis*, izoliranih pri različnih kategorijah kokoši nesnic v okolju, iz jajc in pri človeku ter možne povezave med njimi.
Figure 40: Schematic diagram showing genotypes found in isolates of *S. Enteritidis* isolated from different categories of laying hens in an environment, from eggs and humans and possible routes of connection between them.....108
- Slika 41:** Prikaz ugotovljenih genotipov pri izolatih iz kokoši nesnic, surovih jajc, brojlerjev, puranov, prašičev, noja, fižola in človeka ter možnih poti okužbe človeka s *S. Enteritidis* in možnih povezav.
Figure 41: Schematic diagram showing genotypes found in isolates from laying hens, raw eggs, broilers, turkeys, pigs, ostriches, beans, and man and possible routes of human infection with *S. Enteritidis*.....109

OKRAJŠAVE

OKRAJŠAVA	POMEN
a_w	Aktivnost vode
AFLP	Poliformizem dolžine pomnoževanih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
CE	Konkurenčna izključitev (Competitive Exclusion)
cfu	Kolonijska enota (angl. colony forming units)
CI	Interval zaupanja (angl. Confidence Interval)
D	Decimalni redukcijski čas
DHP	Dobra higienska praksa
Dk	Diceev koeficient
DPP	Dobra proizvodna praksa
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
ECDC	Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. European Centre for Disease Prevention and Control)
GFP	Dobra rejska praksa (angl. Good Farming Practices)
EDTA	Etilendiamintetraoacetna kislina (angl. Ethylenediamine Tetraacetic Acid)
EMB	Gojišče (angl. Eosin-Methylene Blue)
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority)
EU	Evropska Unija
HACCP	Analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (angl. Hazard Analysis Critical Control Point)
IS	Insercijsko zaporedje (angl. Insertion Sequence)
IVZ RS	Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije
MSRV	Gojišče (angl. Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis)
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Gelska pulzna elektroforeza (angl. Pulsed - Field Gel Electroforesis)
PT	Fagotip (angl. phagotype)
RAPD	Naključno pomnoževana polimorfna DNK (angl. Random Amplified Polymorphic DNA)
SCVMPH	Znanstveni odbor za veterinarske ukrepe v zvezi z javnim zdravjem (angl. the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health)
SPI -2	Skupek genov za patogenost SPI-2 (angl. <i>Salmonella</i> Pathogenicity Island)
SS	Gojišče (angl. <i>Salmonella Shigella</i> agar)
Kb	Kilobaz
Mb	Megabaz
TBE	Tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TSB	Gojišče triptični soja bujon
UPGMA	Neutežna metoda parnih skupin z aritmetično sredino (angl. Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

1 UVOD

Uživanje hrane je pomemben del človeškega življenja. Ljudje so vedno bili izpostavljeni okužbam s hrano živalskega porekla in tudi danes so takšne okužbe velik javnozdravstveni problem. Veterinarska medicina ima pomembno vlogo pri spremljanju, preprečevanju in nadzoru okužb s hrano (Epp, 2008). V številnih državah po svetu so okužbe z bakterijami v živilih najpogostejši vzrok za nastanek bolezni želodca in črevesja pri ljudeh. Bakterije iz rodov *Salmonella* in *Campylobacter* povzročajo več kot 90 % okužb z živili (Thorns, 2000). Salmonelle so že dolgo znane kot patogene bakterije, ki povzročajo okužbe pri živalih in ljudeh, zaradi katerih nastajajo velike ekonomske škode.

Okužbe, ki jih povzročajo salmonelle, so zoonoze. Človek ter številne domače in divje živali so rezervoar za salmonelle, ki lahko dolgo preživijo v živilih in okolju in lahko vstopijo v različnih fazah prehranske verige, od proizvodnje do uživanja živil (Wong in sod., 2002; Kim in sod., 2007; Stevens in sod., 2009). Čeprav lahko serovare salmonel najdemo pri skoraj vseh vrstah živali, je pri določenih serovarih močna povezava med serovarom in vrsto živali (Baggesen in sod., 2000).

Najpogosteje povzročata salmoneloze pri ljudeh serovara *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*).

Vir okužb ljudi s *S. Enteritidis* so lahko meso prašičev, goveje meso, ribe, mleko itd.. Večina okužb je posledica uživanja mesa perutnine, izdelkov iz mesa perutnine in zlasti konzumnih jajc. *S. Enteritidis* ima še posebej izraženo afiniteto za kolonizacijo reproduktivnega trakta, kjer se jajca okužijo že v procesu formiranja (Keller in sod., 1995; Thorns, 2000).

Pri okužbah ljudi, ki so posledica uživanja kontaminirane hrane, so simptomi bolezni v večini primerov blagi in prenehajo brez zdravljenja, lahko pa povzročijo tudi težje oblike bolezni in v redkih primerih tudi smrt bolnika. Ocenjeno je bilo, da v 2 do 3 % primerov nastanejo tudi kronične posledice okužb (Lindqvist in sod., 2001; Humphrey, 2006), tako da je ekonomska škoda, ki nastane skupaj z akutnimi oblikami okužbe, velika.

Okužbe s salmonelami so pogoste tudi v državah Evropske unije (EU). V letu 2006 je bilo v EU 160649 potrjenih primerov ali 34,6/100 000 prebivalcev. Najpogosteje sta bila vzrok za okužbo s hrano serovara *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*. Število okužb pri ljudeh se v zadnjih nekaj letih v državah EU zmanjšuje, v letu 2009 je bila incidenca 26,4/100 000

prebivalcev. V Sloveniji je bilo v letu 2003 prijavljenih 4005 primerov bolezni ali 201/100 000 prebivalcev. V letu 2006 je bilo prijavljenih 1519 primerov ali 75/100 000 prebivalcev (IVZ, 2009). V letu 2009 se je incidenca zmanjšala na 626 prijavljenih primerov ali 30,6/100 000 prebivalcev (IVZ, 2010). Število okužb s salmonelami je v preteklih letih upadalo, vendar ostajajo salmonеле pogost povzročitelj gastroenterokolitisev. Incidenca v Sloveniji je bila pri ljudeh do leta 2011, višja od povprečne incidence v EU. Dejansko število okužb pa je še bistveno večje od števila prijavljenih primerov, ker ljudje z blažimi oblikami bolezni ne poiščejo pomoči zdravnika.

Zaradi dejavnikov, ki vplivajo na širjenje salmoneloz, kot so: velika koncentracija živali v reji, konsolidacija živilske industrije, globalizacija trga z živili, prehranske navade ljudi, nakupi večjih količin živil na zalogo in podaljšano hranjenje doma, globalna migracija ljudi, povečevanje populacije občutljive za okužbe, razvoj odpornosti bakterij proti protimikrobnim zdravilom, obstaja močno tveganje za nastanek okužb s salmonelami.

Za načrtovanje učinkovitih preventivnih ukrepov in ukrepov v primeru pojava bolezni moramo poznati vire, poti in pogoje širjenja okužb s salmonelami. Pri tem ni dovolj, da določimo vrsto mikroorganizma, ki je povzročil okužbo, ampak poskušamo posamezne seve tudi tipizirati in jim določiti lastnosti, ki jih ločujejo od drugih sevov. Tenover in sod. (1995) navajajo, da je za epidemiološke raziskave potrebna tipizacija izolatov, s ciljem pridobiti dokaze, da so si epidemiološko povezani izolati med izbruhom bolezni tudi genetsko podobni. Za vrednotenje rezultatov pa moramo poznati stopnjo in frekvenco variabilnosti epidemiološkega označevalca.

Metode za tipizacijo izolatov, kot so fagotipizacija in molekularne metode, omogočajo primerjavo in ugotavljanje genetske podobnosti med posameznimi izolati. Molekularne metode temeljijo na medsebojni primerjavi izolatov na podlagi njihove DNK. Gelska pulzna elektroforeza (angl. Pulsed-field gel electrophoresis) omogoča ugotavljanje genetske podobnosti med izolati, kar omogoča ugotavljanje povezav med posameznimi deli prehranske verige (Woo, 2005). Zato jo nekateri avtorji označujejo kot »zlati standard« za subtipizacijo serovarov *Salmonella* spp. (Tenover in sod., 1995; Kilic in sod., 2010).

Za natančno, popolno in zanesljivo epidemiološko raziskavo okužbe in povezav med izolati so nujni podatki o vrsti živila, ki je vzrok za okužbo, podatki o obolelih, o poteku okužbe itd..

V naši raziskavi smo sledili naslednjim ciljem: ugotoviti, kakšna je genetska raznolikost med ugotovljenimi tipi izolatov *S. Enteritidis* ter kakšne so povezave med okužbami živali in ljudi. S tem smo želeli pridobiti dodatne informacije za načrtovanje programov monitoringa na salmonele, uvajanje učinkovitih ukrepov za preprečevanje izbruhov bolezni in pridobitev dodatnih parametrov za oceno tveganja na področju okužb s *S. Enteritidis* pri uživanju živil živalskega porekla ter pri tem potrditi ali ovreči naslednje hipoteze:

1. Pri sevih *S. Enteritidis* je genetska raznolikost omejena.
2. Sevi, izolirani pri različnih vrstah živali, se v večini primerov genetsko razlikujejo.
3. Sevi, izolirani pri isti kategoriji iste vrste živali, se v večini primerov genetsko ne razlikujejo.
4. Sevi, izolirani pri različnih kategorijah iste vrste, se v večini primerov genetsko razlikujejo.
5. Sevi, izolirani iz okolja, se v večini primerov ne razlikujejo od sevov živali iz istega okolja.
6. Sevi, izolirani v rejah živali, se v večini primerov genetsko razlikujejo od sevov, izoliranih pri ljudeh.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*

S. Enteritidis je leta 1888 izoliral Gärtner pri človeku, ki se je okužil z uživanjem govejega mesa. Imenoval jo je *Bacillus Enteritidis* (Batis in Brglez, 1983).

2.1.1 Razvrstitev salmonel

Salmonele sodijo v družino *Enterobacteriaceae*. V rod *Salmonella* spadata dve vrsti: *S. enterica* in *S. bongori* (Tabela 1).

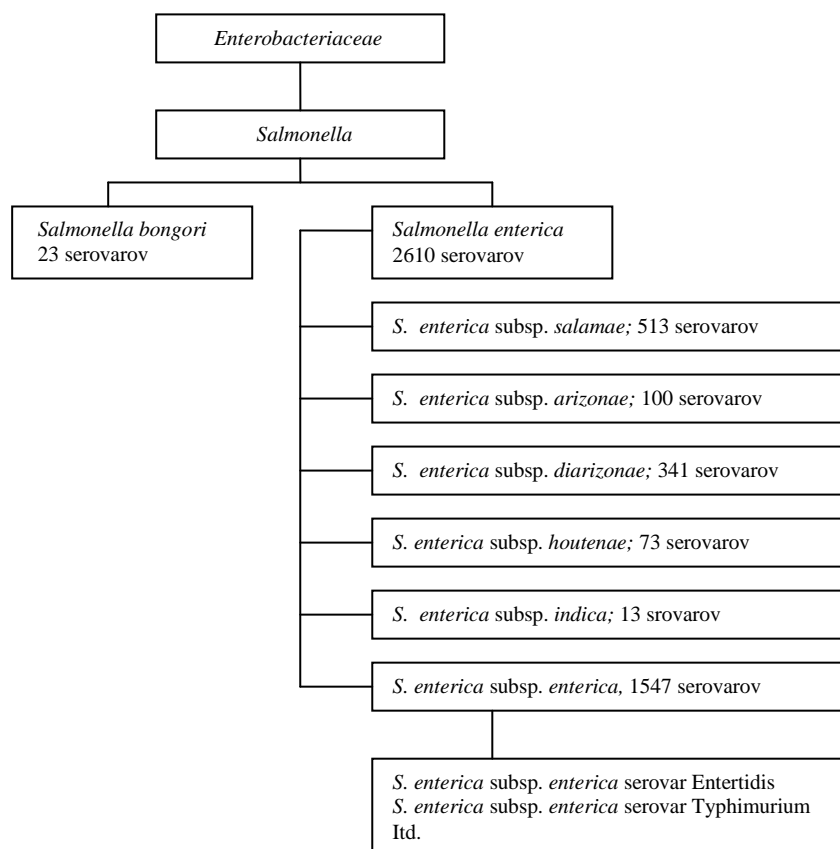
Vrsta *S. bongori* obsega 21 poznanih serovarov. Ugotovljeni so bili pri hladnokrvnih živalih in v okolju, redko pa pri sesalcih, vključno s človekom (Yan in sod., 2003).

Vrsta *S. enterica* ima glede na genetsko podobnost in biokemične razlike šest podvrst *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* in *S. enterica* subsp. *indica*. (Le Minor in Popoff, 1997; Grimont in Weill, 2007).

Več kot 99 % bakterij rodu *Salmonella* pripada vrsti *S. enterica*. Blizu 60 % izoliranih salmonel te vrste spada v podvrsto *S. enterica* subsp. *enterica* (Le Minor in Popoff, 1997; Yan in sod., 2003).

V vrsto *S. enterica* spada 2610 serovarov, od tega jih 1547 pripada podvrsti *S. enterica* subsp. *enterica* (Guibourdenche in sod., 2010), število ugotovljenih serovarov se vsako leto povečuje.

Poimenovanje in razvrščanje salmonel se je v preteklosti spreminjalo. Prvotno razvrščanje ni temeljilo na genetski podobnosti, temveč so bile poimenovane na podlagi epidemioloških podatkov, biokemičnih lastnosti, po kliničnih znakih bolezni ali po vrsti živali, pri katerih so bile izolirane (*Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella abortus-ovis*) in kasneje po mestih, kjer so bile prvotno izolirane (npr. *Salmonella london*, *Salmonella panama*, *Salmonella stanleyville*). Danes razvrščanje salmonel temelji na antigenskih lastnostih salmonel po shemi, ki sta jo utemeljila Kauffmann in White, na osnovi antigenskih razlik v lipopolisaharidu (O-antigen), flagelinu (H-antigen) in kapsuli (Vi-antigen) (Yan in sod., 2003; Pui in sod., 2011).



Slika 1: Shema razvrstitve salmonel, podatki so povzeti po Guibourdenche in sod., 2010.
Figure 1: Salmonella classification scheme, data are taken from the Guibourdenche et al., 2010.

2.1.2 Lastnosti *S. Enteritidis*

Salmonele so po Gramu negativne, nesporogene, fakultativno anaerobne, gibljive paličke (izjema je serovar *S. Galinarum*, ki ni gibljiv), premera 0,5 μm in dolžine 2 do 3 μm . Imajo fermentativni in respiratorni metabolizem. Večina sevov bakterij rodu *Salmonella* ima flagele, nekatere tudi kapsulo, reducirajo nitrato v nitrite, fermentirajo glukozo in so oksidaza negativne (Yan in sod., 2003).

Salmonele se razmnožujejo pri temperaturi 5°C do 47°C (optimalno pri 37°C), pri pH 4,0 do 9,0 (optimalno med 6,5 in 7,5), minimalna vodna aktivnost za razmnoževanje a_w je 0,94 (Bem in sod., 2003; Pui in sod., 2011). Rastejo na številnih umetnih gojiščih, kot so krvni agar, MacConkey agar, gojišče EMB (angl. eosin-methylene blue). Pri izolaciji iz kontaminiranih

vzorcev (npr. feces), v katerih je veliko število drugih bakterij, se uporabljajo selektivna gojišča; bizmut sulfitni agar, dezoksiholatni agar (Yoshikawa, 1980), SS agar (angl. *Salmonella Shigella* agar), XLD agar (angl. xylose lysine desoxycholate agar), briljantno zeleni agar, MSR/V (angl. Modified Semi-solid Rappaport-Vasiliadis). Po izgledu so kolonije na trdnih gojiščih okrogle, premera od 2 do 4 mm.

2.1.3 *S. Enteritidis* v okolju

S sevi serovara *S. Enteritidis* se lahko okužijo številne vrste živali (perutnina, glodalci in drugi sesalci) in ljudje (Lillehoy in sod., 2007; Thompson in sod., 2008).

S. Enteritidis je razvila zelo uspešne mehanizme prilagajanja, s katerimi lahko vzdržuje homeostazo pri zelo različnih pogojih rasti. Sposobnost prilagajanja v različnih pogojih rasti in specifične značilnosti celične površine prispevajo k preživetju *S. Enteritidis* v različnih gostiteljih in okoljih (Guard-Petter, 2001; Pui in sod., 2011). Zelo dobra sposobnost prilagajanja in preživetja v okolju (zemlji, vodi in na površini različnih snovi) omogoča uspešen prenos okužbe na nove gostitelje (Liebana in sod., 2001; Winfield in Groisman, 2003). Sposobnost *S. Enteritidis*, da se uspešno odzove na spremembe v okolju, je pomembna tudi za preživetje bakterije v prehranski verigi (Humphrey, 2004). Celice *S. Enteritidis* lahko formirajo biofilm (Guard-Petter, 2001; Stepanovič in sod., 2003), kar jim omogoča zadrževanje na površinah opreme v proizvodnji. Formiranje biofilma ima lahko velike ekonomske posledice, ker so kontaminirane površine stalen vir okužbe (Stepanovič in sod., 2003; Pui in sod., 2011).

Pri nižjih temperaturah lahko ostanejo žive dlje časa kot pri sobni temperaturi. V ledu in zmrznjeni zemlji lahko prezimijo, dolgo preživijo tudi v vodi, v vodovodni vodi do 3 tedne. V blatu ostanejo žive 120 dni in več, v krmilih pa celo 200 dni. V okolju, ki vsebuje organske snovi, lahko salmonele preživijo najmanj 1 leto (Winfield in Groisman, 2003).

S. Enteritidis lahko preživi najmanj 1 leto v praznem hlevu in 26 mesecev v okuženi krmi. V zaprtih prostorih preživi dlje kot v zunajih izpustih, kjer je lahko izpostavljena soncu (Kim in sod., 2007).

2.1.4 Odpornost *S. Enteritidis* proti vročini

Salmonele so termolabilne, temperatura 56°C jih uniči že v 20 do 30 minutah, 80°C pa v nekaj sekundah do 10 minutah (Batis in Brglez, 1983). Salmonele dlje preživijo v živilu kot na primer v umetnem gojišču TSB (triptični soja bujon). Pri primerjavi vrednosti D (decimalni redukcijski čas), pri temperaturi pasterizacije 58°C je bil D pri prašičjem mesu od 2,79 do 4,89 minute, pri gojišču TSB pa od 0,79 do 2,67 minute (Quintavalla in sod., 2001).

Na toplotno odpornost salmonel vpliva več dejavnikov: vrsta seva, začetno število bakterij v živilu, vrednost pH, sestava živila, vrednost a_w , prisotnost kompetitivne mikroflore, stres, kontaktni čas (Doyle in Mazzota, 1999). Na toplotno odpornost vplivajo tudi pogoji za rast in faza rasti. V logaritemski fazi rasti so manj odporne na toplotno obdelavo kot v stacionarni fazi. Faza rasti ni vplivala na preživetje bakterij na površinah. Izolati iz ljudi so bili bolj odporni kot izolati iz živali (Humphrey in sod., 1995). Odpornost sevov salmonel v različnih živilskih izdelkih kažejo, da imajo od vseh izmerjenih vrednosti D najvišjo toplotno odpornost salmonele v tekočih celih jajcih in v tekočem rumenjaku (Doyle in Mazzota, 1999). Občutljivost za segrevanje variira. Z izpostavljanjem višjim temperaturam, alkalnemu okolju in pomanjkanju hranilnih snovi se odpornost poveča. Nasprotno pa se odpornost na povišane temperature zmanjša z izpostavljanjem nizkim temperaturam (Humphrey in sod., 1995).

Izmerjene vrednosti D 52°C (čas, v katerem pride do 90-odstotnega zmanjšanja števila bakterij pri 52°C) so bile za izolate *S. Enteritidis* iz vsebine jajca 17,0 in 17,9 minute. Pri izolatu z jajčne lupine je bila vrednost D 17,3 minute. Pri izolatih iz trupov piščancev so bile vrednosti D 16,8, 16,9 in 18,1 minute. Pri izolatih iz ljudi so bile vrednosti D 24,2, 26,8 in 28,6 minute. Izolati iz ljudi so bili bolj odporni proti vročini kot izolati iz piščanca in jajc. V poskusih z jajci v lupini je bilo ugotovljeno, da je *S. Enteritidis* bolj odporna od *S. Typhimurium*. Prenos toplote v središče jajca je počasen, segrevanje v vroči vodi s temperaturo 57°C 25-30 minut sicer zmanjšuje število bakterij *S. Enteritidis*, vendar jih ne uniči popolnoma (Doyle in Mazzota, 1999).

Schuman in sod. (1997) so sveža, oprana in očiščena jajca teže 62 g kontaminirali s *S. Enteritidis* s koncentracijo celic približno 3×10^8 cfu preko jajčne lupine v sredino jajčnega rumenjaka. Pri taki kontaminaciji jajc so bile salmonele uničene s pasterizacijo pri temperaturi 58°C v 50-57 minutah oziroma v 65-75 minutah pri 57°C.

Davies in sod. (2008) poročajo, da je termična obdelava trdo kuhanih in mehko kuhanih jajc dovolj učinkovita, če je dosežena temperatura 63°C v globini. Pri umešanih jajcih je bila temperatura 63°C dosežena v 2 minutah. Vendar je bilo ugotovljeno, da je to prekratek čas za popolno uničenje salmonel, ker ni prišla vsa masa jajc v stik z vročo površino posode. Pri pečenju jajc na oko se salmonele ne uničijo zanesljivo, ker vrhnji del jajc ne pride v stik z vročo površino. Zato se pogosto ne doseže temperature 63°C v vsej vsebini jajca. Dosežena je bila temperatura 58,9°C, kar pa ni zadostovalo za popolno uničenje salmonel (Davies in sod., 2008). Bolj zanesljivo in učinkovito je, če se jajce po 1,5 min pečenja obrne (angl. over easy) (Davies in sod., 2008). *S. Enteritidis* raste zelo hitro pri temperaturi 23°C. Bakterije, namnožene pri tej temperaturi, so bolj odporne od tistih, ki so zrastle pri nizki temperaturi v hladilniku. Zato shranjevanje živil pri sobni temperaturi ne omogoča le hitrejše rasti, temveč se poveča tudi odpornost *S. Enteritidis* na toplotno obdelavo. Pri velikih stopnjah kontaminacije s *S. Enteritidis* običajne metode kuhanja jajc niso dovolj zanesljive za uničenje vseh bakterij v njih (Doyle in Mazzota, 1999).

Toplotni postopki, ki se uporabljajo v živilski industriji, in toplotna obdelava hrane doma so večinoma uspešni pri uničevanju vegetativnih oblik bakterij, ki se nahajajo v hrani, vendar lahko salmonele kljub temu v posameznih primerih preživijo postopke toplotne obdelave živil, kar je verjetno odvisno od sestave in lastnosti živila. Tako npr. sprememba v kislosti, suhi snovi, vodni aktivnosti (a_w) živila vpliva na toplotno občutljivost salmonel v živilu (Doyle in Mazzota, 1999).

2.1.5 Odpornost *S. Enteritidis* proti protimikrobnim zdravilom

V ZDA je bilo v letih 1996-2003 število odpornih izolatov *S. Enteritidis* zelo nizko, z izjemo odpornosti proti nalidiksinski kislini (Braden, 2006). V EU je bilo največ izolatov odpornih proti nalidiksinski kislini (21,1 % izolatov) in ciprofloksacinu (13,1 % izolatov) (EFSA in ECDC, 2011b).

Jones in sod. (2002) v Veliki Britaniji, Yong in sod. (2002) v Koreji, Cardinale in sod. (2005) v Senegalu so ugotovili, da je serovar *S. Enteritidis* v primerjavi z drugimi serovari manj nagnjen k razvoju odpornosti proti protimikrobnim zdravilom. Cardinale in sod. (2005) tako ugotavljajo, da je večina testiranih izolatov občutljiva proti protimikrobnim zdravilom. Posamezni izolati so bili odporni proti ampicilinu, tetraciklinu, gentamicinu in nalidiksinski

kislini. Te razlike so lahko posledica točkovnih mutacij z manjšimi genetskimi spremembami, ki pa so premajhne, da bi spremenile restriktijski vzorec PFGE.

Kang in sod. (2009) poročajo o odpornosti proti ampicilinu, tetraciklinu, nalidiksinski kislini, tikarcilinu, streptomycinu, cefalotinu in trimetoprim/sulfametoksazolu. Odpornost proti nalidiksinski kislini je bila bolj pogosta pri izolatih iz brojlerjev kot iz ljudi.

2.1.6 Genom *S. Enteritidis*

Genom *S. Enteritidis* obsega 4.685 Mb, *S. Gallinarum* 4,658 Mb, *S. Typhimurium* 4.857 Mb (Thompson in sod., 2008). V zgodnjih 70-ih letih 20. stoletja so ugotovili, da so genomi tipičnih salmonel 85–100-odstotno sorodni med sabo, zato so predlagali eno samo vrsto *Salmonella choleraesuis* (Yan in sod., 2003). Izolati *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* in *S. Dublin* so sorodna skupina s skupnim antigenom O (liposaharidi O-1, 9, 12 so značilni za serološko skupino D). Primerjalna analiza genoma *S. Enteritidis* in *S. Gallinarum* je pokazala izredno podobnost med posameznimi področji genoma in tudi podobnost med številnimi otoki patogenosti, kar kaže na to, da bi bil serovar *S. Gallinarum* lahko neposredni evolucijski potomec serovara *S. Enteritidis* (Thompson in sod., 2008). Pri primerjavi izolatov, ki so bili izolirani pred eradikacijo serovara *Gallinarum* pri domači perutnini, in novejših izolatov ni bilo ugotovljenih značilnih razlik glede genske sestave. V raziskavi analizirani izolati so bili genetsko zelo homogeni, čeprav so izvirali iz različnih živali, različnih geografskih območij, iz različnih časovnih obdobj izolatije in so pripadali različnim fagotipom (Porwollik in sod., 2005).

Do spremembe genoma bakterije in s tem fagotipa lahko pride zaradi pridobitve genskega materiala preko bakteriofaga, plazmida, spremembe lipopolisaharidov ali spontane mutacije, ki spremenijo receptorska mesta za bakteriofage. Nekateri fagotipi so lahko prevladujoči na določenem področju, kar zmanjša možnost ugotavljanja vira okužbe s fagotipizacijo (Lukinmaa in sod., 1999).

Podobne značilnosti so bile ugotovljene za restriktijske vzorce PFGE. Thong in sod. (1995) poročajo, da je večina preiskovanih izolatov iz Švice in Malezije (48 od 61 izolatov), pripadala enemu restriktijskemu vzorcu PFGE. Enako ugotavljata Tsen in Lin (2001) za izolate s Tajvana, Filipinov in Malezije. Pang in sod. (2007) so izolate iz Švice in iz Malezije

primerjali z izolati s Tajvana in Nemčije. Ugotovili so, da večina izolatov pripada enemu restrikcijskemu vzorcu PFGE, označenemu z X3S3. Izolati v raziskavi so bili po izvoru različni, geografsko oddaljeni med seboj, zato restrikcijski vzorci preiskovanih izolatov kažejo na tip *S. Enteritidis*, ki je močno razširjen po svetu, kar pa ni nujno povezano s stopnjo njegove virulentnosti. Tudi Liebana in sod. (2002) poročajo, da v ZDA in Veliki Britaniji krožijo genetsko podobni kloni *S. Enteritidis*.

Serovara salmonelle, kot sta *S. Enteritidis* in *S. Gallinarum*, ki sta si genetsko zelo podobna, se lahko močno razlikujeta v patogenosti (Jones in sod., 2008; Thompson in sod., 2008). Tudi Olsen in sod. (1999) poročajo, da stopnja virulence ni povezana s podobnostjo genotipov izolatov *S. Enteritidis*.

Imunodominanten antigen na površini celice *S. Enteritidis* je O9, ki je prisoten tudi pri serovaru *Gallinarum* in *Pullorum*. Zato je mogoče, da je bil pred eradikacijo serovar *Gallinarum* dejavnik, ki je preprečeval širjenje *S. Enteritidis* pri perutnini (Porwollik in sod., 2005). Porwollik in sod. (2005) so primerjali izolate *S. Enteritidis*, stare 60 let, z izolati starimi 10 do 20 let iz različnih gostiteljev. Genomi skoraj vseh izolatov so si bili zelo podobni in niso kazali značilnih razlik v genih, ki so jih primerjali, razen dveh izolatov, ki sta se močno razlikovala od ostalih.

2.2 Okužbe s *S. Enteritidis*

2.2.1 Zgodovina okužb s *S. Enteritidis*

V mestu Frankenhausem, je Gärtner leta 1888 iz mesa krave, ki je imela drisko, izoliral bakterijo, ki jo je poimenoval *Bacillus Enteritidis*. Zaradi uživanja okuženega mesa je zbolelo 58 ljudi iz 25 družin. Bakterijo je izoliral tudi iz vranice 21 let starega človeka, ki je jedel okuženo meso in je zaradi okužbe umrl. Glasser je leta 1937 poročal o zastrupitvi 200 vojakov, ki so jedli premalo pečeno okuženo govedino (Poppe, 1999).

S. Enteritidis do sredine osemdesetih let prejšnjega stoletja ni bila pogost povzročitelj okužb in je imela manjši javnozdravstveni pomen (Poppe, 1999). V poznih osemdesetih letih 20. stol. pa je postala pomemben povzročitelj salmoneloz v Evropski uniji in drugod po svetu (Rodrigue in sod. 1990; Cogan in Humphrey, 2003; De Jong in Ekdahl, 2006). V sedemdesetih letih je bil najpogostejši povzročitelj okužb serovar *S. Typhimurium* in še pred

njim *S. Agona*. *S. Enteritidis* je bila vzrok le za manjše število okužb ljudi. Po izkoreninjenju *S. Gallinarum* in *S. Pulorum* v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja naj bi antigensko podobna *S. Enteritidis* zasedla mikronišo, ki je s tem nastala (Cogan in Humphrey, 2003; Foly in sod., 2008). *S. Enteritidis* je po številu okužb presegla *S. Typhimurium* in postala najpogostejši vzrok okužb ljudi s hrano (Guard-Petter, 2001). Prej znana kot pogosta patogena bakterija pri glodalcih je postala v osemdesetih letih resen zdravstveni problem pri človeku (Porwollik in sod., 2005). Število okužb ljudi s *S. Enteritidis* se v zadnjih petih letih v državah EU (EFSA, 2011a) in prav tako v Sloveniji (IVZ, 2009) zmanjšuje.

V Sloveniji so bile po drugi svetovni vojni, do leta 1953 zabeležene okužbe s *S. Typhi* in *S. Paratyphi*. Po letu 1953 se je epidemiološka situacija začela spreminjati. Začelo se je pojavljati več okužb z drugimi serovari, s *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* in *S. Enteritidis*, bolj poredko s *S. Typhi* in *S. Paratyphi*.

Od leta 1954 do leta 2000 je bilo ugotovljenih 188 različnih serovarov salmonеле, ki so povzročili okužbo pri človeku. Ugotovljenih je bilo 82742 primerov okužb s salmonelami. V zadnjih 20 letih je bilo več kot 90 % okužb s *S. Enteritidis*. *S. Typhi* in *S. Paratyphi* sta ugotovljeni samo pri okužbah z izvorom izven Slovenije (EFSA, 2007c).

2.2.2 Okužbe pri živalih

Salmonele so enteropatogene bakterije, ki kolonizirajo prebavni trakt, zato sta feces in z njim kontaminirano okolje, lahko vir kontaminacije (Barham in sod., 2002). So fakultativni paraziti, ki so sposobni vstopiti v različne tipe evkariontskih celic, vključno z epitelnimi in fagocitnimi celicami, znotraj njih preživeti in se razmnoževati. Za te procese so potrebni tako bakterijski kot gostiteljski celični produkti (Finlay in Falkov, 1989). Za *S. Enteritidis* je značilno, da lahko povzroča okužbe pri miših, kolonizacijo različnih tkiv pri piščancih in gastroenteritise pri človeku (Thompson in sod., 2008). Salmonele so bile izolirane pri vseh vrstah sesalcev, pticah, plazilcih, dvoživkah in ribah. Pod določenimi pogoji so vse vrste živali dovzetne za okužbo s salmonelami. Salmonele, ki niso posebej prilagojene določeni vrsti gostitelja, lahko povzročajo okužbe pri različnih vrstah živali in tudi pri človeku (Winfield in Groisman, 2003). Izid okužbe živali s salmonelami je odvisen od specifičnih lastnosti bakterije in gostitelja. Okužba lahko poteka lokalno v črevesju ali sistemsko, v večini primerov brez kliničnih znakov.

Po zaužitju okuženega živila morajo salmonele preživeti nizek pH v želodcu, antibakterijsko delovanje žolča, pomanjkanje kisika, delovanje normalne črevesne flore in njenih metabolnih produktov, črevesno peristaltiko ter kationske peptide na površini epitelnih celic s protimikrobnim delovanjem (Forshell in Wierup, 2006).

Pri perutnini lahko serovare *Salmonella enterica* subsp. *enterica* razdelimo v dve skupini: na prvo skupino manjšega števila serovarov, ki povzročajo sistemske oblike bolezni, med njimi *S. Pullorum* in *S. Gallinarum*, in drugo, s številnimi serovari, ki lahko okužijo prebavni trakt pri velikem številu različnih gostiteljev, okužba pa večinoma poteka subklinično (EFSA, 2004; Pui in sod., 2011). Pod določenimi pogoji pa lahko povzročijo tudi klinično obliko bolezni s pogini živali (Gast, 2003). Pandemija okužb s *S. Enteritidis* je povezana predvsem z uživanjem perutnine in jajc (Callaway, 2008; Stevens in sod., 2009). EFSA (2007b) prav tako poroča, da številne fagotipe *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*, ki povzročajo okužbe pri ljudeh, pogosto izolirajo iz vzorcev, odvzetih v jatah kokoši nesnic.

Klinična oblika bolezni je pri določenih vrstah živali, kot so govedo, prašiči in konji, bolj pogosta kot pri mačkah ali psih, pri katerih je klinična oblika bolezni redka. Salmonele povzročajo različno intenzivne okužbe želodca in črevesja in septikemijo, predvsem pri mladih živalih, teletih, prašičkih, žrebetih in jagenjčkih. Potek bolezni je lahko akuten, subakuten ali kroničen. Smrtnost je lahko pri mladih živalih tudi do stototna. Akuten potek bolezni spremlja povišana telesna temperatura 40,5–41,5°C, živali so deprimirane, smrt nastopi v 24–48 urah. Pri prašičih se koža obarva temnordeče do purpurnordeče, še posebej po ušesih in abdomnu. Živčni znaki so vidni pri teletih in prašičih, prisotna je lahko tudi pljučnica. Smrtnost je lahko do 100 % (Merck Manual, 2005). Subakutni enteritis se razvije na farmah, kjer je bolezen endemična, npr. pri odraslih konjih in ovcah (Merck Manual, 2005). Prašičke lahko septikemija prizadene tja do šestega meseca starosti. Pri mačkah in psih se pojavi akutna driska, ki se lahko razvije v septikemijo, viden je konjunktivitis in tudi abortusi so lahko posledica okužbe s salmonelami. Bolezen se občasno razvije pri mladih živalih in pri odraslih, oslabljenih zaradi drugih bolezni (Merck Manual, 2005).

Pri okuženih kravah se pojavijo povečana telesna temperatura, driska in zvriganje. V rejah telet lahko salmonele povzročijo izbruh okužbe z drisko in z visokim odstotkom smrtnosti. Povišana telesna temperatura in driska sta manj pogosti pri prašičih kot pri govedu in ovcah. Ovce, govedo in perutnina ponavadi ne kažejo znakov bolezni. Živali postanejo občasni ali stalni izločevalci salmonel (EFSA in ECDC, 2011b). Aktivni klicenosci izločajo med

rekonvalescenca v okolje veliko količino bakterij. Pasivni klicenosci so imune živali, pri katerih ni patoloških procesov, izločajo pa salmonеле, ki jih dobijo v okuženem okolju. Latentni klicenosci so okužene živali, ki občasno izločajo bakterije, najpogosteje v povezavi s stresnimi dejavniki, kot je transport (Stevens in sod., 2009). Vse tri oblike klicenoštva so epidemiološko pomembne, ker prispevajo k širjenju okužb. Okužene živali izločajo salmonеле določeno obdobje, včasih tudi celo življenje, v velikem številu. Izločene bakterije okužijo živali in okolje na farmi. Okužba se lahko prenese na glodalce in ostale divje živali v okolju, ki pridejo v stik s salmonelami. Pri premikih okuženih živali s farme se prenese okužba v novo, neokuženo rejo (Forshell in Wierup, 2006).

Baily in sod. (2001) poročajo, da so ugotavljali sezonsko različno število izolatov salmonel. Največ je bilo izoliranih jeseni, sledile so zimska sezona, pomlad in poletje. Epidemiološki pomen okužb rejnih živali s *S. Enteritidis* je velik, ker so okužbe pri živalih rezervoar in vir okužb ljudi.

2.2.2.1 Kokoši nesnice

Da se okužba razširi v jati, se mora *S. Enteritidis* vnesti v rejo. Raziskovalci navajajo številne vire in poti, po katerih se lahko okužba s salmonelami vnese v jato perutnine: s perutnino, glodalci, divjimi pticami, žuželkami, vodo, krmo in človekom (Heyndrickx in sod., 2007; Holt in sod., 2007; Callaway in sod., 2008), z okuženimi piščanci iz valilnice (Davies in sod., 2001; Corry in sod., 2002), s podganami, mišmi in pticami (Henzler in Opitz, 1992; Guard-Petter, 2001), s slabo očiščenimi transportnimi kletkami (Heyndrickx in sod., 2002; Heyndrickx in sod., 2007). Okužba s *S. Enteritidis* se lahko prenese vertikalno iz matičnih jat z valilnimi jajci na potomce v jate brojlerjev in v jate kokoši nesnic (Humphrey, 1989; Gast in Holt, 1998; Heyndrickx in sod., 2007). Kim in sod. (2007) ugotavljajo, da imajo okužbe vzrejnih jat s *S. Enteritidis* pomembno vlogo v epidemiologiji salmonel pri perutnini.

Hlev za rejo perutnine je okolje, polno različnih niš, ki so rezervoar patogenih bakterij, kjer se *S. Enteritidis* lahko zadržuje in tudi razmnožuje (Guard-Petter, 2001; van Belkum in sod., 2007; Callaway in sod., 2008). V hlevih so prav tako glodalci, ptice, žuželke, v katerih se *S. Enteritidis* zadržuje in razmnožuje. *S. Enteritidis* so izolirali iz gnezda in stene hleva tudi po čiščenju in razkužbi. Ker lahko preživi v okolju daljše obdobje (Pui in sod., 2011), se lahko horizontalno prenaša v rejah med živalmi, predvsem s kontaminiranimi iztrebki (Callaway in

sod., 2008), tako se že prisotna okužba na gospodarstvu po vselitvi prenese na novo jato (Davies in sod., 2001; Corry in sod., 2002; Callaway in sod., 2008). S salmonelami kontaminiran feces v hlevu je vir kontaminacije prahu, perja in jajčne lupine, ki so potem viri okužbe za druge živali v reji (Poppe in sod., 1992). K širjenju bakterij v reji pripomore slaba ventilacija in visoka vsebnost prahu (Guard-Petter, 2001).

Dovzetnost perutnine za okužbo je odvisna od imunskega statusa perutnine, na katerega vpliva več dejavnikov: starost jate, stres zaradi transporta, spremembe v okolju, druge bolezni, sprememba pH v želodcu, spremembe v črevesni mikroflori (Bailey in sod., 2001), genetska predispozicija živali oz. prisotnost receptorjev za kolonizacijo (Lillehoy in sod., 2007), serovar salmonele (Lillehoy in sod., 2007) in število bakterij (Holt in sod., 1999).

Pri en dan starih piščancih lahko okužbe s salmonelami povzročijo klinično obliko bolezni z visokim odstotkom pogina, medtem ko je pri starejših živalih potek okužbe milejši (Holt in sod., 1999; EFSA, 2004). Pri piščancih je posledica invazije salmonel v organizem sistemska okužba, ki povzroči pogin zaradi anoreksije in dehidracije (Wallis, 2006). Piščanci imajo do četrtega dneva po valjenju slabo razvit imunski sistem in so zelo dovzetni za okužbe s salmonelami. Protitelesa IgM se pojavijo četrty dan po izvalitvi. Maksimalno število dosežejo do štiridesetega dneva. Če se piščanci okužijo zelo zgodaj, je odziv imunskega sistema slab. Določen odstotek živali ostane okuženih. Okužba lahko ostane v jati tudi do nesnosti. Imunski sistem in imunski odgovor na nove okužbe je lahko trajno oslavljen (Holt in sod., 1999). Smrtnost med piščanci je od manj kot 10 % do več kot 80%. Odpornost proti okužbam se pri piščancih hitro razvija in je posledica dozorevanja makrofagov in naselitve komenzalne mikrobiote v črevesju (Wallis, 2006). Pri en dan starih piščancih, ki so bili v poskusu *per os* okuženi s *S. Enteritidis*, so v prvem tednu po okužbi ugotovili *S. Enteritidis* v slepem črevesu, jetrih in vranici. Štiri tedne po okužbi so našli salmonele le v prebavnem traktu. Skoraj polovica okuženih nesnic je po 24 tednih starosti oziroma po 4 do 6 tednih proizvodnje jajc še vedno izločala *S. Enteritidis* s fecesom, vendar je samo ena kokoš od 62 občasno nesla okužena jajca (Gast in Holt, 1998). Pri odraslih nesnicah, v poskusu okuženih s *S. Enteritidis*, so Kinde in sod. (2000) ugotovili samo milejšo obliko bolezni z rahlo drisko, ki je trajala tri dni, in posamezne pogine kokoši (EFSA, 2004). *S. Enteritidis* lahko povzroča vnetje črevesja in spremembe na jajčnikih, ki so patognomonične za okužbe s *S. Enteritidis*. Spremembe so prisotne samo pri manjšem odstotku okuženih kokoši (Guard-Petter, 2001). Okužba pri odraslih kokoših nesnicah običajno traja 16 – 22 tednov, lahko tudi več. Okužene

kokoši nesejo okužena jajca občasno (Poppe in sod., 1991). V večini primerov so okužbe odraslih živali s *S. Enteritidis* brez simptomov, lahko pa so salmonеле prisotne v jajčnikih, jajcevodih in slepih črevesih ter na lupini in v vsebini jajc. Odrasle živali pogosto ostanejo kronični klicenosci (Stevens in sod., 2009).

Serovara *S. Gallinarum* in *S. Pullorum*, povzročata sistemsko okužbo z jasno klinično sliko, kar je posledica številnih dejavnikov virulentnosti, ki omogočajo uspešno obrambo mikroorganizma pred delovanjem imunskega sistema gostitelja. Serovara *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* pa nimata genetskega zapisa za tako širok spekter dejavnikov virulentnosti, zato je njuno patogeno delovanje omejeno na okužbe pri piščancih in starejših kokoših nesnicah z oslabljenim imunskim sistemom (Wallis, 2006). Slabljenje imunskega sistema kokoši nesnic povzročajo dejavniki, ki povzročajo stres. Tako nesnice postanejo bolj dovzetne za okužbo s salmonelami med preskubljanjem (Corrier in sod., 1997). Ricke (2003), prav tako poroča, da povzroča stres zaradi prekinitve krmljenja pri nesnicah večjo dovzetnost za okužbe s *S. Enteritidis*. Živali, prikrajšane za krmo, imajo prazen prebavni trakt, kar je prav tako kritični dejavnik za povečano dovzetnost za okužbo pri miših in tudi pri piščancih. Tako okužene živali med prekinitvijo krmljenja izločajo večjo količino salmonel, okužba je bolj enakomerno razporejena skozi prebavila. *S. Enteritidis* pa je bila izolirana tudi iz jeter in vranice.

Razlike v patogenosti niso samo med serovari salmonel, temveč tudi med sevi. V jatah piščancev, okuženih z različnimi sevi *S. Enteritidis*, so raziskovalci ugotavljali različne stopnje pogina (EFSA, 2004). Večino okužb povzroča fagotip *S. Enteritidis* PT4, ki je bolj virulenten od ostalih fagotipov tega serovara (Wallis, 2006). Izolati *S. Enteritidis* PT4 z večjo toleranco za neustrezne temperature in kislo okolje, so bili bolj virulentni za miši in bolj invazivni pri piščancih (Humphrey in sod., 1996).

Večjo razširjenost salmonel v rejah s kletkami v primerjavi z drugimi vrstami reje lahko deloma pojasnimo s tem, da je v relativno velikih rejah večje število živali in večja gostota naselitve kokoši. Poleg tega se kletke tudi težko čistijo in razkužujejo, pogosto so prisotni tudi glodalci, muhe in ostali prenašalci okužbe (EFSA, 2007b). Lapuz in sod. (2007) prav tako ugotavljajo, da so podgane pomemben vir in rezevoar *S. Enteritidis* v rejah kokoši nesnic. Z metodo PFGE so ugotovili veliko podobnost med genotipi izolatov, pridobljenih iz podgan, in jajčnega melanža, pridobljenega iz jajc, pridelanih na farmah, s katerih so bile preiskovane podgane. Henzler in Opitz (1992) ugotavljata, da imajo miši velik pomen za širjenje in ohranjanje okužbe s *S. Enteritidis*. V enem bobku fecesa miši je bilo ugotovljenih $2,3 \times 10^5$

bakterij. Tudi do 60 % glodalcev, ulovljenih v bližini farm perutnine, je bilo okuženih s salmonelami (Woo, 2005).

V temeljni študiji EU o razširjenosti salmonel v jatah kokoši nesnic v letih 2004 in 2005, so bili najpogosteje izolirani serovari *S. Enteritidis*, *S. Infantis* in *S. Typhimurium*. *S. Enteritidis* je bila ugotovljena v 18,3 % (95 %, CI = 17,5 – 19,2) jat, v državah EU ali v 60 % jat, ki so bile pozitivne na salmonele. V Sloveniji je bilo v obdobju 2004 – 2005 od skupaj 98 jat nesnic 19,4 % pozitivnih jat na salmonele (95 %, CI = 15,4 – 23,8). *S. Enteritidis* je bila ugotovljena v 9,2 % (95 % CI = 6,4 – 12,7) (EFSA, 2007b), v letu 2008 v 8,7 % in v letu 2009 v 3,3 % jat kokoši nesnic (EFSA, 2011a).

2.2.2.2 Brojlerji

Okužba s *S. Enteritidis* se prenaša z valilnimi jajci vertikalno iz matičnih jat na potomce v jate brojlerjev (Oh in sod., 2010). Z okuženimi enodnevnimi piščanci se vnese okužba v rejo, kontaminira se predvsem nastil in tudi voda za pitje. Piščanci se v reji prosto gibljejo, kar prispeva k hitrejšemu širjenju okužbe (Poppe in sod., 1991a; Oh in sod., 2010). Okužba pitne vode je odvisna od vrste napajalnikov, ki se uporabljajo, in ravnanja z njimi med rastjo piščancev. Če so napajalniki dvignjeni od tal, se zmanjša možnost okužbe z nastilom oz. fecesom (Poppe in sod., 1991b).

Rose in sod. (1999) povzemajo po več avtorjih dejavnike tveganja za okužbo s salmonelami v rejah brojlerjev in navajajo: slabo higieno v reji, okužbo v predhodni jati, okužen hlev pred namestitivijo enodnevnih piščancev, okužene enodnevne piščance, kontaminirano krmo, velikost farme (več kot trije hlevi), vlažno okolje oz. spomladansko obdobje, prisotnost žuželk. Prisotnost fecesa in ostalih vlažnih organskih snovi povečuje možnost preživetja bakterije, ker to nudi varno okolje z dovolj hranilnimi snovmi za razmnoževanje (Gantois in sod., 2009).

Za okužbo so zelo dovzetni piščanci takoj po izvalitvi, razvije se vnetje rumenjakove vreče, perikarditis, nekroze in petehije na jetrih. Okuženi piščanci so deprimirani, neradi se premikajo, pogosto imajo drisko. Starejši piščanci neenako priraščajo, pogosto so zahirani. Zaradi patoloških sprememb, kot sta perikarditis in septikemija, trupe pri klanju pogosto zavržejo (Lister, 1988). Starejše živali so za okužbo manj dovzetne. Lahko se razvije vnetje črevesja in tudi sistemske okužbe, vendar je stopnja obolevnosti in smrtnosti v jati majhna.

Možna obolenja so fibrinozni peritonitis, perihepatitis, perikarditis in gnojni artritis (Oh in sod., 2010).

Bailey in sod. (2001) ugotavljajo, da sta okužba brojlerjev in širjenje okužbe v jati kompleksna zaradi številnih virov, iz katerih so izolirali salmonele. Vzorce za preiskavo so odvzeli iz 26 različnih virov in iz vseh izolirali salmonele. Od 10.740 vzorcev je bilo 973 (9,1 %) pozitivnih. Od 798 izpirkov s klavnih trupov je bilo 49 (6,1 %) pozitivnih. Od 765 transportnih škatel za piščance je bilo 389 (50,8 %) pozitivnih. Od 150 muh je bilo 28 (18,7 %) pozitivnih. Od 167 brisov obuval je bilo 20 (12 %) pozitivnih. Skupaj je bilo izoliranih 36 različnih serovarov salmonele. Avtorji prav tako ugotavljajo, da je za uspešno kontrolo okužbe na farmi potrebno izvajati ukrepe za preprečevanje vnosa povzročitelja, ki zajamejo najširšo možno število dejavnikov tveganja za nastanek okužbe. Povprečna razširjenost pri brojlerjih v rejah v EU, v letih 2005 in 2006, je bila 10,9 %, v Sloveniji pa 1,6 %. V šestih državah EU pozitivnih vzorcev na *S. Enteritidis* ni bilo ugotovljenih (EFSA, 2007a).

V letu 2008 je bila razširjenost *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* pri brojlerjih po zakolu v državah EU 3,6 %, z razlikami med državami članicami od 0,0 % do 9,6 %. V Sloveniji je bila v letu 2008 *S. Enteritidis* ugotovljena v dveh vzorcih ali pri 0,47 %. Izolirana sta bila še serovara *S. Infantis* v štirih vzorcih in *S. Saintpaul* v enem vzorcu (EFSA, 2010a).

2.2.2.3 Purani

Purani se največkrat okužijo v prvih dveh tednih po izvalitvi. Okužba se po vnosu salmonel v jato hitro širi. Tri dni stari purani so bili v raziskavi okuženi s *S. Enteritidis* PT4 in PT8. Oba fagotipa sta povzročila okužbo prebavnega trakta puranov. Nobena skupina puranov v poskusu ni kazala znakov bolezni (Hafez in Stadler, 1997). Ugotovljena majhna stopnja korelacije med serovari, izoliranimi pri človeku in pri puranih, kaže na to, da je tveganje za okužbo s salmonelami pri mesu puranov veliko manjše kot pri ostalih vrstah perutnine, vendar pa je pri nezadostni termični obdelavi ali navzkrižni kontaminaciji živil kljub temu lahko vir okužbe. Razširjenost *S. Enteritidis* pri puranih je v EU nizka in najdemo jo samo v nekaterih državah članicah (EFSA, 2008b).

V letu 2007 so bili v Sloveniji v temeljni študiji v rejah puranov iz 134 odvzetih vzorcev izolirani trije izolati *S. Enteritidis* (EFSA, 2008b). V letih 2008 in 2009 *S. Enteritidis* v rejah puranov niso ugotovili (EFSA, 2011a).

2.2.2.4 Prašiči

S. Enteritidis je običajno povezana z okužbami pri perutnini in še posebej v jatah kokoši nesnic, medtem ko so okužbe v rejah prašičev samo sporadične (Rodrigue in sod., 1990; Baggesen in sod., 2000; Davies in sod., 2004; EFSA, 2009a). Prašiči so pogosto okuženi s salmonelami subklinično in jih samo občasno izločajo s fecesom (Schwartz, 1999), so rezervoar patogenih bakterij brez vidnih znakov okužbe. Z uživanjem mesa okuženih živali se lahko okuži tudi človek (Davies in sod., 1999).

Prašiči se okužijo s salmonelami z uživanjem kontaminirane krme, neposrednim stikom z okuženimi prašiči, med namestitivijo v kontaminirane prostore za bivanje v reji in tudi v klavnici neposredno pred zakolom (Rostagno in sod., 2003; Callaway in sod., 2008). Okužbe s salmonelami so bolj pogoste v hlevih v klavnici kot na gospodarstvu, kar je verjetno posledica povečanega izločanja salmonel zaradi stresa pri nakladanju, transportu in razkladanju (Rostagno in sod., 2003). Lo Fo Wong in sod. (2002) poročajo, da serovari salmonel, najpogosteje izoliranih pri živalih, niso pogosto izolirani iz vzorcev krme, vendar so količine le-te, ki prihajajo v rejo, zelo velike, zato je tudi kontaminacija krme z majhnim številom bakterij lahko pomemben vir okužbe živali v reji.

Salmonele so bile pogosto izolirane na farmah prašičev, 20 % vzorcev iz okolja na farmah je bilo pozitivnih na salmonele. Kontaminacija okolja s salmonelami na farmi prašičev lahko vztraja tudi več let. Več let je lahko prisotna tudi subklinična okužba prašičev (Callaway in sod., 2008). Nastanek okužbe s salmonelami pri prašičih je odvisen od številnih dejavnikov, med ostalimi tudi od serovara in starosti prašičev. *S. Choleraesuis* povzroča septikemično obliko okužbe, *S. Typhimurium* in številni drugi neprilagojeni serovari pa enterokolitis.

S. Typhimurium pogosto povzroča enterokolitis pri prašičih, starih od 6 do 12 tednov, redko pa pri odraslih prašičih. Prašiči, ki so izpostavljeni stresu, so bolj dovzetni za okužbe (Wallis, 2006). Okužba se pogosto vnese v rejo s kupljenimi prašiči (Merck Manual, 2005). Patogenezo okužb s salmonelami pri prašičih lahko razdelimo na tri faze: kolonizacija črevesja, vstop v enterocite in širjenje okužbe v bezgavke in organe (Berends in sod., 1996). Organi in bezgavke so mesta, kjer se salmonele zadržujejo (Fedorka-Cray in sod., 1995). EFSA (2008b) poroča o višji prevalenci *S. Enteritidis* pri prašičih v državah vzhodne Evrope, in sicer na Madžarskem, Slovaškem, Češkem, Poljskem in v Sloveniji. Hkrati poroča tudi, da so bile v teh državah ugotovljene relativno visoke prevalence pri kokoših nesnicah in/ali pri

brojlerjih. Štirje najpogosteje ugotovljeni serovari pri prašičih v ZDA v letu 2005 so bili: *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Agona* in *S. Infantis* (Foley in sod., 2008b). V raziskavi o razširjenosti salmonel pri klavnih prašičih v EU v letih 2006 in 2007 je bil najpogosteje ugotovljen serovar *S. Typhimurium*, sledili so mu *S. Derby*, *S. Rissen*, *S. 4,[5],12:i:-* in *S. Enteritidis*. V Sloveniji je bil najpogosteje ugotovljen serovar *S. Enteritidis*, sledili so *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Saintpaul* (EFSA, 2008a). V raziskavi o razširjenosti salmonel v čredah plemenskih prašičev v letu 2008 v EU je bil najpogosteje ugotovljen serovar *S. Derby*, sledili so *S. Typhimurium*, *S. London*, *S. Infantis* in *S. Rissen*. V Sloveniji je bil najpogosteje ugotovljen serovar *S. Infantis*, sledil mu je serovar *S. Enteritidis* in potem še *S. Coeln* in *S. Stanleyville* (EFSA, 2009a).

2.2.2.5 Ovce in govedo

Pri ovcah in govedu je razširjenost salmonel zelo nizka. V ZDA poročajo o 1,5-odstotni prevalenci pri klavnih trupih jagnjet. Tudi na Islandiji je razširjenost nizka, vendar je bilo ob izbruhu salmoneloze pri ljudeh ugotovljeno, da so nosilke salmonel zdrave ovce v tonzilah, do okužbe je prišlo z uživanjem ovčjih glav (Davies in sod., 2004). Hjartardottir in sod. (2002) na Islandiji ugotavljajo pri ovcah nizko prevalenco (1,3 %) salmonel te okužbe povezujejo z divjimi pticami, ki okužujejo pašnike z veliko gostoto pašnih živali. Zelo malo je poročil o povezavi okužb pri govedu in ovcah z okužbami pri ljudeh. Ko pa je prišlo do okužb s salmonelami, ki bi lahko bile povezane z govedom ali ovcami, so bili pogosti epidemiološki dokazi o navzkrižni kontaminaciji z drugimi živali in slabi higieni pri pripravi hrane (Davies in sod., 2004).

2.2.2.6 Plazilci

Plazilci kot hišne živali predstavljajo tveganje za okužbe, saj so s salmonelami lahko okužene številne vrste plazilcev (kače, želve, kuščarji ...) (Winfield in Groisman, 2003). Okuženi so z mnogimi serovari. Stik s plazilci je vzrok za majhen delež vseh okužb ljudi s salmonelami, vendar se število okužb, katerih vir so plazilci, nenehno povečuje. Tveganje za nastanek bolezni je povezano tudi s starostjo ljudi. Največje tveganje za okužbo je pri otrocih do pet let

(Aiken in sod., 2010). Okužbe ljudi s serovarom *S. Enteritidis*, katerih vir so plazilci, niso pogoste.

Na Nizozemskem so od leta 1984 do 2007 od več kot 2200 ugotovljenih salmoneloz, katerih vir so bili plazilci, ugotovili 22 primerov okužb ljudi s *S. Enteritidis* (Bertrand in sod., 2008). V ZDA ocenjujejo, da so legvani, želve in kače vir okužbe v 3 – 5 % primerov od vseh okužb s salmonelami (Crum Cianflone, 2008). V Veliki Britaniji ocenjujejo, da so plazilci vzrok za približno 1 % okužb s salmonelami (Aiken in sod., 2010).

2.2.3 Okužbe pri ljudeh

Salmoneloze so pomemben javnozdravstveni problem, ker povzročajo velike ekonomske izgube. Potek okužb je v glavnem blag in prenehajo največkrat same, lahko pa povzročijo tudi resnejše oblike bolezni in celo smrt (de Jong in Ekdahl, 2006). Humphrey (2004), Pui in sod. (2011) poročajo, da je letno po svetu več kot 1,3 milijarde okužb s salmonelami, od tega se trije milijoni okužb končajo s smrtjo.

Sodijo, da lahko vsak serovar salmonеле povzroči okužbo pri ljudeh (Forshell in Wierup, 2006). V ZDA povzroča okužbe ljudi najmanj 150 različnih serovarov, najpogosteje sta bila ugotovljena *S. Typhimurium* in *S. Enteritidis* (Pui in sod., 2011). V Sloveniji je bilo v letu 2008 pri okužbah ljudi ugotovljenih 40 serovarov, najpogostejši je bil *S. Enteritidis*, sledila sta *S. Coeln* in *S. Typhimurium* (Tabela 2) (IVZ, 2009). Okužbe pri človeku z različnimi serovari se razlikujejo po resnosti poteka, zato imajo različen javnozdravstveni pomen. Predvsem *S. Typhimurium* in *S. Enteritidis* kakor tudi *S. Dublin*, *S. Virchow*, *S. Heidelberg* in *S. Choleraesuis* lahko povzročijo resne okužbe in tudi smrt (EFSA, 2009a). Okužbe ljudi s *S. Enteritidis* naraščajo od leta 1980 (Rodrigue in sod., 1990; Kilic in sod., 2004). Večina okužb je posledica uživanja perutnine, izdelkov iz perutnine in zlasti konzumnih jajc. Vir okužb je lahko tudi meso prašičev, goveje meso, ribe, mleko, ostala živila živalskega porekla in živila rastlinskega porekla (Crum Cianflone, 2008), kontaminirana voda in tudi neposreden stik z okuženimi živalmi (Rodrigue in sod., 1990; Callaway in sod., 2008; Crum Cianflone, 2008; Kilic in sod., 2010). Ljudje se lahko okužijo tudi v stiku z mačkami, psi, dvoživkami (Zarecki in sod. 2013), glodalci in z neposrednim stikom z okuženimi ljudmi. V ZDA ugotavljajo, da je 3–5 % okužb ljudi povezanih tudi s plazilci (Crum Cianflone, 2008).

Dejavniki tveganja za okužbe pri ljudeh so zmanjšana kislost v želodcu, uporaba antibiotikov, starost in bolezni, ki zavirajo delovanje imunskega sistema (Crum Cianflone, 2008). Za okužbo so dovzetne vse starostne kategorije, dovzетnejše so starejše osebe, otroci, ljudje z oslabljenim imunskim sistemom, podhranjeni (Bryan in Doyle, 1995; Grein in sod., 1997). Večje število okužb s salmonelami je ugotovljeno pri otrocih, vendar je to delno tudi posledica večjega števila preiskav pri obolelih otrocih in starejših kot pri ostalih starostnih skupinah (Bryan in Doyle, 1995; Banatvala in sod., 1999).

Ocenjujejo, da je za okužbo s salmonelami potrebno več kot 10^5 bakterij (Bryan in Doyle, 1995). V živilih z visoko vsebnostjo maščob, npr. čokoladi, siru, lahko že zelo majhno število bakterij povzroči okužbo (Mastroeni in Maskel, 2006; Pui in sod., 2011). Okužbo lahko povzroči tudi manjše število klic, 10^2 do 10^3 , npr. pri zmanjšani kislosti v želodcu, kar je pogosto pri dojenčkih ali pri uživanju antacidnih zdravil (Mastroeni in Maskel, 2006; Crum Cianflone, 2008). Od zaužite količine klic sta odvisni tudi inkubacijska doba in resnost poteka okužbe (Bryan in Doyle, 1995). Večje kot je začetno število klic, krajša je inkubacijska doba in resnejši je potek okužbe.

Na poti do epitelnih celic črevesja morajo salmonele preživeti nizek pH v želodcu in delovanje žolča v tankem črevesu. Okužba se razvije v distalnem delu ileuma in kolonu (Finlay in Falkov, 1989; Crum Cianflone, 2008), mesto vstopa bakterije so predvsem celice M in tudi absorpcijske celice črevesnega epitelijskega tkiva (Finlay in Falkov, 1989). Po vstopu salmonel v epitelne celice črevesa se v organizmu razvijejo: enterokolitis, bakteriemija, endovaskularne okužbe in lokalne okužbe različnih tkiv. Najbolj pogosta oblika bolezni je gastroenteritis s slabostjo, bruhanjem in drisko. Pojavijo se lahko še povečana telesna temperatura, mrzlica, bolečine v trebuhu, bolečine v mišicah in glavobol. Gastroenteritis se razvije v 6 do 72 urah po zaužitju salmonel. Simptomi običajno sami ponehajo v 2 do 7 dneh. V majhnem odstotku primerov se lahko razvijeta septikemija in okužba različnih organov in tkiv, kar ima lahko za posledico osteomielitis, pnevmonijo in meningitis (Crum Cianflone, 2008; Foley in Lynne, 2008a). Kot posledica bakteriemije lahko nastanejo tudi endovaskularne komplikacije, aterosklerotične spremembe, anevrizme, še posebej na aorti, in sicer pri 10 do 25 % ljudi z bakteremijo. Pri 5 do 10 % bolnikov se lahko razvijejo lokalne okužbe, meningitis, endokarditis, pljučnica, abscesi, empiem, osteomielitis, septični artritis (Crum Cianflone, 2008), perikarditis, apendicitis, vnetje žolčnika, intraabdominalni abscesi, okužbe sečnih poti, vnetje sklepov, abscesi v miokardu, Reiterjev sindrom (Yoshikawa in sod., 1980). Bryan in

Doyle (1995) navajata, da okuženi ljudje izločajo salmonеле 2 do 4 tedne, dojenčki in majhni otroci tudi do 7 tednov, običajno izločanje preneha v 2 do 3 mesecih. Izločanje več kot 6 mesecev je redko. V 0,5 % primerov ostanejo oboleli kronični izločevalci salmonel (Crum Cianflone, 2008).

Tabela 1: Okužbe ljudi s salmonelami od leta 2005 do leta 2008 v Sloveniji.

Table 1: Salmonella infections in humans from 2005 to 2008 in Slovenia.

	2005		2006		2007		2008	
Število prijav	1519		1519		1345		1090	
Št.okužb/100 000 prebivalcev	80,7		75,8		67,21		53,98	
Sepse	17		15		12		21	
Umrli	1		0		5		2	
Število izolacij posameznih serovarov salmonel	Serovar	Št.	Serovar	Št.	Serovar	Št.	Serovar	Št.
	<i>S. Enteritidis</i>	1366	<i>S. Enteritidis</i>	1342	<i>S. Enteritidis</i>	1176	<i>S. Enteritidis</i>	853
	<i>S. Typhimurium</i>	51	<i>S. Typhimurium</i>	56	<i>S. Typhimurium</i>	31	<i>S. Coeln</i>	69
	<i>Salmonella</i> spp.	35	<i>S. Coeln</i>	16	<i>S. Coeln</i>	25	<i>S. Typhimurium</i>	51
	<i>S. Infantis</i>	10	<i>S. iz skupine B</i>	14	<i>S. iz skupine B</i>	17	<i>S. iz skupine B</i>	26
	<i>Salmonella</i>	5	<i>S. Paratyphi B</i>	13	<i>Salmonella</i> spp.	11	<i>S. Infantis</i>	12
	<i>S. iz skupine B</i>	4	<i>Salmonella</i> spp	10	<i>S. Stanleyville</i>	11	<i>S. Thompson</i>	10
	<i>S. Coeln</i>	3	<i>S. Thompson</i>	8	<i>S. Paratyphi B</i>	10	<i>Salmonella</i> spp	9
<i>S. Give</i>	3	<i>S. Agona</i>	8	<i>S. Infantis</i>	6	<i>S. Abony</i>	7	

Vir: IVZ RS – Letna poročila o gibanju nalezljivih bolezni v Sloveniji v letih 2005 – 2008.

Source: IVZ RS – Annual reports of communicable diseases in Slovenia in the years 2005 to 2008.

Po akutni okužbi s salmonelami se pri človeku lahko razvijejo kronične bolezni, kot so lokalna vnetja v tkivih in organih, nevrolška in nevromuskularna obolenja (EFSA, 2006, Forshell in Wierup, 2006). Kot posledica akutne okužbe s hrano lahko nastanejo številne kronične posledice: ankilotični spondilitis, artropatije, bolezni ledvic, bolezni srca, nevrolške bolezni, motnje absorbcije. Dokazi, da je kronična bolezen povezana z okužbo s hrano, so včasih direktni, včasih pa samo posredni. Kronične posledice akutne oblike bolezni niso vedno neposredno povezane s povzročiteljem; imunski sistem popolnoma odstrani povzročitelja primarne bolezni, aktivacija imunskega sistema pa sproži avtoimuno reakcijo. Različni avtorji ocenjujejo, da kronične bolezni nastanejo v 2–3 % bolezni, ki so posledica okužb s hrano (Lindsay, 1997; Lindquist in sod., 2001).

Okužbe se najpogosteje pojavijo v toplejših poletnih in jesenskih mesecih, pozimi se njihovo število zmanjša. Na gibanje okužb vplivajo zunanje temperature in sezonske prehranske

navade ljudi. *S. Enteritidis* kaže izrazitejše povečanje števila okužb od drugih serovarov v poletnih mesecih in v zgodnji jeseni (Mastroeni in Maskel, 2006; EFSA, 2011b). Povečano število obolenj ljudi se pojavi z zamikom enega tedna, potem ko so bile ugotovljene najvišje zunanje temperature (IVZ, 2009).

Tudi pri dobrem sistemu poročanja število prijavljenih primerov predstavlja samo vrh ledene gore v odnosu na dejansko stanje. Salmoneloza je akutna bolezen, ki pa se večinoma konča, ne da bi bolnik obiskal zdravnika ali da bi bile pri obolelem opravljene mikrobiološke preiskave (De Jong, Ekdahl, 2006). V ZDA poročajo, da v enem letu zaradi okužb s salmonelami zbolijo 1.412.498 ljudi, od teh se jih 16.430 zdravi v bolnišnici in jih 553 umre. Salmonelle so vzrok za 30 % umrlih zaradi okužb s hrano in so drugi najpogostejši vzrok okužb s hrano, za vrsto *Campylobacter jejuni* (Mead in sod., 1999). Najbolj pogosti serovari iz perutninskega mesa so povzročili 33,3 % vseh okužb s hrano, kar povzroča neposredno in posredno ekonomsko izgubo v višini 966 milijonov dolarjev (Callaway in sod., 2008). Skupna izguba zaradi okužb s salmonelami se v ZDA ocenjuje na 2,3 do 3,6 milijard dolarjev zaradi izostanka z dela, medicinske oskrbe in smrti obolelih (Foley in Lynne, 2008a). V Evropski uniji je bilo leta 2009 108 614 primerov okužb ljudi s salmonelami ali 23,7/ 100 000 prebivalcev, od tega je 90 ljudi umrlo. Najpogosteje sta bila vzrok za okužbo serovara *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*. V letu 2009 je bila *S. Enteritidis* v EU vzrok za okužbo v 52,3 % primerov (EFSA, 2011a). V letu 2009 je bilo v Sloveniji 626 primerov okužb ljudi s salmonelami ali 30,6/100 000 prebivalcev, nihče ni umrl (IVZ, 2010).

2.2.4 *S. Enteritidis* v živilih živalskega izvora

Najpogostejši vir okužbe ljudi s salmonelami je kontaminirana hrana, kar je povezano z razširjenostjo bakterije *S. enterica* v prehranski verigi. Skoraj vsako živilo je lahko vir okužbe za ljudi. Večina (>95 %) okužb ljudi s salmonelami je posledica zaužitja kontaminirane hrane. Znanstveni odbor za veterinarske ukrepe v zvezi z javnim zdravjem (SCVMPH) ugotavlja, da so živila, ki predstavljajo tveganje za okužbo s salmonelami, predvsem surovo meso in nekateri izdelki, ki se uživajo surovi, jajca in izdelki, ki vsebujejo surova jajca, nepasterizirano mleko in nekateri izdelki iz surovega mleka, doma narejena majoneza, nepasterizirani sokovi, nakaljena semena (EFSA, 2006; Crum Cianflone, 2008). Dodatno pa k

izbruhom okužbe s salmonelami prispeva navzkrižna kontaminacija (Mastroeni in Maskel, 2006).

2.2.4.1 Kokošja jajca

Večina okužb s *S. Enteritidis* je posledica uživanja mesa perutnine, izdelkov iz mesa perutnine in še zlasti konzumnih jajc, ker se bakterije tega sevov rade naselijo v reproduktivnem traktu, kjer se jajca okužijo že v procesu formiranja (Keller in sod., 1995; Guard-Petter, 2001; Gantois in sod., 2009).

Javno zdravstveno tveganje v zvezi z okužbami s *S. Enteritidis* je primarno in domnevno sorazmerno povezano s proizvodnjo jajc, ki so okužena s *S. Enteritidis* (EFSA in ECDC, 2011a). Na podlagi številnih raziskav so ugotovili, da je bil močno povečan obseg okužb ljudi s *S. Enteritidis*, povezan z uživanjem surovih, slabo kuhanih, kontaminiranih jajc in izdelkov iz jajc (Poppe in sod., 1992; Thong in sod., 1995; Thorns, 2000; Cogan in Humphrey, 2003; Clavio in sod., 2006; Crum Cianflone, 2008; Gantois in sod., 2009; EFSA in ECDC, 2011b; Pate in sod., 2011).

Zaradi okužb jajčnikov in jajcevodov, se jajce v procesu formiranja lahko okuži s salmonelami (Humphrey, 1994; Keller in sod., 1995; Stevens, 2009). Salmonеле lahko prodrejo tudi skozi jajčno lupino zaradi fekalnega onesnaženja površine lupine (Keller in sod., 1995; Bem in sod., 2003; Stevens, 2009), pogosto jih lahko najdemo tudi na opremi za pakiranje jajc (Davies in Breslin, 2001). Gantois in sod. (2008) poročajo, da so mnenja o tem, katera pot okužbe jajc je bolj pogosta, deljena. Kontaminacija jajčne lupine s fecesom, v vagini ali v okolju ima enake posledice kot okužba jajčne vsebine v jajčniku ali v jajcevodih. Gantois in sod. (2009) navajajo, da je večja verjetnost okužbe jajca med nastajanjem v jajcevodu kot pa med prehodom salmonel skozi jajčno lupino (Cox in sod., 2000; Gantois in sod., 2009).

Kolonizacija reproduktivnega trakta je posledica splošne okužbe organizma kokoši nesnice, ki izvira iz prebavnega trakta. Za sistemsko okužbo organizma gostitelja je nujen genski zapis za tiste dejavnike patogenosti, ki bakteriji omogočajo širjenje po organizmu. Skupek genov za patogenost SPI 2 (*Salmonella pathogenicity island SPI 2*) je nosilec genskega zapisa za dejavnike patogenosti, ki sodelujejo pri sistemski okužbi organizma gostitelja (Kang in sod., 2006; Gantois in sod., 2008). Makrofagi zajamejo celice salmonel, v katerih lahko preživijo in

se z njimi prenesejo po organizmu, okužijo notranje organe kokoši nesnice, med njimi tudi reproduktivne organe, kloako in vagino. Jajcevod sestoji iz petih funkcionalnih delov: infundibulum (lijak jajcevoda), magnum (jajcevod), isthmus (ožina jajcevoda), uterus (zadrževalec jajca) in vagina (nožnica). Formiranje jajca traja okrog 24 ur. Posamezne sestavine se dodajajo, medtem ko jajce potuje skozi jajcevod do vagine. Rumenjaki so proizvod jajčnikov, v magnumu se formira beljak, v isthmusu se formirajo membrane lupine, v uterusu pa jajčna lupina, vagina pa sodeluje pri znesenju jajca (van Immerseel, 2010). Nekaj minut po znesenju jajca je kutikula nezrela in so pore še nezaščitene. Ko jajce pride na temperaturo, ki je manjša od telesne temperature kokoši (42°C), nastane v njem negativni tlak, ki bakterijam olajša prehod v jajce. Zato je jajce takoj po znesenju bolj dovzetno za okužbo kot kasneje (Gantois in sod., 2009).

Ugotovljeno je bilo, da se izolati s površine in iz vsebine jajca med sabo razlikujejo. Določene variante *S. Enteritidis* so bolj prilagojene za rast in preživetje v jajcu (Guard-Petter, 2001). Pogosto je jajčna vsebina okužena, medtem ko v fecesu kokoši okužba ni bila ugotovljena (Cox in sod., 2000; Mastroeni in Maskel, 2006).

Reproduktivni trakt kokoši nesnic izloča protimikrobne snovi. Ko *S. Enteritidis* vstopi v jajce, se mora soočiti z okoljem, v katerem ji preživetje ogrožajo številne protimikrobne substance (Guard-Petter, 2001). V beljaku se nahaja več sestavin, ki delujejo baktericidno. Lizocim je muramidaza, ki prizadene celično steno po Gramu negativnih bakterij. Ovotransferin kelatno veže železo, kar je pomemben omejitveni dejavnik za rast *S. Enteritidis* v beljaku, vendar salmonelle proizvajajo enterobaktin, siderofor, kodiran v operonu *ent*, kar jim omogoča pridobivanje železovih ionov iz beljaka (Kang in sod., 2006). Ovomukoid, cistatin in ovostatin so inhibitorji proteaz. Galinacini (β -defenzini) so peptidi s protimikrobnim delovanjem, slednjih se največ izloča v infundibulumu in vagini. Avidin je protein, ki veže biotin. V beljaku so ugotovili tudi nukleazno aktivnost, ki cepi DNK bakterije. Delovanje protimikrobnih sestavin v beljaku je bolj učinkovito pri višjih temperaturah 38–42°C kot pri 4°C. Protimikrobne sestavine beljaka so pri preprečevanju okužbe beljaka učinkovite, če koncentracija bakterij ne presega 10^3 cfu/ml (Kang in sod., 2006). Salmonela, ki se nahaja v beljaku, lahko z migracijo doseže opno rumenjaka in sam rumenjaki (Kang in sod., 2006; Gantois in sod., 2009). V rumenjaku so prisotna tako protitelesa, ki ga ščitijo pred okužbo (Guard-Petter, 2001) kot tudi hranilne snovi, ki omogočajo hitro rast in razmnoževanje mikroorganizmov.

S. Enteritidis je bolj prilagojena in bolje od drugih serovarov prenaša vpliv protibakterijskih dejavnikov v beljaku. Čeprav je jajčni beljak zelo neugodno okolje za rast, lahko *S. Enteritidis* v njem preživi daljši čas. Molekularni mehanizem, zaradi katerega je *S. Enteritidis* bolj od drugih serovarov sposobna preživeti v jajcu, še ni povsem razjasnjen (Clavio in sod., 2006; van Immerseel, 2010). Prav sposobnost, da okuži reproduktivne organe kokoši, preživi in se razmnožuje v jajcu, ima velik epidemiološki pomen pri širjenju okužbe ljudi s *S. Enteritidis*.

Tudi posamezni sestavni deli jajca predstavljajo prepreke, ki ga ščitijo pred okužbo: (1) kutikula ali povrhnjica, hidrofobni sloj, ki pokriva površino lupine in številne pore, (2) jajčna lupina, (3) opne lupine. Bakterije pa zlahka prodrejo skozi počeno jajčno lupino (Gantois in sod., 2009).

Najmočnejše okuženo mesto v jajcu je notranja stran lupine (Okamura in sod., 2001). Tudi ko kokoš ne izloča več salmonel s fecesom, je jajce lahko še vedno okuženo (Humphrey in sod., 1991a). Izpostavljenost salmonel imunskemu sistemu kokoši lahko zmanjša učinkovit prenos salmonel iz intracelularnega tkiva reproduktivnega trakta na membrane jajca, na minimum. Opna lupine se formira v istmusu, tako se *S. Enteritidis*, locirana v žlezem tkivu istmusa, med formiranjem zlahka prenese v jajce (De Buck in sod., 2003). Povezava med okužbo tkiva istmusa in sekrecijo *S. Enteritidis* v istmusu lahko pojasni, zakaj so opne lupine pogosto okužene (Humphrey in sod., 1991b; Humphrey in sod., 1996; Okamura in sod., 2001b). Lokalizacija na notranji strani jajčne lupine omogoča bakteriji, da je bolj ali manj zaščitena pred protibakterijskimi dejavniki v beljaku. V beljaku svežega jajca se *S. Enteritidis* zaradi pomanjkanja hranilnih snovi ne more razmnoževati, temveč mora prodreti do opne rumenjaka. Pri tem imajo pomembno vlogo flagele in fimbrije. S starostjo jajca postaja opna vse bolj porozna in vsebina rumenjaka dostopna bakterijam (Cogan in sod., 2004). Salmonele, ki se nahajajo na opnah lupine, pri valilnih jajcih ne okužijo razvijajočega se embria do pozne inkubacije ali celo do izvalitve. Ker okužba ne prizadene fertiliteti jajc niti odstotka izvalitve, je vertikalni prenos okužbe s *S. Enteritidis* tako uspešen (Lister, 1988; De Buck in sod., 2003). Avtorji navajajo različne deleže okuženih jajc, proizvedenih v jatah, pozitivnih na salmonele. V številnih raziskavah je bilo ugotovljeno, da je to število majhno, pogosto pod 3 % (Humphrey in sod., 1991b; Henzler in sod., 1994). Tako Mastroeni in Maskel (2006) navajata od 0,1–0,6 % okuženih jajc, lahko pa je delež okuženih jajc tudi do 10 %. Gantois in sod. (2009) navajajo 0,8 % okuženih jajc. Davies in sod. (2008) poročajo o zelo majhnem deležu okuženih jajc, in sicer manj kot 0,065 %. Kinde in sod. (1996) prav tako poročajo o različnih

deležih okuženih jajc, in sicer od 2,28 – 4,1 jajc do 14,9 – 19,1 okuženega jajca na 10.000 jajc.

Humphrey in sod. (1991b) poročajo, da je bilo v njihovi raziskavi od 5700 preiskanih jajc 32 (0,6 %) pozitivnih na *S. Enteritidis*, tri od teh so bila močno kontaminirana. Bolj pogosto je bil kontaminiran beljak kot rumenjaki. Testirali so tudi jajčno lupino in jajčno vsebino: pozitivnih je bilo 11 % vzorcev jajčne lupine in 0,9 % vzorca vsebine. Močneje kontaminirana so bila jajca, starejša od 21 dni.

V okuženi jati ni nobenih kliničnih znakov, ki bi rejcu nakazovali, da so proizvedena jajca okužena (Guard-Pettter, 2001). Razmnoževanje salmonel v jajcih, shranjenih pri sobni temperaturi (20-25°C), ne povzroča sprememb v barvi, vonju ali konsistenci jajčne vsebine (Gantois in sod., 2009). *S. Enteritidis* lahko pri visoki relativni vlagi preživi pri temperaturi hlajenja. Hitra ohladitev jajc na temperature hlajenja zavira rast *S. Enteritidis* (Howard in sod., 2007). S staranjem skladiščenih jajc se beljak spreminja in čvrstost rumenjakeve membrane slabi. Pokanje membrane omogoči dostop bakterije do hranilnih snovi v rumenjaku in intenzivno razmnoževanje.

2.2.4.2 Izdelki iz jajc

Jajca niso samo visoko biološko vredno živilo (beljakovine, vitamini A, B12, D, E ...), temveč so zelo uporabna tudi zaradi funkcionalnih lastnosti (beljakovine kot koagulant, rumenjaki kot emulgator, beljak za formiranje pene), zaradi katerih jih uporabljajo za pripravo številnih izdelkov in jedi. Zelo pogosto so samo delno ali pa sploh niso termično obdelana in se uporabljajo na različnih mestih v prehranski verigi, v industriji, restavracijah, v domačih kuhinjah (EFSA, 2010a). Po podatkih CDC so bila jajca v ZDA v letih od 1970 do 1990 najpogostejši vzrok za okužbe s salmonelami. To velja še posebej za jedi, ki so pripravljene iz surovih jajc, solate z jajci, sladoled, tiramisu itd.. Za mikrobiološko kakovost jajčnih izdelkov so pomembne kakovostne surovine in higienske razmere med ločevanjem vsebine od lupine (Bem in sod., 2003).

Razmnoževanje salmonel v rumenjaku je odvisno od temperature. Pri nižji temperaturi od 8°C se salmonele ne razmnožujejo, pri temperaturi 10°C se razmnožujejo počasi. Generacijski čas salmonel v rumenjaku je pri 10°C od 18,5 do 23 ur, pri 37°C pa 25 do 35 minut. V zamrznjenih in ne dovolj pasteriziranih izdelkih salmonele lahko preživijo in predstavljajo

nevarnost za zdravje porabnikov in za okolico, zaradi nevarnosti kontaminacije živil, ki se jim dodajajo (Bem in sod., 2003).

Leta 1987 so v bolnišnici v ZDA zboleli 404 bolniki od 965 (42 %). Devet okuženih bolnikov je umrlo. Okužili so se z obrokom iz tune in makaronov, ki jim je bila dodana majoneza, pripravljena iz jajc, okuženih s *S. Enteritidis*. V epidemiološki raziskavi je bila ugotovljena okužba s *S. Enteritidis* tudi na farmi kokoši nesnic, s katere so okužena jajca izvirala (Telzak in sod., 1990).

2.2.4.3 Meso perutnine

V industriji se za proizvodnjo perutninskega mesa uporablja več vrst perutnine: kokoši (*Gallus Gallus*), purani (*Meleagris gallopavo*), prepelice (*Coturnix coturnix*), race (*Cairina moschata* in *Anas platyrhynchos*), pegatke (*Numida meleagridis*), njihov epidemiološki pomen je v različnih regijah Evrope zaradi različnih prehranskih navad različen. Za proizvodnjo jajc se uporablja predvsem vrsta *Gallus Gallus*, pa tudi prepelice in race (EFSA, 2004).

Mikroflora perutninskega mesa in izdelkov je odvisna od postopkov s perutnino pred zakolom, med njim in ravnanja z mesom po zakolu. Okužba v reji živali je odvisna od načina reje in od zaščitnih ukrepov, ki se izvajajo (EFSA, 2004). Perutnina je zelo dovzetna za vplive okolice, v kateri se nahaja. Salmonеле so prisotne predvsem v slepem črevesu, hitro se razmnožujejo in dosežejo koncentracijo do 10^8 salmonel/g vsebine črevesja ter se izločajo s fecesom (Bem in sod., 2003). Soliman in sod. (2009) poročajo, da stres zaradi prekinitve krmljenja in izpostavljanje visokim temperaturam okolja povečata dovzetnost tkiv prebavnega trakta za kolonizacijo s *S. Enteritidis*. Visoke temperature okolja vplivajo na spremembe v mukozni sluznici prebavil. Proteini, ki se izločajo ob stresu zaradi povišane temperature in ostalih stresorjev iz okolja, lahko delujejo kot receptorji za pritrditev patogenov na sluznico. Povečuje se število bakterij iz družine *Enterobacteriaceae* in anaerobov in zmanjšuje se število laktobacilov. Živali, pozitivne na salmonеле, imajo med zakolom veliko število bakterij v prebavilih in posledično na površini klavnega trupa (zaradi fekalne kontaminacije kože, dlak ali perja) (Bryan in Doyle, 1995). Okužene živali vstopajo v proizvodnjo mesa, kjer prihaja do navzkrižne kontaminacije. Mikroflora izdelkov iz perutninskega mesa je zelo podobna mikroflori klavnih živali, pogosto so prisotne bakterijske vrste iz rodov

Campylobacter in *Salmonella* (Bem in sod., 2003). Pri skubljenju lahko pride do poškodb in odstranitve epidermisa. Tako postane koža idealen medij za pričvrstitev mikroorganizmov. Koža na vratu je statistično značilno bolj kontaminirana s salmonelami kot koža s trebuha (Kotula in Davis, 1999). Struktura mišičnega in vezivnega tkiva postaja labilna in vsebuje vse več vode, tkiva slabijo tudi postmortalne glikolitične spremembe, pH mišic na okončinah je med 6,3 in 6,5. Spremembe v tkivu omogočajo hitro razmnoževanje mikroorganizmov na površini in vse lažje prodiranje v globlje sloje mišičnega tkiva (Bem in sod., 2003). Meso kokoši nesnic, ki so zaklane po zaključku nesnosti, je pogosto bolj okuženo od mesa brojlerjev zaradi starosti jate, oslabiljenega imunskega sistema starejših kokoši, pogoste navzkrižne kontaminacije klavnih trupov, zaradi tehničnih lastnosti opreme, ki je prilagojena za uporabo klavne linije za brojlerje (EFSA, 2010a). V zamrznjenem perutninskem mesu postanejo prevladujoče vrste psihrofilni mikroorganizmi. *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella* spp. zamrzovanje preživijo. Odtajanje zamrznjenega mesa predstavlja higiensko tveganje. Preko izcejenega soka lahko patogeni mikroorganizmi okužijo opremo, pribor in ljudi. Še posebej je ta problem pereč v kuhinjah (Bem in sod., 2003).

2.2.4.4 Meso prašičev

Reja prašičev ni zaprt sistem, temveč je izpostavljen okužbam s salmonelami, ki se v rejo lahko vnesejo z okuženo krmo, z nakupom živali, s pticami, z muhami, glodalci (Lo Fo Wong in sod., 2002). Med transportom so prašiči izpostavljeni številnim stresnim dejavnikom, kot so hrup, sprememba okolja, večja gostota naseljenosti, sprememba temperature okolja, trajanje transporta, mešanje prašičev iz različnih boksov. Živali, ki jim je pred zakolom odvzeta krma, so lahko nosilci večjega števila patogenih mikroorganizmov, ker daje tako stanje v črevesju patogenim mikroorganizmom selektivno prednost pred nepatogenimi mikroorganizmi (Galland, 1997). Stres zaradi ravnanja s prašiči med transportom lahko prispeva k povečanemu izločanju salmonel po prispetju v klavnico. Med transportom v klavnico se prašiči okužijo zaradi povečanega izločanja salmonel okuženih prašičev ali zaradi kontaminacije kamionov, ki niso bili ustrezno očiščeni in razkuženi. Kamioni so lahko vir okužbe tako za klavnice kot tudi za druge reje prašičev (Rajkowski in sod., 1998; Hurd in sod., 2002; Lo Fo Wong in sod., 2002). Okužba prašičev v hlevih klavnice je bolj pogosta kot na farmah (Rostagno in sod., 2003). Hlevi v klavnici se čistijo običajno enkrat ali dvakrat na

dan, tako da prašiči pridejo v stik s fecesom drugih prašičev. Počitek v hlevih klavnice prašičem omogoča, da si opomorejo od posledic transporta. Dlje ko ostanejo prašiči v hlevih, večja je možnost okužbe, kar ima za posledico večji odstotek pozitivnih klavnih trupov (Lo Fo Wong in sod., 2002). V poskusu je bilo ugotovljeno, da se prašiči lahko okužijo že po dveh urah bivanja v okuženih boksih (Hurd in sod., 2002). Prašiči so običajno v hlevih v klavnici 3–4 ure, okužba s salmonelami pa se lahko razširi po telesu prašiča v nekaj urah (Fedorka-Cray in sod., 1995).

Rossel in sod. (2009) so ugotovili, da je kontaminacija klavnega trupa neposredno povezana s kontaminacijo kože pri živih prašičih (EFSA, 2010b). Pri obdelavi prašičev na klavni liniji izvira kontaminacija od najmanj enega vira, kot so: žival sama, predhodno zaklane živali, oprema klavnice, delavci klavnice (Lo Fo Wong in sod., 2002). Delež pozitivnih klavnih trupov je po garanju večji, če je temperatura bazenske vode pod 61°C v primerjavi s temperaturo med 61–62°C, ker se poveča število salmonel, ki preživijo v bazenski vodi (Lo Fo Wong in sod., 2002)

Umazana oprema za odstranjevanje dlak in poliranje bistveno prispevata k skupni kontaminaciji klavnega trupa. Pri odstranjevanju dlak s klavnega trupa lahko pride zaradi mehničnega delovanja lopatk stroja za odstranjevanje dlak do iztiskanja fecesa, do kontaminacije površine trupa in opreme, ki je potem vir kontaminacije za naslednje klavne trupe. Po odstranjevanju dlak se površina klavnega trupa ožge, kar stopnjo kontaminacije zmanjša, vendar v kožnih gubah in naravnih odprtinah (npr. v ušesih, dlačnih foliklih ...) bakterije preživijo. Evisceracija trupa in odstranitev jezika, grla, požiralnika, sapnika, pljuč je lahko, zaradi prisotnosti velikega števila bakterij, pomemben vir kontaminacije trupa (Lo Fo Wong in sod., 2002).

EFSA (2010b) ugotavlja, da je bilo v letu 2008 v EU 7,1 % okužb ljudi s salmonelami povezanih z uživanjem mesa prašičev, od tega je bilo 12,2 % okužb s *S. Typhimurium* in 2,2 % s *S. Enteritidis*. V vzhodni Evropi je razširjenost *S. Enteritidis* pri prašičih višja kot v ostalih delih EU (EFSA, 2010b).

2.3 Epidemiološke metode za preučevanje okužb s salmonelami

Namen epidemioloških raziskav je pridobivanje dodatnih informacij o okužbah (Lindquist in sod., 2001), da bi bolje razumeli, preprečevali in obvladovali širjenje nalezljivih bolezni pri

živalih in človeku. Le-te so namreč lahko resen javnozdravstveni problem, saj nekatere močno, druge pa manj vplivajo na kakovost življenja ljudi (Patkovič-Colarič, 2004).

Z epidemiološko raziskavo želimo pridobiti podatke o vzroku epidemije, številu primerov in socioekonomskih posledicah okužb (Lindquist in sod., 2001). Toda tudi pri dobrem sistemu poročanja število prijavljenih primerov predstavlja samo vrh ledene gore v primerjavi z dejanskim stanjem. Salmoneloza je namreč akutna bolezen, ki pa se večinoma konča, ne da bi bolnik obiskal zdravnika ali da bi bile opravljene mikrobiološke preiskave pri obolelem (De Jong in Ekdahl, 2006). Potrebno je ugotoviti epidemiološko povezavo med vzrokom in posledico okužb. Tipizacija izolatov z molekularnimi metodami omogoča pridobiti laboratorijske dokaze, da so epidemiološko povezani izolati med izbruhom bolezni tudi genetsko povezani (Tenover, 1995). Rezultati tipizacije morajo biti interpretirani v povezavi z vsemi dosegljivimi epidemiološkimi podatki (Peters in sod., 2003; van Belkum in sod., 2007). Interpretacija rezultatov tipizacije izolatov, za katere ni na voljo epidemioloških podatkov, lahko privede tudi do zavajajočih zaključkov (van Belkum in sod., 2007).

Pri epidemioloških raziskavah so omejujoč dejavnik pri iskanju nastanka vira okužbe in poti širjenja pomanjkljivi podatki, in sicer: (1) razkorak med prijavljenimi primeri in dejanskim številom primerov bolezni; (2) pomanjkljivi podatki o primerih okužbe in njenem poteku; (3) pomanjkljivi podatki o stroških pri nastanku bolezni, o prijavljenih in še posebej o neprijavljenih primerih bolezni (Lindquist in sod., 2001).

Zbiranje epidemioloških podatkov poteka na več načinov: (1) s programi spremljanja nalezljivih bolezni pri živalih in ljudeh. Pri odvzemu vzorcev se evidentirajo podatki o vzorcu in populaciji, pri kateri je bil vzorec odvzet; (2) s poročanjem o posameznih okužbah ali epidemijah; (3) z epidemiološkim poizvedovanjem in raziskovanjem izbruhov okužb.

V praksi epidemiologi pri raziskovanju okužb zberejo podatke, ki se razlikujejo od dejanskega števila okužb v naravi (Bryan in Doyle, 1995; Berghold in sod., 2003; Forshell in Wierup, 2006). De Jong in Ekdahl (2006) poročata o ugotovitvah več avtorjev o razliki med številom registriranih primerov okužbe s salmonelami in dejanskim številom okužb v naravi. V Angliji je bilo v raziskavi ocenjeno, da se na vsako okužbo s salmonelami, ki je uradno potrjena, dejansko zgodi še 3,8 primera okužb (Wheeler in sod., 1999), na Nizozemskem še 13,4 (Kreijl in sod., 2006) in v ZDA kar 38,6 (Voetsch in sod., 2004; Braden, 2006; Crum Cianflone, 2008). Z zbiranjem podatkov in tipizacijo izolatov dobimo ločeni zbirki informacij, ki pa morata biti analizirani skupaj (Tenover in sod., 1995). Tipizacija ni

zamenjava za manjkajoče epidemiološke podatke, zato morajo biti rezultati tipizacije interpretirani v povezavi z vsemi dosegljivimi epidemiološkimi podatki (van Belkum in sod., 2007; Goering, 2010).

Ključno za ugotovitve o variabilnosti genoma mikroorganizma je vzpostavitev velike zbirke izolatov ($n > 100$) in podatkov o izolatih (Singh in sod., 2006; van Belkum in sod., 2007), v raziskavo mora biti vključeno tudi čim več ekoloških niš, kjer se mikroorganizme lahko najde, izolati pa morajo biti epidemiološko nepovezani (van Belkum in sod., 2007).

Možnost hitrega in zanesljivega razlikovanja med izolati je temelj epidemiološkega raziskovanja (van Belkum in sod., 2007), s katerim želimo odkriti poreklo sevov mikroorganizmov, ki so povzročili okužbo. Pri tem ni dovolj, da določimo vrsto mikroorganizma, ki je povzročil okužbo, ampak poskušamo posamezne seve tudi tipizirati, torej jim določiti lastnosti, ki jih ločujejo od drugih sevov. Učinkovito razlikovanje izolatov, povzročiteljev okužbe, pa lahko privede do ugotovitve vzroka okužbe (Yan in sod., 2003).

Genomi tipičnih salmonel so 85–100-odstotno sorodni med sabo (Yan in sod., 2003). Pri določanju razlik med izolati salmonel z molekularno tipizacijo se moramo zavedati, da izolati pripadajo isti vrsti, podvrsti in serovaru, tako da je genetska variabilnost močno omejena (van Belkum in sod., 2007).

Razlikovanje izolatov salmonel je mogoče z različnimi fenotipskimi in genotipskimi metodami. Za tipizacijo se uporabljajo diagnostične metode, ki omogočajo razlikovanje izolatov mikroorganizmov znotraj vrste. Za tipizacijo in subtipizacijo izolatov salmonel se uporabljajo serotipizacija, fagotipizacija, rezistotipizacija in molekularne metode (Yan in sod., 2003; Miljković-Selimović, 2009). Za epidemiološke raziskave okužb je pomembno, da je uporabljena metoda izvedljiva in ponovljiva, da ima dovolj veliko moč razlikovanja, da so rezultati tudi mednarodno primerljivi, da je enostavna in hitra za izvedbo ter da je cena preiskav ekonomsko sprejemljiva. Epidemiološki označevalci oz. genotipi ali tipi morajo biti čim bolj genetsko stabilni skozi daljše obdobje (van Belkum in sod., 2007).

Serotipizacija je najpogosteje uporabljana metoda za razlikovanje izolatov. Razvrščanje serovarov salmonel temelji na njihovih antigenskih lastnostih po shemi, ki sta jo utemeljila Kauffmann in White, na osnovi razlik v somatskih (O-antigen), flagelarnih (H-antigen) in kapsularnih antigenih (Vi-antigen) (Yan in sod., 2003).

Rezistotipizacija temelji na odpornosti bakterij proti antibiotikom in ima pri *S. Enteritidis* omejene možnosti razlikovanja. Večina izolatov *S. Enteritidis* je dobro občutljiva za antibiotike, ki se uporabljajo v humani in veterinarski medicini (Miljković-Selimović in sod., 2009).

Biotipizacija je ocena biokemičnih lastnosti sevov znotraj vrste (van Belkum in sod., 2007). Za biotipizacijo *S. Enteritidis* je potrebnih do 45 biokemijskih testov, ki se rutinsko uporabljajo za tipizacijo bakterij iz družine *Enterobacteriaceae* (Miljković-Selimović in sod., 2009).

Fagotipizacija je epidemiološko pomembna metoda za razlikovanje izolatov salmonel in se pogosto uporablja za tipizacijo (Baggesen in sod., 1997). Metoda temelji na selektivni dovzetnosti celice bakterije za okužbo z bakteriofagi zaradi razlik med receptorji bakteriofagov in receptorji na površini bakterijske celice. Ko je določen receptor prisoten na celici, pride do okužbe in lize celice bakterije. Z izbranim nizom bakteriofagov se izolatu določi tip. Metoda je zahtevna in se izvaja samo v določenih laboratorijih (Yan in sod., 2003). Serovar *S. Enteritidis* je eden od najbolj genetsko homogenih serovarov, tako da je razlikovanje med posameznimi izolati s fagotipizacijo za epidemiološko raziskavanje nezadostno. Metoda zahteva tudi posebne zbirke fagov, ki so dostopni samo v nekaj specializiranih laboratorijih. Metoda fagotipizacije ima tudi slabo moč razlikovanja, saj ima večina sevov v EU fagotip PT 4 in 8, ugotovljeni pa so bili tudi prehodi iz enega fagotipa v drugega (Baggesen in sod., 1997; Miljković-Selimović in sod., 2009).

Molekularne metode omogočajo razlikovanje izolatov na podlagi razlik v genomu bakterije. Genotipske metode so omogočile velik napredek v biologiji, saj omogočajo ločevanje, določanje velikosti in vizualizacijo molekul DNK. Ugotovitve so omogočile dokazovanje povezav med izolati (Goering, 2010). Za tipizacijo izolatov *S. Enteritidis* se uporabljajo metode, kot so analiza plazmidnega profila, ribotipizacija, naključno pomnoževana polimorfna DNK (RAPD), ugotavljanje profila IS 200, gelska pulzna elektroforeza (PFGE) (Tassios in sod., 1997; Miljković-Selimović in sod., 2009), analiza polimorfizma dolžine pomnoženih fragmentov (AFLP) (Kilic in sod., 2010; Liu in sod., 2011). Moč razlikovanja analize plazmidnega profila je omejena, pogosto se uporablja v kombinaciji s fagotipizacijo, boljšo moč razlikovanja ima ribotipizacija. Pri uporabi IS 200 je bilo ugotovljeno, da imajo

izolati *S. Enteritidis* veliko stopnjo genomske homogenosti. *S. Enteritidis* ima konstantna in variabilna insercijska zaporedja (IS). Metoda, ki se pogosto uporablja za ločevanje fragmentov genoma, je gelska pulzna elektroforeza (PFGE) (Basim in Basim, 2001). Z navadno elektroforezo v gelu ni bilo mogoče ločiti večjih fragmentov. Do uvedbe PFGE leta 1984 je bilo mogoče ločevati fragmente DNK do velikosti 50 Kb (Basim in Basim, 2001; Singh in sod., 2006; Gorering, 2010). Leta 1984 pa sta Schwartz in Cantor opisala metodo PFGE, ki omogoča ločevanje fragmentov DNA velikosti od nekaj kilobaznih parov (Kb) do več kot 10 megabaznih parov (Mb) in jo je mogoče uporabiti pri različnih organizmih, od virusov in bakterij do sesalcev. V postopku se po izolaciji bakterijske DNK celotni genom razreže z restrikcijskim encimom. Molekule DNK se loči z elektroforezo v gelu. S periodičnim spreminjanjem smeri električnega toka se molekule DNK pretresejo in spremenijo smer potovanja po gelu, kar omogoča ločevanje večjih molekul. Večje molekule so bolj okorne in težje spremenijo smer potovanja kot manjše molekule, zato potujejo po gelu počasneje. Po barvanju gela z etidijevim bromidom se vzorec restrikcijskih fragmentov zabeleži s kamero v UV presvetljevalniku (Basim in Basim, 2001). Pri PFGE predstavlja vzorec restrikcijskih fragmentov razdalje med posameznimi mesti cepitve DNK. Običajno je manj kot 30 pasov v velikosti od 20 do 600 kbp (van Belkum in sod., 2007). Z metodo PFGE se zajame več kot 90 % (vsota velikosti vseh fragmentov) genoma bakterije (Pang in sod., 2005; Goreing, 2010). Da metoda zazna spremembo v genetski sestavi, mora priti do spremembe na mestu cepitve DNK ali razdalje med mesti cepitve. Manjše spremembe v genomu imajo epidemiološki pomen pri organizmih, ki se širijo klonalno in kažejo manjšo stopnjo variabilnosti v genomu.

2.3.1 PFGE in njena uporabnost za tipizacijo *S. Enteritidis*

Pri tipizaciji z molekularnimi metodami sta pomembni lastnosti moč ločevanja med izolati in ponovljivost rezultatov. *S. Enteritidis* je genetsko zelo homogena, njeno širjenje je močno klonalno, z omejeno genetsko raznolikostjo (Thong in sod., 1995; Baggesen in sod., 1997; Liebana in sod., 2001; Woo, 2005; Cheong in sod., 2007; Olson in sod., 2007). Če ima vrsta bakterije ali podtip omejeno genetsko raznolikost, imajo lahko epidemiološko nepovezani izolati podoben ali neločljiv genotip (Singh in sod., 2006). Woo (2005), Kim in sod. (2008), Kang in sod. (2009) so z metodo PFGE in z restrikcijskim encimom *XbaI* našli majhne razlike

v restriksijskih vzorcih med izolati *S. Enteritidis* iz ljudi in piščancev v Koreji. Ugotovitve raziskave kažejo na veliko genetsko podobnost izolatov, zato avtorji pri epidemioloških raziskavah priporočajo kombinacijo genotipizacije in fenotipizacije. Prav tako Olson in sod. (2007) poročajo, da je *S. Enteritidis* PT13 v Kanadi genetsko zelo homogena. Izolati so si bili v več kot 97 % podobni. Pri primerjavi PT1 in PT4 so ugotavljali razlike, vendar samo v enem pasu, kar je še vedno več kot 95-odstotna podobnost.

Metoda PFGE z uporabo restriksijskega encima *XbaI* je uveljavljena kot občutljiva metoda za subtipizacijo serovarov salmonelle in so jo v epidemioloških raziskavah okužb s *S. Enteritidis* uporabili številni raziskovalci (Thong in sod., 1995; Tassios in sod., 1997; Lukinmaa in sod., 1999; Liebana in sod., 2001; Tsen in Lin, 2001; Woo, 2005; Kim in sod., 2008; Kang in sod., 2009; Akinyemi in sod., 2010; Kilic in sod., 2010; Oh in sod., 2010). Pridobljeni rezultati so ponovljivi, z dobro ločljivostjo (Thong in sod., 1995; Singh in sod., 2006). Ker PFGE omogoča ugotavljanje podobnosti med genomi posameznih izolatov, se pri epidemiološkem raziskovanju lahko odkrivajo povezave med posameznimi deli prehranske verige. Nekateri avtorji jo označujejo kot »zlati standard« za subtipizacijo serovarov salmonel (Tenover in sod., 1995, Liu in sod., 2011). Rezultati preiskav, pridobljeni z metodo PFGE, so potrdili hipotezo o prenosu salmonel z živali na človeka (Gunmundsdottir in sod., 2003).

Leibisch in Schwarz (1996) ugotavljata, da metoda PFGE omogoča boljše razlikovanje med izolati od nekaterih drugih molekularnih metod, kot so ribotipizacija, tipizacija IS-200, analiza plazmidov, in je uporabna metoda za epidemiološke raziskave *S. Enteritidis*. Delgado in sod. (2006) ugotavljajo, da metoda PFGE omogoča boljše razlikovanje med genomi kot RAPD. Uporaba obeh metod pa raven razlikovanja še povečuje.

Za povečanje moči ločevanja med izolati raziskovalci predlagajo tipizacijo z več metodami ali uporabo več restriksijskih encimov (Gunmundsdottir in sod., 2003; Kim in sod., 2008). Laconcha in sod. (2000) ugotavljajo, da je PFGE v kombinaciji s fagotipizacijo primerna metoda za tipiziranje izolatov *Salmonella enterica* in bi se lahko uporabila tudi za mednarodno preiskovanje ali spremljanje razširjenosti posameznih tipov oziroma klonov. Vendar pa Boonmar in sod. (1998) ter Thong in sod. (1995) ugotavljajo, da imajo izolati različnih fagotipov lahko enak restriksijski vzorec PFGE in obratno, sevi *S. Enteritidis* določenega fagotipa imajo lahko različne restriksijske vzorce, tako da ni korelacije med fagotipizacijo in restriksijskim vzorcem PFGE.

Lukinmaa in sod. (1999) poročajo, da je bila možnost razlikovanja med izolati *S. Enteritidis* z restrikcijskima encimoma *SpeI* in *NotI* manjša kot z encimom *XbaI*.

Restrikcijski vzorci DNK, dobljeni z restrikcijskimi encimi *BlnI* in *XbaI*, so uporabni za epidemiološko raziskavo okužb ali izbruhov bolezni zaradi okužbe s kontaminirano hrano (Murase in sod., 1995). Z encimom *XbaI* je bilo število pasov v restrikcijskem vzorcu 9 do 21 (Woo, 2005) in 12 do 19 (Kim in sod., 2008). Ločljivost (angl. DP – discriminatory power) je bila $DP = 0,921$ (Woo, 2005) in $DP = 0,8476$ (Kim in sod., 2008).

Liebana in sod. (2002) ugotavljajo, da so kriteriji, ki so jih predlagali Tenover in sod. (1995), oblikovani za interpretacijo rezultatov preiskav s PFGE pri izbruhih bolezni in niso primerni za interpretacijo rezultatov pri preiskavi zbirke izolatov *S. Enteritidis* iz virov, ki epidemiološko niso povezani. Ker je populacija *S. Enteritidis* močno klonalna, z omejeno genetsko raznolikostjo, so v raziskavi zbirke epidemiološko nepovezanih izolatov menili, da je razlika v enem pasu v restrikcijskem vzorcu dovolj za določitev različnih klonov serovara. Take razlike lahko nastanejo že z eno samo genetsko spremembo, kot je vključitev (angl. insertion) ali izguba (angl. deletion) fragmentov DNK ali pridobitve ali izgube mesta cepitve (angl. insertion sites). Enak pristop so uporabili tudi Thong in sod. (1995), Baggesen in sod. (1997), Tsen in Lin (2001), Fernanadez in sod. (2003), Pang in sod. (2005), Pang in sod. (2007).

2.4 Metode zaščite živali pred okužbami s *S. Enteritidis*

Forshell in Wierup (2006) ugotavljata, da je za uspešno kontrolo okužb s salmonelami pomembno, da se s programi monitoringa odkrijejo viri okužb in prepreči nadaljnje širjenje. Poudarjata, da salmonele niso ubikvitarne bakterije, temveč patogeni, ki se jih lahko zatre, kar je tudi potrebno storiti in vzrejati živali proste salmonel. Tudi majhno zmanjšanje števila okuženih jajc s *S. Enteritidis*, ki pridejo do potrošnika, ima za posledico zmanjšanje števila okužb pri ljudeh (Gillespie, 2005).

Dobra rejska praksa (angl. good farming practices – GFP) in dobra higienska praksa (angl. good hygienic practices – GHP) sta postopka, ki se lahko uporabita za uspešno preprečevanje okužb s salmonelami. V določenih primerih se lahko jate kokoši nesnic zaščitijo pred okužbo z zaščitnim cepljenjem (EFSA, 2004). Calaway in sod. (2008) navajajo, da se je z eradikacijo *Salmonella Gallinarum/Pullorum* sprostila mikroekološka niša, ki so jo hitro zapolnili *S.*

Enteritidis in ostali serovari. Z uporabo konkurenčne izključitve, zaščitnega cepljenja, bakteriofagov (kot prehranski dodatek) lahko zmanjšamo število okužb s salmonelami. Zelo pomembno pa je razumeti, kako delujejo, da ne pride do neželenih učinkov na mikrobnou ekologijo v prebavilih.

Na Švedskem zagotavljajo, da so reje kokoši nesnic proste salmonel. Izvajajo monitoring na salmonela v proizvodni verigi, na kritičnih kontrolnih točkah, na vseh stopnjah vzreje kokoši nesnic in brojlerjev od starih staršev do proizvodnih rej, uvožene živali in živali pred zakolom morajo biti proste salmonel, s salmonelami okužene jate uničijo (Grein in sod., 1997).

2.4.1 Biovarstveni ukrepi

Biovarstveni ukrepi so načrti in ukrepi, s katerimi se lahko prepreči, da bi se okužba z virusi, bakterijami, glivicami ali paraziti vnesla v populacijo (EFSA, 2004). Številni ukrepi, ki se lahko uporabijo za preprečitev vnosa okužbe v rejo, so tudi strošek. Stroški za opremo, sredstva za dezinfekcijo ostalih zaščitnih sredstev, testiranje in delo pomembno bremenijo ekonomičnost proizvodnje. Zato se maksimalni obseg ukrepov uporabi, kjer je vrednost proizvodnje velika ali pa so posledice okužbe s salmonelami tako hude, da je poraba sredstev upravičena, npr. pri vzrejnih jatah starih staršev (EFSA, 2004).

Vzreja živali v ločenih skupinah, brez mešanja živali iz različnih rej in različnih starosti, sistem »all-in all-out« ter dobra higienska in proizvodna praksa so postopki, s katerimi se lahko prepreči ali zmanjša možnost okužbe živali s salmonelami. Ugotovljeno je bilo, da je tveganje za okužbo s salmonelami pri prašičih s farm s kontinuirano proizvodnjo dvakrat večje kot pri prašičih s farm, ki uporabljajo sistem popolne izselitve med dvema skupinama živali. Z biovarstvenimi ukrepi je treba preprečiti tudi vnos salmonel v rejo z divjimi živalmi, opremo in obiskovalci (Forshell in Wierup, 2006).

2.4.2 Kompetitivni antagonizem

Z uravnavanjem normalne mikroflore oziroma normalnega mikroekosistema v črevesju se kontrolira rast patogene mikroflore (Doyle in Erickson, 2006; Forshell in Wierup, 2006; Callaway in sod., 2008).

Normalna flora prebavil, komenzali, lahko zaščitijo gostitelja pred kolonizacijo prebavil s patogenimi bakterijami s tekmovanjem s patogenimi mikroorganizmi za receptorje za pritrditev na epitel prebavil, za hranilne snovi in s krepitvijo imunskega odziva prebavil in izločanjem bakteriocinov (Soliman in sod., 2009).

En dan starim piščancem se z dodajanjem mešanice nepatogenih bakterij normalne črevesne flore lahko prepreči kolonizacijo črevesja s patogenimi bakterijami (Guard-Petter, 2001; Calaway in sod., 2008). Najprimernejši konkurent salmonelam pri kolonizaciji črevesnega epitela je druga vrsta salmonele (Calaway in sod., 2008).

2.4.3 Zaščitno cepljenje

Cilj zaščitnega cepljenja perutnine je preprečiti sistemsko okužbo živali in okužbo reproduktivnih organov ter zmanjšanje izločanja bakterij s fecesom ter s tem zmanjšanje kontaminacije okolja v reji, klavnega trupa in jajc (EFSA, 2004). Uvajanje programov cepljenja jat kokoši nesnic proti *S. Enteritidis* je privedlo do močnega zmanjšanja ugotovljenih primerov okužb pri ljudeh (Berthold in sod., 2003; Cogan in Humphrey, 2003) in tudi kontaminacija okolja se je po cepljenju zmanjšala (Berthold in sod., 2003). Prenosa cepnega seva na druge vrste domačih živali ali na divje živali ne moremo popolnoma izključiti, možnost prenosa lahko zmanjšamo z izvajanjem dobre rejske in higienske prakse (EFSA, 2004). V poskusih je bilo ugotovljeno, da se cepni sevi pri cepljenih živalih zadržujejo samo krajše obdobje. Tudi pri dajanju visokih doz cepiva se pri drugih živalih cepni sev ne bo zadrževal daljše obdobje (Feberwee in sod., 2001).

Programi cepljenja morajo zagotoviti, da živalski proizvodi, meso in jajca, ne bodo kontaminirani s sevi žive vakuine. Časovni razmik med cepljenjem in začetkom nesnosti mora biti dovolj dolg, da se cepni sev salmonele ne izloča več (EFSA, 2004). Zaradi uporabe vakcin pri različnih živalih so v Nemčiji izvajali program spremljanja pojava cepnih sevov pri ljudeh (Rabsch in sod., 2001). Od leta 2000 so vse seve *S. Typhimurium* in *S. Enteritidis*, izolirane pri človeku, testirali na fagotip in markerje vakcinalnih sevov. Med nekaj tisoč preiskanimi izolati niso ugotovili nobenega cepnega seva pri okužbah ljudi (EFSA, 2004). V raziskavah v rejah perutnine so po uporabi zaščitnega cepljenja tako pri uporabi žive kot inaktivirane vakuine ugotovili zmanjšanje izločanja salmonel s fecesom (Timms in sod., 1994; Linde in sod., 1997; Davies in Breslin, 2001; Feberwee in sod., 2001). Dokazano je

bilo, da je zaščitno cepljenje pri piščancih povzročilo občuten padec v stopnji in trajanju okužbe prebavnega trakta in sistemske okužbe (Barow in sod., 1991; Coope in sod., 1992; Feberwee in sod., 2001). Prav tako so Woodward in sod. (2002) v poskusnih pogojih po uporabi zaščitnega cepljenja ugotovili zmanjšanje kontaminacije jajc.

V Veliki Britaniji raziskovalci ugotavljajo, da je bilo z uvedbo zaščitnega cepljenja v rejah brojlerjev, v kombinaciji z dobro higieniko prakso in biovarstvenimi ukrepi, prekinjeno kroženje salmonel na okuženih gospodarstvih, okužba valilnic in širjenje *S. Enteritidis* (EFSA, 2004). V rejah brojlerjev se zaščitno cepljenje uporablja le redko zaradi stroškov uporabe, nezanesljivega uspeha in potrebe za zaščito proti več serovarom (ne samo *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*) ter kratke življenjske dobe brojlerjev (EFSA, 2004).

2.4.4 Razkuževanje krme

Davies in Hinton (2000) navajata, da temperatura 85°C za 2 minuti omogoča zanesljivo dekontaminacijo krme. Peletiranje zagotavlja zadostno termično obdelavo krme, razen pri močni kontaminaciji sestavin krme. Vedno pa ostaja problem rekontaminacije krme z okuženim prahom v proizvodnji, v katerem lahko okužba vztraja tudi več let (EFSA, 2004).

2.4.5 Uporaba probiotikov

Fuler in sod. (1989) poročajo, da imajo probiotiki vpliv na mikroekologijo v črevesju živali, ugodno vplivajo na odpornost živali proti boleznim prebavnega trakta, hitrost rasti in proizvodnost živali. Kot probiotiki se uporabljajo bakterije iz rodov *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* in *Saccharomyces* (EFSA, 2004). Pri piščancih se probiotikom, ki zmanjšajo možnost okužbe s salmonelami, dodajajo laktoza, fruktoza, manoza, izomaltoza, ki ugodno delujejo na razmnoževanje bifidobakterij in laktobacilov (Doyle in Erikson, 2006).

2.5 Metode zaščite ljudi pred okužbami s *S. Enteritidis*

Za učinkovito zaščito ljudi pred okužbami s salmonelami je potrebno izvajati zaščitne ukrepe v celotni prehranski verigi, za kar pa je potrebno poznavanje epidemiologije salmonel in povezav v prehranski verigi. Vsak člen, ki sodeluje v verigi, si deli odgovornost za

zmanjšanje tveganja za okužbo ljudi z živili, ker lahko salmonele kjerkoli vstopijo v prehransko verigo (Lo Fo Wong in sod., 2002).

K zmanjševanju števila okužb je potrebno v prehranski verigi pristopiti na več načinov (Forshell in Wierup, 2006; Epp, 2008). Leta 1980 je WHO predlagala nadzor nad salmonelami pri rejnih živalih, higieno pri zakolu in nadaljnji predelavi mesa in higieno pri pripravi hrane z izobraževanjem potrošnika o pripravi in porabi živil. Grein in sod. (1997) so opisali dva pristopa k zmanjševanju števila okužb ljudi z jajci: eden temelji na zagotavljanju zmanjšanja okužb pri perutnini, drugi pa na svetovanju uporabnikom o uporabi dovolj termično obdelanih jajc in uporabi pasteriziranih jajc pri pripravi ostalih živil. Priporoča se, naj se ljudje izogibajo uživanju surovih ali mehko kuhanih jajc. Občutljivi ljudje (starejši, bolni, imunsko oslabljeni), dojenčki in noseče ženske naj uživajo jajca, ki so kuhana tako, da sta beljak in rumenjak čvrsta.

Kovats in sod. (2004) ugotavljajo, da so visoke temperature okolja v času uživanja hrane pomemben dejavnik za nastanek okužb s hrano, zato je potrebno porabnike izobraževati o ravnanju pri pripravi hrane. Neupoštevanje ustreznih temperatur je vzrok za okužbo v 32 % primerov, od tega pri 25 % zaradi neprimerne temperature hranjenja hrane in priprave gotovih jedi predolgo časa pred zaužitjem. Tudi na tem področju zdravstva je temeljnega pomena zdravstvena vzgoja. Ljudi mora naučiti varovanja pred zbolevanjem za nalezljivimi boleznimi kot tudi preprečevanja ponovnega pojavljanja in širjenja le-teh. Vzgoja in svetovanje se prepletata v vseh procesih epidemiologije nalezljivih bolezni (Patkovič-Colarič, 2004).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Izolati iz živali

V raziskavo smo vključili 175 izolatov iz živali. Pridobljeni so bili v temeljnih študijah prisotnosti *S. Enteritidis* v rejah kokoši nesnic, brojlerjev, prašičev in puranov ter pri izvajanju monitoringov na prisotnost *S. Enteritidis* pri živalih in v živilih ter iz kliničnih vzorcev iz živali. Vzorci so bili odvzeti v obdobju od leta 2005 do 2010.

3.1.1 Izolati iz kokoši nesnic

V raziskavo smo uvrstili 90 izolatov iz kokoši nesnic (Tabela 2). Izolati *S. Enteritidis* pri kokoših nesnicah so bili pridobljeni pri izvajanju monitoringa na salmonеле v jatah kokoši nesnic v vzreji in proizvodnji ter preiskav bolnih in poginjenih živali v obdobju od leta 2006 do 2010. Izolati so bili pridobljeni iz vzorcev pri različnih kategorijah kokoši nesnic, kot je razvidno iz tabele 2.

3.1.2 Izolati iz brojlerjev

V raziskavo smo uvrstili 36 izolatov *S. Enteritidis* (Tabela 2), ki so bili pridobljeni, kot sledi: 18 izolatov v Temeljni študiji o razširjenosti salmonel v brojlerskih jatah kokoši *Gallus Gallus* v EU v letih 2005 in 2006 (EFSA, 2007a), 2 izolata v Temeljni študiji o razširjenosti salmonel v trupih pitovnih piščancev (EFSA, 2010a), 8 izolatov iz lastnih kontrol rejcev brojlerjev, 6 izolatov iz vzorcev mesa, odvzetih pri izvajanju lastnih kontrol v obratu, in 2 izolata iz okolja v reji brojlerjev.

3.1.3 Izolati iz puranov

V raziskavo smo uvrstili 8 izolatov iz puranov (Tabela 2). Trije izolati *S. Enteritidis* so bili pridobljeni iz vzorcev, odvzetih v Temeljni študiji o razširjenosti salmonеле v jatah puranov v EU 2006/07. Trije izolati so bili pridobljeni iz vzorcev, odvzetih ob vselitvi puranov, iz podložnega papirja, en izolat iz organov poginjenih enodnevnih puranov iz uvoza in en izolat je bil izoliran iz vzorca organov puranov, odvzetih po zakolu v klavnici.

Tabela 2: Izolati iz živali.

Table 2: The isolates obtained from animals.

Vrsta živali	Vzorec	2005	2006	2007	2008	2009	2010	SKUPAJ
nesnice	feces	-	12	7	27	11	2	59
	prah	-	-	-	10	6	-	16
	bris površine	-	-	-	1	-	-	1
	bris kloake	-	1	-	-	-	-	1
	jetra	-	1	-	1	-	-	2
	črevo	-	-	1	-	-	-	1
	jajca	-	-	-	-	1	-	1
	beljak	-	-	-	-	-	1	1
	jajčna lupina	-	-	-	-	1	-	1
	jarkice	feces	-	-	1	2	1	-
piščanci	zamrtki	-	1	-	-	-	-	1
	podložni papir	-	-	-	-	1	-	1
nesnice	kompost	-	-	-	-	1	-	1
SKUPAJ		0	15	9	41	22	3	90
purani	podložni papir	-	-	-	-	2	1	3
	meso	-	1	-	-	-	-	1
	jetra	-	1	-	-	-	-	1
	feces	-	1	2	-	-	-	3
SKUPAJ		0	3	2	0	2	1	8
noj	feces	-	-	-	1	-	-	1
	črevo	-	1	-	-	-	-	1
SKUPAJ		0	1	0	1	0	0	2
brojlerji	feces	14	9	3	-	-	-	26
	koža	-	-	-	2	-	-	2
	izkoščeno meso	-	3	3	-	-	-	6
	blato iz gnilišča	-	1	-	-	-	-	1
	blato čist.naprava	-	-	-	1	-	-	1
SKUPAJ		14	13	6	3	0	0	36
miši	organi miši	-	-	1	-	-	-	1
mestni golob	feces	-	-	1	-	2	-	3
drobnica	feces	-	-	1	-	-	-	1
prašiči	feces	-	-	-	21	-	2	23
	bezgavke	-	5	3	-	-	1	9
SKUPAJ		0	5	3	21	0	3	32
plazilci		-	-	-	-	-	2	2
Vsi izolati iz živali SKUPAJ		14	37	23	66	26	9	175

3.1.4 Izolati iz prašičev

V raziskavo smo uvrstili 32 izolatov *S. Enteritidis* iz prašičev (Tabela 2), pridobljenih v letih 2006, 2007, 2008 in 2010. Izolati pri prašičih so bili pridobljeni v raziskavi: Razširjenosti

Salmonella spp. in proti meticilinu odpornega *Staphylococcus aureus* v čredah plemenskih prašičev v letu 2008 (EFSA, 2009a) in raziskavi razširjenosti salmonel pri klavnih prašičih v EU v letu 2006 in 2007 (EFSA, 2009a). Izolati so bili pridobljeni na 3 gospodarstvih, ki redijo plemenske prašiče, in 8 gospodarstvih, ki redijo prašiče za zakol.

3.1.5 Izolati iz drugih živali

V raziskavo smo uvrstili 2 izolata iz plazilcev (piton in varan), 3 izolate iz mestnih golobov, 2 izolata iz nojev, 1 izolat iz ovce in 1 izolat iz miši (Tabela 2).

3.1.6 Izolati iz drugih vzorcev

V raziskavo smo uvrstili še 5 izolatov iz mesnih izdelkov, 3 izolate iz krme, 1 izolat iz fižola in 1 izolat iz komposta.

3.2 Izolati iz ljudi

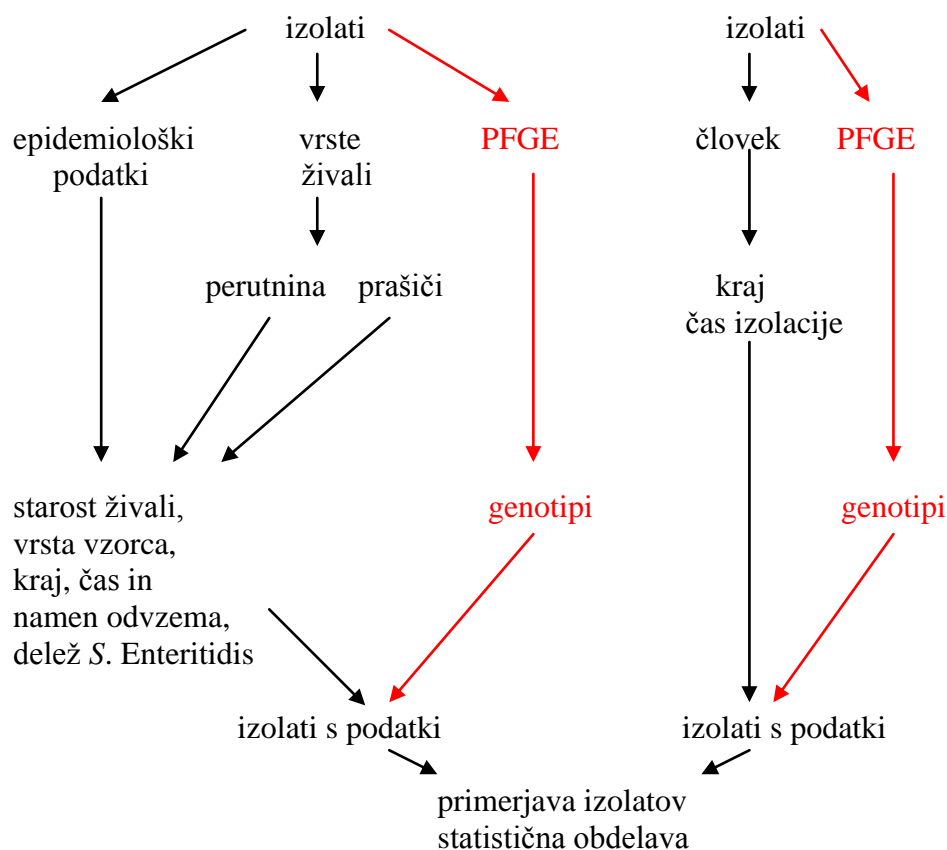
V raziskavo smo zajeli 183 izolatov iz ljudi, okuženih s *S. Enteritidis* v letih 2008 in 2009. Izolate smo pridobili iz ZZV Novo mesto, ZZV Maribor in ZZV Murska Sobota. Štirje izolati so bili iz epidemične okužbe s *S. Enteritidis* v letu 2008, šest pa iz epidemične okužbe leta 2009.

3.3 Epidemiološka analiza

Epidemiološka analiza izolatov, pridobljenih pri živalih in ljudeh, je temeljila na genotipizaciji z metodo PFGE in zbranih epidemioloških podatkih o izolatih, in sicer o vrsti vzorca, kraju odvzema, času odvzema, namenu odvzema vzorca in o ugotovljeni prevalenci *S. Enteritidis* v monitoringih in temeljnih študijah.

Na podlagi dendrograma smo določili stopnjo podobnosti med ugotovljenimi genotipi, posebej pri izolatih iz ljudi in posebej iz živali. Pri izolatih iz živali smo opravili analizo tudi po vrstah živali in po gospodarstvih, na katerih je bilo iz vzorcev izoliranih več izolatov. Pri izolatih iz ljudi smo opravili tudi analizo dveh izbruhov okužbe s *S. Enteritidis*. Rezultate

PFGE smo povezali s pridobljenimi epidemiološkimi podatki. Rezultate epidemiološke analize pri ljudeh in pri živalih smo primerjali med seboj (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz epidemiološke analize izolatov *S. Enteritidis*.
Figure 2: Schematic view of the epidemiological analysis of isolates of *S. Enteritidis*.

3.4 Genotipizacija s pulzno elektroforezo – PFGE

Izolati so bili shranjeni v epruvtkah s hranilnim agarjem pripravljenim v laboratoriju (peptocomplex (BIOLIFE) 10 g, beef extrat powder (BIOLIFE) 10g, NaCl (Merck) 5 g, agar technical (BIOLIFE) 7,5g, Na₂CO₃ (Kemika) 2g, destilirana voda 1000ml, pH po avtoklaviranju 7,5±0,2). Iz epruvtok s hranilnim agarjem smo kulture prenesli na krvni agar za oživitev kulture in na agar po Drigalskem pripravljenim v laboratoriju (agar technical (BIOLIFE) 20g, mesni bujon (Nutrient broth AOAC BIOLIFE) 20g, 10% Na₂CO₃ (Kemika) 2,5ml, destilirana voda 1000 ml, po avtiklaviranju se doda bromtimol modro (0,2% raztopina) (Kemika) 40ml, Na-tiosulfat (MERCK) 1g, laktoza (MERCK) 33g, kristal violet (Kemika) 4ml, pH po avtoklaviranju 7,6±0,2) za kontrolo čistosti. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 37°C

v aerobnih pogojih. Pri delu smo kot osnovo uporabili postopek, ki ga uporablja mreža Pulse-Net Europe, in je standardiziran ter omogoča medlaboratorijsko primerljivost rezultatov (Swaminathan in sod., 2006, EFSA, 2009c).

1.) Izolacija DNK

Čisto bakterijsko kulturo smo inkubirali preko noči. V epruvete z 2 ml pufru CSB (angl. cell suspension buffer) smo suspendirali toliko kulture s trdega gojišča, da je bila optična gostota suspenzije, izmerjena z biofotometrom (Eppendorf, Hamburg, Germany), med 1,3 in 1,4 A, valovna dolžina 600 nm.

V 2-ml epruvetko smo prenesli 400 μ l bakterijske suspenzije z dodatkom 20 μ l proteinaze K (20 mg/ml). Dodali smo 400 μ l pripravljene enoodstotne agaroze (SeaKem Gold agarose Cambrex Bio Sciences, Rockland, USA) in s pipetiranjem zelo nežno premešali. Z mešanico smo napolnili označene modelčke za čepke (po štiri jamice za vsak izolat) in pazili, da niso nastajali mehurčki. Počakali smo 15 minut, da so se čepki strdili.

V označene 50-ml centrifugirke smo dodali 3 ml pufru CLB (angl. cell lysis buffer) in 15,6 μ l proteinaze K (20 mg/ml). Z vrha modelčkov za čepke smo porezali odvečno agarozo, nato pa čepke (vse, ki so pripadali enemu izolatu salmonel) podrezali s spatulo, da so padli v centrifugirko. Spatulo smo med uporabo razkuževali v 70-odstotnem alkoholu.

Centrifugirke smo nato inkubirali 2 uri pri 54°C v vodni kopeli s stresanjem (150-175 rpm). Počasi, ob stalnem stresanju centrifugirke, smo dodali 20 ml ogrete SDV in inkubirali 15 min pri 50°C v vodni kopeli s stresanjem.

Odlili smo vso tekočino in postopek še dvakrat ponovili. Odlili smo vso tekočino, počasi (ob stalnem stresanju centrifugirke) dodali 20 ml ogretega pufru TE (tris + EDTA) in inkubirali centrifugirke 15 min pri 50°C v vodni kopeli s stresanjem in postopek ponovili še dvakrat.

2.) Cepitev DNK

Sledila je restrikcija z encimom *Xba*I. Po pripravi restriksijskega pufru (sterilna destilirana voda 90 μ l + pufer A (Roche) 10 μ l = 100 μ l) smo 100 μ l pufru prenesli v 2-ml epruvetke. Čepke, ki so bili shranjeni v epruvetah s pufrom TE, smo na spatuli nekoliko osušili s staničevino, odrezali koščke široke približno 2 mm (1-3 mm) in jih prenesli v epruvete z

restriksijskim pufrom. Vzorce smo inkubirali cca. 15 minut pri 37°C. Po končani inkubaciji smo s pipeto odstranili ves pufer in dodali po 102 µl cepitvene mešanice (SDV 90 µl + pufer 10 µl + *XbaI* (10 U/ µl) 2 µl = 102 µl). Vzorce smo inkubirali najmanj 4 ure pri 37°C.

3.) Elektroforeza

Pripravili smo 1-odstotno agarozo (SeaKem Gold, Cambrex) za elektroforezo. 1,8 g agaroze smo raztopili v 180 ml pufera 0,5 x TBE (tris-borat-EDTA) (Invitrogen, Carsbad, USA) in postavili v vodno kopel, segreto na 55–60 °C do uporabe.

Vzorce (koščke agaroznih čepkov) smo previdno položili na zobe glavnička (cca. 1 mm od roba zoba), počakali nekaj minut in jih zalili s kapljico 1-odstotne agaroze.

Sestavili smo model za gel, vstavili glavniček in vlili agarozo v model. Počakali smo približno 30 minut, da se je agarozna strdila, nato smo glavniček odstranili. Jamice smo zalili z 1-odstotno agarozo in počakali nekaj minut, da se je strdila.

Pladenj z gelom smo prenesli v celico za elektroforezo, napolnjeno z 2 l pufera 0,5 x TBE. Počakali smo, da se je temperatura gela izenačila s temperaturo pufera v celici.

Ločevanje fragmentov je potekalo v elektroforeznem aparatu BioRad CHEF-DR II (BioRad, Herkules, USA). Elektroforeza je potekala 20 ur pri 14°C, pri napetosti 6V/cm in kotu spreminjanja smeri toka 120°. Začetni pulzni čas je bil 2 sekundi, končni pa 64 sekund.

Po končani elektroforezi smo za detekcijo rezultatov gel barvali z etidijevim bromidom (10mg/ml) 30 minut. Po barvanju smo spirali gel v 500 ml DV 90 minut na tresoči podlagi. Na vsakih 30 minut smo zamenjali vodo. Po spiranju smo zabeležili rezultate v temni komori z UV presvetljevalnikom, s kamero, povezano z računalnikom. Sliko smo shranili v formatu „*tif uncompressed*“.

4.) Analiza rezultatov PFGE

Slike smo analizirali s programom BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), ki omogoča medsebojno primerjavo genotipov in izdelavo dendrogramov. Uporabili smo algoritem UPMGA (angl. unweighted pair group method using arithmetic averages) s koeficientom Dice in pri določanju položajev fragmentov dopustili 1% odstopanje. Z računalniškim programom BioNumeric smo izračunavali stopnjo podobnosti in

oblikovali dendrogram. Pri izračunu stopnje podobnosti ne upošteva števila primerov, ko je opazovana lastnost odsotna pri obeh primerjanih operativnih taksonomskih enotah, temveč le število primerov, ko je opazovana lastnost prisotna pri obeh ali vsaj pri eni operativni taksonomski enoti.

Restriksijske vzorce smo tudi vizualno analizirali. Pri posameznih pasovih, ki niso bili jasno vidni, smo po potrebi postopek cepitve ponovili.

Pri primerjavi dveh izolatov na podlagi števila skupnih pasov smo stopnjo podobnosti izračunali po formuli $F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$, ki izraža razmerje med številom skupnih fragmentov in številom vseh fragmentov. Vrednost n_x je število pasov izolata x , vrednost n_y je število pasov izolata y , vrednost n_{xy} je število skupnih pasov. Vrednost koeficienta F 1,0 pomeni, da imata izolata enak restriksijski vzorec (Thong in sod., 1995).

3.5 Kriteriji za opredelitev genotipov

Posamezni genotipi so bili določeni na podlagi razlike v enem ali več pasovih. Kriterij za razvrščanje izolatov v skupine ali gruče je bila najmanj 88-odstotna (koeficient Dice > 88 %) podobnosti med genotipi.

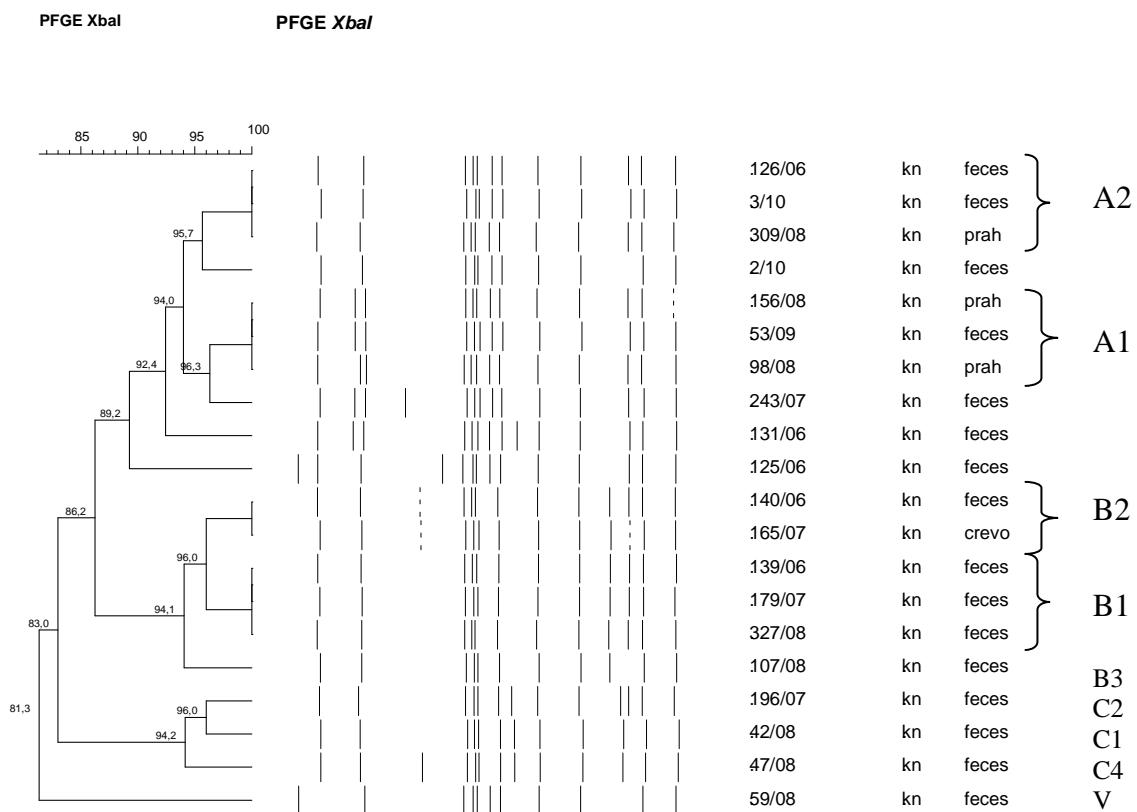
Skupine ali gruče (angl. cluster) podobnih genotipov smo označili s črkami A, B, C itn. Genotipe znotraj gruč smo označili z arabskimi številkami A1, B1, C1 itn. Genotipe, ki jih nismo uvrstili v nobeno skupino, smo označili kot neopredeljene.

Pri ugotavljanju deležev posameznih genotipov v zbirki izolatov smo pri izolatih, ki so bili pridobljeni istočasno, v isti reji in so imeli enak genotip, upoštevali samo enega. Za statistično analizo smo uporabili test hi-kvadrat z Yatesovim popravkom in Fisherjev test. Omenjeni statistični metodi smo izvedli s pomočjo računalniškega programa MediCalc – verzija 11.6.1.

4 REZULTATI

4.1 Genotipizacija izolatov iz kokoši nesnic

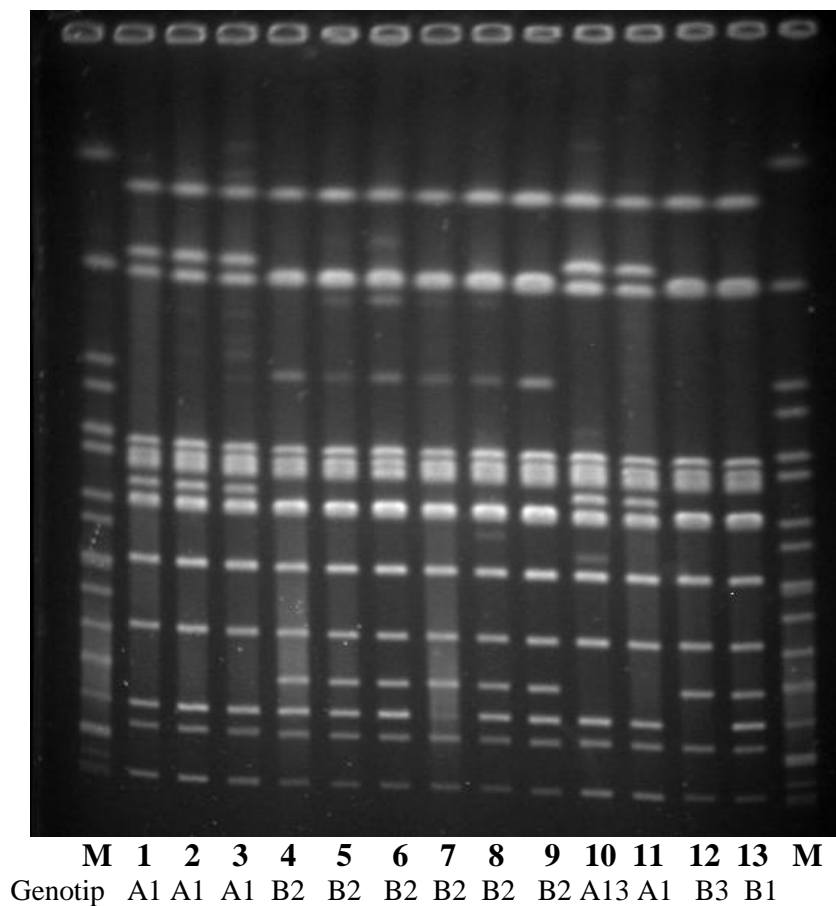
V raziskavo smo uvrstili 90 izolatov *S. Enteritidis* iz kokoši nesnic. Pri tipizaciji izolatov, smo ugotovili 16 genotipov, ki so bili sestavljeni iz 11 do 14 pasov.



Slika 3: Primerjava najpogostejših genotipov, ugotovljenih pri izolatih iz kokoši nesnic. Genetske skupine smo označili s črkami A, B in C. Posamezne genotipe smo označili z oznako genetske skupine in številko, npr. A1, B1 in C1.

Figure 3: Comparison of genotypes found in isolates from laying hens. Genetic groups are marked with the letters A, B and C. Individual genotypes are marked with genetic groups and number, eg. A1, B1 and C1.

Genotipe smo razvrstili v tri genetske skupine A, B in C na podlagi > 88 % genetske podobnosti v skupini. Genotipi v skupini A so imeli > 89 % podobnost, v skupini B > 90 % podobnost in v skupini C > 92,5 % podobnosti (Slika 3). Skupina A se je razlikovala od skupine B (A1/B1) v treh pasovih (Slika 4) ($F = 0,88$, Dk je < 85 %) in od skupine C (A1/C4) v 5 pasovih ($F = 0,81$, Dk je < 81 %) (Slika 3).



Slika 4: Na sliki je primer rezultatov genotipizacije izolatov iz kokoši nesnic (KN) in brojlerjev (B). Na sliki so prikazani genotipi izolatov: 1: 156/08 KN (genotip A1); 2: 156/08 KN (genotip A1) ; 3: 141/08 KN (genotip A1); 4: 106/08 KN (genotip B2); 5: 46/08 KN (genotip B2); 6: 23/08 B (genotip B2); 7: 165/07 KN (genotip B2); 8: 109/07 KN (genotip B2); 9: 140/08 KN (genotip B2); 10: 334/05 B (genotip A13); 11: 225/08 KN (genotip A1); 12: 72/09 KN (genotip B3); 13: 85/09 KN (genotip B3); (M) označevalec velikosti.

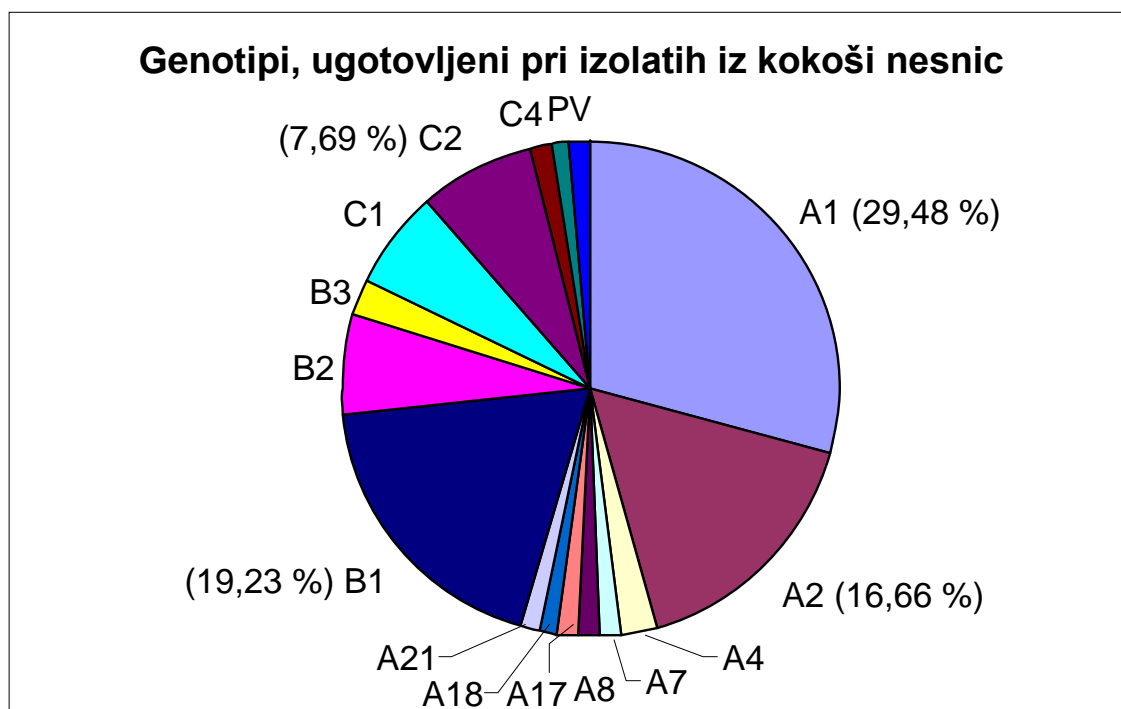
Figure 4: The figure is an example of results of genotyping isolates from laying hens (LH) and broilers (B). The figure shows the genotypes of isolates: 1: 224/08 LH (genotype A1), 2: 156/08 LH (genotype A1), 3: 141/08 LH (genotype A1) 4: 106/08 LH (genotype B2), 5: 46/08 LH (genotype B2), 6: 23/08 B (genotype B2), 7: 165/07 LH (genotype B2), 8: 109/07 LH (genotype B2); 9: 140/06 LH (genotype B2) 10: 334/05 B (genotype A13), 11: 225/08 LH (genotype A1), 12: 72/09 LH (genotype B3), 13: 85/09 LH (genotype B3); (M) size mark.

Tabela 3: Pregled števila ugotovljenih genotipov pri izolatih iz kokoši nesnic. Pri določanju deležev posameznih genotipov smo upoštevali genotipe 78 izolatov iz zbirke.

Table 3: Overview of the number of identified genotypes of the laying hens' isolates. In determining the shares of genotypes, we were selected 78 isolates from the collection.

Skupina	A								B			
	A1	A2	A4	A7	A8	A17	A18	A21	B1	B2	B3	
Genotip	A1	A2	A4	A7	A8	A17	A18	A21	B1	B2	B3	
Št. izolatov	23	13	2	1	1	1	1	1	15	5	2	
%	29,48	16,66	2,56	1,28	1,28	1,28	1,28	1,28	19,23	6,41	2,56	
Skupina	C			NEOPREDELJENI								
	C1	C2	C4	P	V							
Genotip	C1	C2	C4	P	V							
Št. izolatov	4	6	1	1	1							
%	5,12	7,69	1,28	1,28	1,28							

Najpogosteje so bili ugotovljeni genotipi A1 (23/78 ali 29,48 %), A2 (13/78 ali 16,66 %) in B1 (15/78 ali 19,23 %). Pri več kot enem izolatu so bili ugotovljeni genotipi B2 (5/78 ali 6,41 %), C1 (4/78 ali 5,12 %), C2 (6/78 ali 7,69 %) (Tabela 3; Slika 5). Genotipi A1, A2, B1 in C2 so zajeli 73,06 % izolatov iz kokoši nesnic.



Slika 5: Prikaz deležev ugotovljenih genotipov pri izolatih iz kokoši nesnic.

Figure 5: Illustration of proportions of genotypes found in isolates from laying hens.

Genotipi, ugotovljeni pri kokoših nesnicah, so bili ugotovljeni tudi pri brojlerjih (A1, A2, A21, B1 in B2), prašičih (A1, A2, B1 in C2) puranih (A1, A2 in B1), drobnici (A1), mestnih golobih (B1 in C2), nojih (B1), miših (A2), plazilcih (B1). Pet genotipov (A1, A2, A8, B1 in C2), ki so bili ugotovljeni pri kokoših nesnicah, je bilo ugotovljenih tudi pri človeku. Genotipi A4 (2/78), A7 (1/78), A8 (1/78), A17 (1/78), A18 (1/78), A21 (1/78), B3 (2/78), C1 (5/76), C4 (1/78), P (1/78) in V (1/78) so bili ugotovljeni samo pri kokoših nesnicah (Tabela 32).

4.2 Genotipizacija izolatov iz brojlerjev

V raziskavo smo uvrstili 36 izolatov iz brojlerjev (Tabela 5), pri katerih smo ugotovili 18 genotipov, ki so bili sestavljeni iz 13 do 17 pasov. Najpogosteje so bili ugotovljeni genotipi iz genetske skupine A (26/33 ali 78,78 %) (Tabela 4), katerih podobnost je večja od 88,8 % (Dk < 88,8 %). Podatki so prikazani na sliki 6, ki je v prilogi.

Tabela 4: Genotipi, ugotovljeni pri izolatih iz brojlerjev. Pri določanju deležev posameznih genotipov smo upoštevali genotipe 33 izolatov iz zbirke.

Table 4: Genotypes identified in isolates from broilers. In determining the shares of genotypes, we selected 33 isolates from the collection.

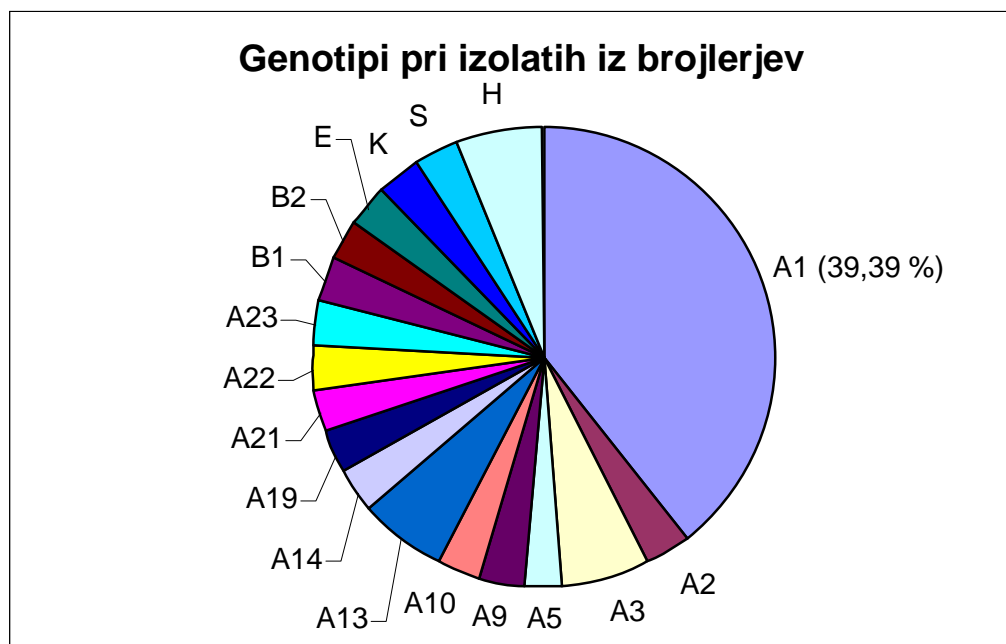
Skupina	A											
Genotip	A1	A2	A3	A5	A9	A10	A13	A14	A19	A21	A22	A23
Število izolatov	13	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1
%	39,39	3,03	6,06	3,03	3,03	3,03	6,06	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03
Skupina	B		NEOPREDELJENI									
Genotip	B1	B2	E	H	K	S						
Število izolatov	1	1	1	2	1	1						
%	3,03	3,03	3,03	6,06	3,03	3,03						

Genotipi genetske skupine A so se razlikovali v največ štirih pasovih. Genotip A1 se razlikuje v enem pasu od genotipa A2, A3, A4 in A5 ($F = 0,96$), od genotipa A23 se razlikuje v 4 pasovih ($F = 0,86$, Dk je < 88,8 %). Od genotipa E se razlikuje v šestih pasovih ($F = 0,74$, Dk je < 72,5 %), od genotipov K, S, V se razlikujejo v sedmih ali več pasovih (Dk je < 55,7 %).

Izolati iz brojlerjev so bili pridobljeni na področjih Murske Sobote, Ptuja, Maribora, Celja, Ljubljane, Pivke, Postojne in Nove Gorice. Ugotovljeni so bili vsi trije prevladujoči genotipi A1, A2 in B1. Genotip A1 je bil pridobljen na področju Ptuja, Murske Sobote, Postojne, Pivke, Ljubljane in Celja, genotip A2 pa na področju Maribora. Genotip B1 na področju Murske Sobote.

Tabela 5: Prikaz zbirke izolatov iz brojlerjev.
Table 5: Illustration of collection of the isolates from broilers.

Zap. številka	Vrsta vzorca	Oznake izolata	PFGE genotipi	Obdobje izolacije	Področje izolacije		
1	feces	296/05	A1	nov.	2005	Celje	
2	feces	305/05	A19	nov.		Celje	
3	feces	306/05	A1	nov.		Celje	
4	feces	307/05	A1	nov.		Celje	
5	feces	308/05	E	nov.		Celje	
6	feces	309/05	A3	nov.		Celje	
7	feces	321/05	A22	nov.		Ptuj	
8	feces	322/05	A21	nov.		Ptuj	
9	feces	323/05	A21	nov.		Ptuj	
10	feces	324/05	A1	nov.		Ptuj	
11	feces	325/05	A1	nov.		Ptuj	
12	feces	326/05	K	dec.		Ptuj	
13	feces	327/05	A1	dec.		Ptuj	
14	feces	334/05	A13	dec.		Maribor	
15	feces	68/06	A1	maj	2006	Ljubljana	
16	feces	138/06	A23	sept.		Postojna	
17	feces	149/06	A3	okt.		Postojna	
18	feces	150/06	A13	okt.		Postojna	
19	feces	10/06	A10	jan.		Ptuj	
20	feces	42/06	S	mar.		Nova Gorica	
21	feces	109/06	A5	julij		Celje	
22	feces	110/06	B1	julij		Murska Sobota	
23	feces	181/06	A1	nov.		Maribor	
24	feces	132/07	H	maj		2007	Postojna
25	feces	133/07	H	maj			Postojna
26	feces	204/07	A1	sep.	Pivka		
27	izkoščeno meso	92/06	A1	junij	2006	Postojna	
28	izkoščeno meso	106/06	A14	julij		Postojna	
29	izkoščeno meso	107/06	A1	julij	2007	Postojna	
30	meso piščancev	30/07	A1	feb.		Postojna	
31	meso piščancev	245/07	A1	sept.		Ljubljana	
32	meso piščancev	249/07	A1	sept.	Murska Sobota		
33	koža brojlerji	23/08	B2	jan.	2008	ni podatka	
34	koža brojlerji	87/08	A2	apr.		Maribor	
35	blato čist.naprava	88/06	A9	junij	2006	Postojna	
36	blato čist.naprava	147/08	A1	junij		Ptuj	



Slika 7: Pregled ugotovljenih genotipov pri izolatih iz brojlerjev.
Figure 7: Overview of identified genotypes in the isolates from broilers.

Najpogosteje je bil ugotovljen genotip A1 (13/33 ali 39,39 %). Genotipi A3, A13 in H so bili ugotovljeni pri dveh izolatih (Tabela 4). Ostale genotipe smo našli samo pri posameznih izolatih. Tendenca širjenja je bila pri izolatih iz brojlerjev ugotovljena samo za genotip A1. Enake genotipe kot pri brojlerjih smo ugotovili tudi pri drugih vrstah živali in pri človeku. Najpogostejši genotip pri brojlerjih (A1) smo ugotovili tudi pri kokoših nesnicah, prašičih, puranih, drobnici in človeku (Tabela 32).

4.3 Genotipizacija izolatov *S. Enteritidis* iz puranov

V raziskavo smo uvrstili 8 izolatov iz puranov (Tabela 6). Pri tipizaciji izolatov smo ugotovili 5 genotipov, ki so bili sestavljeni iz 12 do 14 pasov. Genotipa A1 in A5 se razlikujeta v enem pasu ($F = 0,96$, Dk je $>96,3$ %). Genotipa A1 in A16 se razlikujeta v dveh pasovih ($F = 0,92$, Dk je $>91,2$ %). Genotipi A1, A2, A5 in A16 imajo stopnjo podobnosti > 93 % (Dk je $>93,9$ %) (Slika 8).

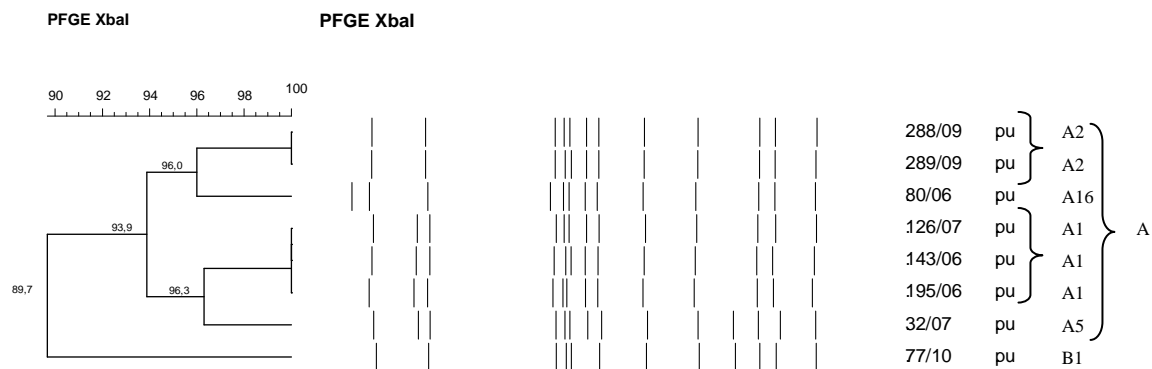
Genotip B1 se od skupine genotipov A razlikuje v treh pasovih (Dk $< 88,9$ %). Pri izolatih iz puranov smo ugotovili genotipe A1, A2 in B1, ki so bili v zbirki izolatov v raziskavi

najštevilčnejši. Ugotovili smo predvsem genotipe iz genetske skupine A: A1 (3/8), A2 (2/8), A5 (1/8) in A16 (1/8).

Tabela 6: Izolati iz puranov in ugotovljeni genotipi.
Table 6: The isolates from turkeys and identified genotypes.

Zap. št.	Vrsta vzorca	Izolat	PFGE genotip	Izvor vzorca		Čas izolacije		Območje
1	meso	80/06	A16	klavnica	-	maj	2006	Postojna
2	jetra	143/06	A1	klinika	uvoz	sept.	2006	ni podatka
3	feces	195/06	A1	reja	TŠ	dec.	2006	Ljubljana
4	feces	32/07	A5	reja	TŠ	feb.	2007	Ljubljana
5	feces	126/07	A1	reja	TŠ	maj	2007	Novo mesto
6	podložni papir	288/09	A2	reja	uvoz	okt.	2009	Novo mesto
7	podložni papir	289/09	A2	reja	uvoz	okt.	2009	Novo mesto
8	podložni papir	77/10	B1	reja	uvoz	okt.	2010	Novo mesto

Legenda: TŠ – temeljna študija
Legend: TS – A baseline study



Slika 8: Primerjava genotipov, ugotovljenih pri izolatih iz puranov. Na desni strani slike so navedene oznake izolatov, vrsta vzorca in ugotovljeni genotipi. S črko A je označena genetska skupina. Na levi strani je dendrogram z odstotkom podobnosti med genotipi.

Figure 8: Comparison of genotypes found in isolates from turkeys. On the right side of the figure, there are types of samples and identified genotypes. The genetic group is marked with letter A. On the left side of the figure, there is the dendrogram with the percentage of relatedness between genotypes.

Genotip A1 je bil ugotovljen tudi pri kokoših nesnicah, brojlerjih in pri drobnici. Genotip A2 je bil ugotovljen tudi v jajcih, v organih miši, pri jarkicah, kokoših nesnicah, brojlerjih,

prašičih, v tatarskem biftku in fižolu (Tabela 32). Genotipi A1, A2 in B1 so bili ugotovljeni pri enodnevnih puranih iz uvoza ob vselitvi.

4.4 Genotipizacija izolatov iz prašičev

V raziskavo smo uvrstili 32 izolatov iz prašičev (Tabeli 7 in 8). Izolirani so bili iz fecesa v reji prašičev in iz bezgavk klavnih trupov prašičev. Večina izolatov *S. Enteritidis* pri prašičih je bila iz območja Murske Sobote. Pri plemenskih prašičih so bila gospodarstva okužena z več sevi *S. Enteritidis* hkrati, njihovi genotipi pa se razlikujejo.

Tabela 7: Prikaz števila izolatov *S. Enteritidis*, pridobljenih pri prašičih, po vrsti vzorca in letu izolacije.
Table 7: List of isolates of *S. Enteritidis* isolated from pigs by type of sample and year of isolation.

Kategorija prašičev	Vzorec	2006	2007	2008	2010	SKUPAJ
Plemenski prašiči	feces	0	0	21	2	23
Pitovni prašiči	bezgavke	5	3	0	1	9
SKUPAJ		5	3	21	3	32

Pri tipizaciji izolatov iz prašičev je bilo ugotovljenih 19 genotipov, ki so bili sestavljeni iz 12 (B1) do 20 (F) pasov.

Genotipi sevov *S. Enteritidis*, izolirani na gospodarstvih za rejo plemenskih prašičev, so se razlikovali med gospodarstvi. Na gospodarstvu P1 so bili ugotovljeni genotipi genetske skupine D (genotipi D1-D7), B (genotip B5) ter genotipa U in T. Na gospodarstvu P2 je bil ugotovljen genotip B1 in na gospodarstvu P3 genotip C2. Pri primerjavi izolatov iz fecesa plemenskih prašičev in bezgavk pitovnih prašičev smo ugotovili, da je od 19 ugotovljenih genotipov obema kategorijama prašičev skupen samo genotip B1. Genotipa B5 in B1 se razlikujeta v dveh pasovih ($F = 0,92$, Dk je $< 91,8\%$).

Genotip C2 se razlikuje od genotipa A1 v 4 pasovih ($F = 0,84$, Dk je $< 85,2\%$). Genotip F se razlikuje od A1 v 7 pasovih ($F = 0,78$, Dk je $< 74,5\%$).

Genotipi O, T, in U pripadajo skupini izolatov, ki je genetsko bolj oddaljena od bolj razširjenih genotipov. Stopnja podobnosti je manjša kot 56% in pripadajo drugemu klonalnemu kompleksu (Dk $< 56,8\%$). Podatki so prikazani na sliki 9, ki je v prilogi.

Tabela 8: Seznam izolatov *S. Enteritidis*, izoliranih pri prašičih.
Table 8: List of the isolates of *S. Enteritidis* isolated from pigs.

Zap. št.	Oznaka izolata	Vzorec	PFGE genotip	Izvor	Študija	Kategorija prašičev	Datum izolacije		Izvor izolata			
1	188/06	bezgavke	A12	klavnica		pitaneč 80 kg	nov.	2006	MS			
2	189/06	bezgavke	F	klavnica	TŠPit	pitaneč 80 kg	nov.	2006	MS			
3	204/06	bezgavke	0	klavnica	TŠPit	pitaneč 80 kg	dec.	2006	MS			
4	205/06	bezgavke	A1	klavnica	TŠPit	pitaneč 82 kg	dec.	2006	MS			
5	197/06	bezgavke	A2	klavnica	TŠPit	ni podatka	dec.	2006	KR			
6	162/07	bezgavke	B1	klavnica	TŠPit	pitaneč 86 kg	jun.	2007	MS			
7	163/07	bezgavke	B1	klavnica	TŠPit	pitaneč 64,2 kg	jun.	2007	NM			
8	33/07	bezgavke	A11	klavnica	TŠPit	pitaneč 107 kg	feb.	2007	CE			
9	61/08	feces	D6		21	TŠPl	pl. laktacija	mar.	2008	MS		
10	62/08	feces	D7		21	TŠPl	pl. breje	mar.	2008	MS		
11	63/08	feces	B5		21	TŠPl	pl. breje	mar.	2008	MS		
12	64/08	feces	B5		21	TŠPl	pl. breje	mar.	2008	MS		
13	65/08	feces	D8		21	TŠPl	pl. odstavljen	mar.	2008	MS		
14	66/08	feces	B5		21	TŠPl	pl. odstavljen	mar.	2008	MS		
15	67/08	feces	D1		21	TŠPl	pl. odstavljen	mar.	2008	MS		
16	68/08	feces	D4		21	TŠPl	pl. odstavljen	mar.	2008	MS		
17	69/08	feces	D5		21	TŠPl	pl. breje	mar.	2008	MS		
18	70/08	feces	B5		21	TŠPl	pl. breje	mar.	2008	MS		
19	72/08	feces	D3		21	TŠPl	pool lab.	mar.	2008	MS		
20	73/08	feces	B5		21	TŠPl	pool lab.	mar.	2008	MS		
21	75/08	feces	D2		21	TŠPl	pool lab.	mar.	2008	MS		
22	74/08	feces	U		21	TŠPl	pool lab.	apr.	2008	MS		
23	71/08	feces	T		gosp.	21	TŠPl	pool gosp.	maj	2008	MS	
24	76/08	feces	B1			30	TŠPl	mladice	mar.	2008	MS	
25	77/08	feces	B1			30	TŠPl	mladice	mar.	2008	MS	
26	78/08	feces	B1			30	TŠPl	mladice	mar.	2008	MS	
27	79/08	feces	B1			gosp.	30	TŠPl	pl. breje	mar.	2008	MS
28	92/08	feces	C2				33	TŠPl	pl. breje	apr.	2008	MS
29	93/08	feces	C2				gosp.	33	TŠPl	pl. breje	apr.	2008
30	145/10	feces	B1	-		-	-		2010	MB		
31	177/10	bezgavke	C3	-	-	-		2010	MB			
32	193/10	feces	B5	-	-	-		2010	MB			

Legenda: CE – Celje; KR – Kranj; MB – Maribor; MS – Murska Sobota; NM – Novo mesto; gosp. – gospodarstvo, TŠ Pit – Temeljna študija pri prašičih pitancih; TŠPl – Temeljna študija pri plemenskih prašičih; pl. – plemenska svinja; pool lab. – združeni vzorci v laboratoriju; pool gosp. – združeni vzorci na gospodarstvu.

Legend: CE – Celje; KR – Kranj; MB – Maribor; MS – Murska Sobota; NM – Novo mesto; gosp. – holding; TŠ Pit – A baseline study in fattening pigs; TŠPl – A baseline study in breeding pigs; pl. – sow; pool lab. – samples pooled in laboratory; pool gosp. – samples pooled on holding.

Tabela 9: Genotipi, ugotovljeni pri izolatih iz prašičev. Pri določanju deležev posameznih genotipov smo upoštevali genotipe 24 izolatov iz zbirke.

Table 9: Genotypes identified in the isolates from pigs. In determining the percentages of individual genotypes, we considered 24 isolates from the collection.

Skupina	A				B		C		D			
Genotip	A1	A2	A11	A12	B1	B5	C2	C3	D1	D2	D3	D4
Število izolatov	1	1	1	1	4	2	1	1	1	1	1	1
%	4,16	4,16	4,16	4,16	16,6	8,33	4,16	4,16	4,16	4,16	4,16	4,16
Skupina	D				NEOPREDELJENI							
Genotip	D5	D6	D7	F	O	T	U					
Število izolatov	1	2	1	1	1	1	1					
%	4,16	8,33	4,16	4,16	4,16	4,16	4,16					

Genotip B5 in genotipi iz genske skupine D so bili ugotovljeni samo pri prašičih. Pri genski skupini D je bilo ugotovljenih 7 genotipov (D1 – D7), ki se med seboj razlikujejo v 1 do 5 pasov (Dk > od 88,1 %). Vsi genotipi genske skupine D so bili ugotovljeni pri izolatih, pridobljenih na enem gospodarstvu. Genotip A1 je bil ugotovljen pri izolatu iz bezgavke prašiča piganca. Izolat pripada večji skupini izolatov, ki so bili pridobljeni iz kokoši nesnic, brojlerjev, puranov, drobnice, mletega mesa, fižola, komposta in pri človeku (Tabela 32). Genotip A2 je bil ugotovljen pri izolatu iz bezgavke prašiča piganca. Izolat pripadeta večji skupini izolatov z genotipom A2, v kateri so še izolati, pridobljeni iz jajc, kokoši nesnic, brojlerjev, puranov, organov miši, v tatarskem biftku in pri človeku (Tabela 32). Genotip B1 smo ugotovili pri 7 izolatih, ki so izvirali iz ene reje plemenskih prašičev in rej pitovnih prašičev. Izolata pripadeta večji skupini izolatov B1, v kateri so tudi izolati iz jajc, kokoši nesnic, brojlerjev, puranov, nojev, mestnih golobov, plazilcev ljudi (Tabela 32). Delež genotipov v zbirki izolatov iz prašičev, ki so bili ugotovljeni samo pri prašičih, je bil 70,83 %.

4.5 Genotipizacija izolatov iz ostalih živali

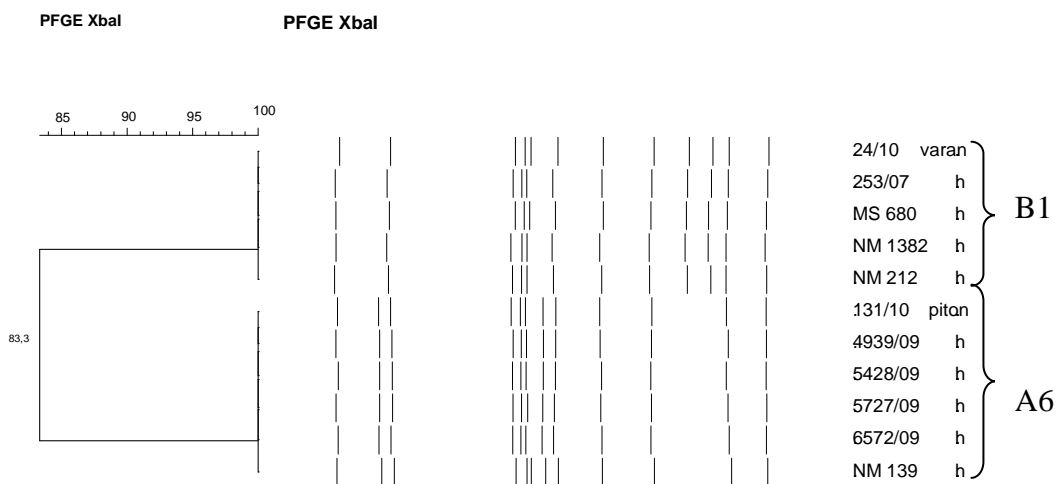
4.5.1 Plazilci

V raziskavo smo uvrstili dva izolata iz plazilcev (piton in varan), pri katerih smo ugotovili genotipa A6 in B1. Genotipa se razlikujeta v 4 pasovih (F = 0,83, Dk je < 83,3 %)

(Slika 10).

Genotip A6 smo ugotovili pri izolatu iz pitona. Enak genotip smo ugotovili tudi pri petih izolatih iz ljudi. Pri izolatih iz drugih živali genotipa A6 nismo ugotovili. Pri izolatu iz varana smo ugotovili genotip B1, ki je bil ugotovljen pri izolatih iz živali in iz ljudi.

Genotip A6 je bil ugotovljen pri izolatih iz ljudi, ki so izviralni s področja Novega mesta, Murske Sobote in Maribora. Genotipa A6 in B1 sta geografsko razširjena v Sloveniji.



Slika 10: Primerjava genotipov, ugotovljenih pri izolatih iz plazilcev in ljudi.

Izvor izolatov smo označili s pl – plazilci in h – človek.

Figure 10: Comparison of genotypes found in isolates from reptiles and humans. The origin of isolates was characterized by pl – reptiles and h – man.

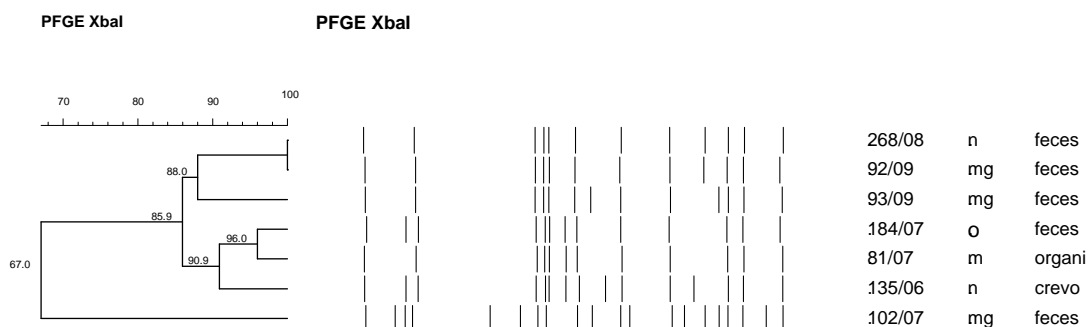
4.5.2 Mestni golobi, noji, ovca in miš

V raziskavo smo uvrstili tri izolate iz mestnih golobov, dva izolata iz nojev, en izolat iz ovce in en izolat iz miši (Tabela 10).

Tabela 10: Izolati iz mestnih golobov, nojev, ovce in miši.

Table 10: Isolates from pigeons, ratites, sheep and mice.

	Izvor vzorca	Oznaka izolata	Genotip
1	mestni golob	102/07	M
2	mestni golob	92/09	B1
3	mestni golob	93/09	C2
4	noj	135/06	A14
5	noj	268/08	B1
6	ovca	81/07	A1
7	miš	184/07	A2



Slika 11: Primerjava genotipov, ugotovljenih pri izolatih iz mestnih golobov, nojev, ovce in miši. Izvor izolatov smo označili z o – ovca; n – noj; mg – mestni golob; m – miš.
Figure 11: Comparison of genotypes found in the isolates from pigeons, ratites, sheep and mice. The origin of the isolates was characterized by o – sheep; n – ratites; mg – pigeons; m – mice.

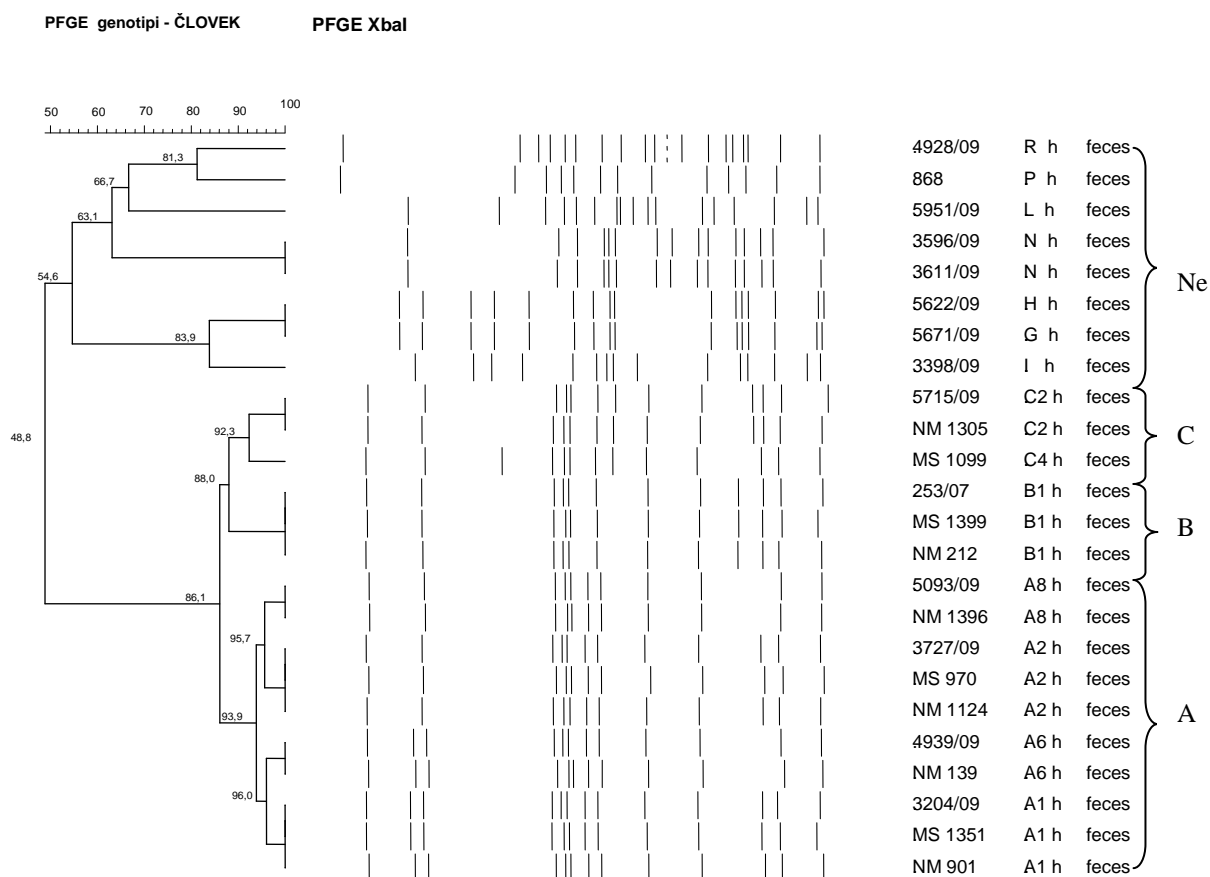
Pri izolatih iz mestnih golobov smo ugotovili genotipe B1, C2 in M, pri izolatih iz nojev, genotipa A14 in B1, pri izolatu iz ovce genotip A1 in pri izolatu iz miši genotipa A2 (Slika 11). Genotipe A1, A2, B1 in C2 smo ugotovili tudi pri izolatih iz živali in ljudi.

4.6 Genotipizacija izolatov iz ljudi

V raziskavo smo uvrstili 183 izolatov iz ljudi. Štirje izolati so iz epidemije okužbe v letu 2008 in šest iz epidemije v letu 2009. V izračun razširjenosti posameznih genotipov smo uvrstili 174 izolatov iz ljudi.

Tabela 11: Skupine in genotipi, ugotovljeni pri izolatih iz ljudi.
Table 11: Clusters and genotypes found in the isolates from humans.

Skupina	A						B			C	
Genotip	A1	A2	A6	A8	A15	A20	B1	B6	B7	C2	C5
Število izolatov	38	61	5	8	1	2	39	2	3	6	1
%	21,84	35,06	2,87	4,60	0,57	1,09	22,41	1,15	1,72	3,44	0,57
Skupina	NEOPREDELJENI										
Genotip	G	I	L	N	R	Z					
Število izolatov	2	1	1	2	1	1					
%	1,15	0,57	0,57	1,15	0,57	0,57					



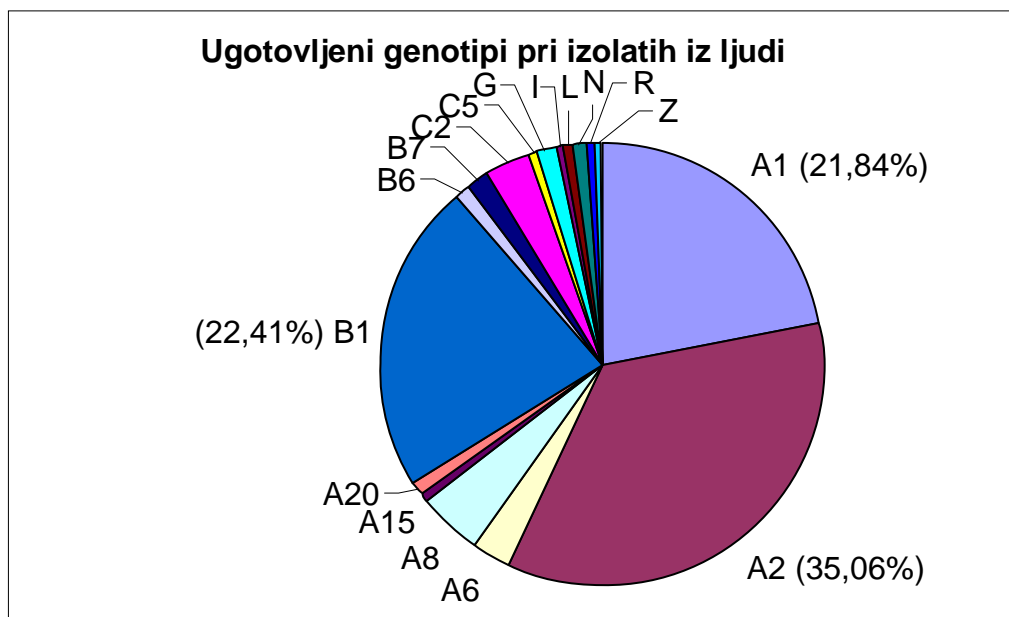
Legenda: A – genetska skupina A; B – genetska skupina B; C – genetska skupina C; Ne – neopredeljeni genotipi; h – izolat iz človeka; MS – Murska sobota; NM – Novo mesto.

Legend: A – cluster A; B – cluster B; C – cluster C; Ne – undefined; h – isolate from a human; MS – Murska sobota; NM – Novo mesto.

Slika 12: Na sliki so prikazani rezultati genotipizacije izolatov *S. Enteritidis* iz ljudi: primerjava 24 značilnih genotipov. Na desni strani slike so oznake izolatov, ugotovljeni genotipi, izvor izolatov, vrste vzorcev, iz katerih je izolirana *S. Enteritidis*. Na levi strani je prikazan odstotek podobnosti med izolati.

Figure 12: The figure shows the results of genotyping of isolates of *S. Enteritidis* in humans: comparison of 24 representative genotypes. On the right side of the picture, there are labels of isolates, identified genotypes, source of isolates, the type of samples from which *S. Enteritidis* are isolated. On the left side of the dendrogram, the percentage of relatedness between genotypes is shown.

V raziskavi smo pri izolatih iz ljudi ugotovili 17 različnih genotipov. Trije prevladujoči so bili A1 (38/174), A2 (61/174) in B1 (39/174), ki so predstavljali kar 79,31 % vseh izolatov. Pri več kot petih izolatih smo ugotovili genotipe A6 (5/174), A8 (8/174) in C2 (6/174), pri več kot enem izolatu smo ugotovili genotipe A20 (2/174), B6 (2/174), B7 (3/174), G (2/174) in N (2/174), ostale genotipe smo ugotovili pri enem izolatu (Tabela 11).



Slika 13: Pregled ugotovljenih genotipov pri izolatih iz ljudi.
Figure 13: Overview of identified genotypes in the isolates from humans.

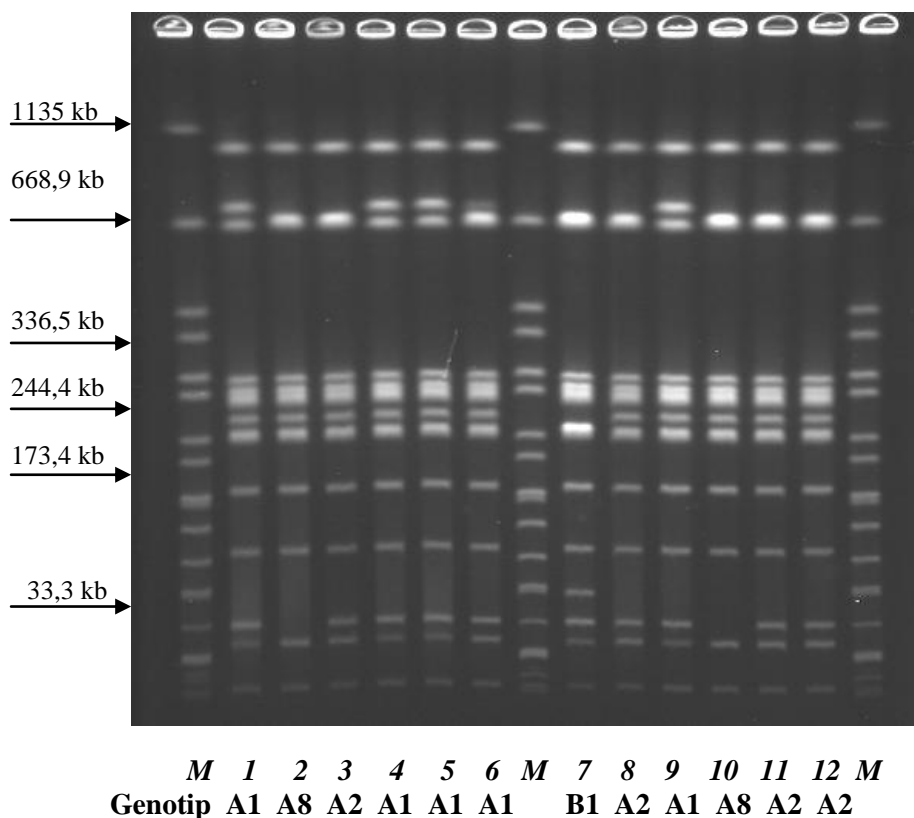
Tabela 12: Deleži najpogostejših genotipov prikazanih po geografskih področjih Novo mesto (NM), Murska Sobota (MS) in Maribor (MB).

Table 12: The most frequently detected genotypes by geographical areas Novo mesto (NM), Murska Sobota (MS) in Maribor (MB).

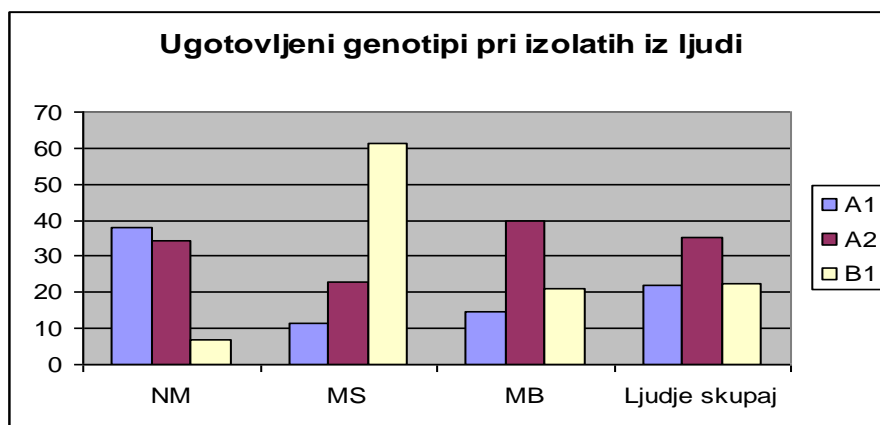
Genotip	NM %	MS %	MB %	Skupaj %
A1	37,93	11,35	14,44	21,84
A2	34,48	23,07	39,88	35,06
B1	6,89	61,53	21,11	22,41

Na področju Murske Sobote izstopa delež genotipa B1 61,53 %, na področju Maribora pa delež genotipa A2 39,88 % (Tabela 12; Slika 15).

Deleža genotipa A1 pri izolatih iz človeka odstopata od njegovega deleža v zbirki vseh izolatih iz človeka in sicer na področju Novega mesta za 16,10 % ($P = 0,0243$), razlika je statistično značilna in na področju Murske Sobote za 10,30 % ($P = 0,3405$), kjer pa razlika ni statistično značilna. Delež genotipa A2 s področja Murske Sobote odstopa za 11,98 % ($P = 0,3249$). Razlika ni statistično značilna. Deleža genotipa B1 na področju Murske Sobote odstopa za 39,12 % ($P < 0,0001$) in na področju Novega mesta za 15,52 % ($P < 0,0147$). Razliki sta statistično značilni. Genotipa A1 in A2 se razlikujeta v enem pasu (D_k je < 92 %) in zajemata skupaj 99 ali 56,89 % od 174 izolatov (Slika 12). Genotipa A1 in B1 se razlikujeta v treh pasovih ($D_k < 85$ %) (Slika 14).



Slika 14: Primer rezultatov genotipizacije izolatov iz človeka. Na sliki so trije označevalci velikosti (M) z navedbo velikosti PFGE produktov v kb.
 Figure 14: Example of results of genotyping isolates from humans. The figure shows three size markers (M) with size of PFGE products in kb.



Legenda: NM – Novo mesto, MS – Murska Sobota, MB – Maribor
 Legend: NM – Novo mesto, MS – Murska Sobota, MB – Maribor

Slika 15: Prikaz deležev prevladujočih genotipov A1, A2 in B1.
 Figure 15: Illustration of proportions of most prevalent genotypes A1, A2 and B1.

4.7 Analiza okužb

Opravili smo epidemiološko analizo okužb s *S. Enteritidis* v rejah živali in izbruhov okužb pri ljudeh. Pri kokoših nesnicah smo analizirali okužbe v devetih rejah, pri brojlerjih v dveh in pri prašičih v treh, prav tako smo analizirali dva izbruha okužb pri ljudeh.

4.7.1 Okužbe pri kokoših nesnicah

4.7.1.1 Gospodarstvo GA

Izolati so bili pridobljeni v štirih jatah, ki so si sledile na istem gospodarstvu.

Tabela 13: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GA, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

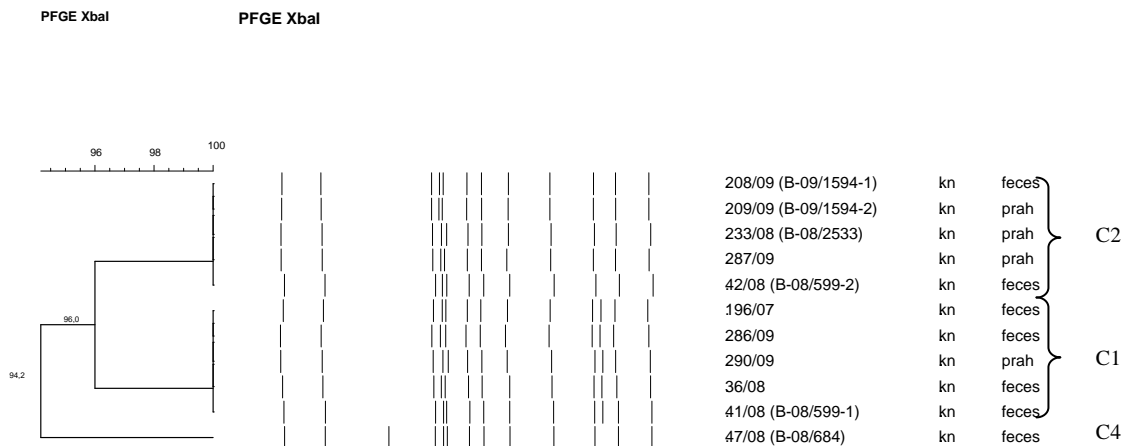
Table 13: Samples taken on holding GA in the monitoring and control of *S. Enteritidis* in laying hens flocks and identified genotypes.

Kokoši nesnice			Gospodarstvo GA, jata 3000 kokoši nesnic					
Zap št.	Izolat	Vzorec	genotip PFGE	Oznaka jate	Starost	Odvzem vzorca		Izvor vzorca
1	196/07	feces	C1	jata 1	36 t	jul. 07	ND	Kranj
2	36/08	feces	C1	jata 2	36 t	feb. 08	ND	Kranj
3	41/08	feces	C1		39 t	mar. 08	UV pot	Kranj
4	42/08	feces	C2		40 t	mar. 08	UV pot	Kranj
5	47/08	feces	C4		40 t	mar. 08	UV pot	Kranj
6	115/08	prah	C1		jata 3	25 t	maj 08	UV po IOJ
7	233/08	prah	C2	43 t		okt. 08	UV	Kranj
8	208/09	feces	C2	64 t		jul. 09	UV	Kranj
9	209/09	feces	C2	64 t		jul. 09	UV	Kranj
10	286/08	feces	C1	jata 4	24 t	okt. 09	UV po IOJ	Kranj
11	290/09	prah	C1		24 t	okt. 09	UV po IOJ	Kranj
12	287/09	prah	C2		24 t	okt. 09	ND	Kranj

Legenda: ND – nosilec dejavnosti; UV pot – uradni potrditveni vzorec; UV po IOJ – uradni vzorec po izločitvi okužene jate; t – teden.

Legend: ND – business operator; UV pot – official confirmation sample; UV po IOJ – official sample after the removal of the infected flock; t – week.

Pri izolatih so bili ugotovljeni genotipi C1, C2 in C4. V reji kokoši nesnic v obdobju od leta 2007 do leta 2009 sta bila vsaj dva genotipa *S. Enteritidis* (Tabela 13). Genotipa C1 in C2 sta genetsko tesno povezana, razlikujeta se v enem pasu ($F = 0,96$, Dk je $< 96\%$) in sta genetsko nespremenjena v obdobju treh let. Izolirana sta bila tako iz fecesa kot iz prahu iz reje kokoši nesnic. Genotip C4 se razlikuje od genotipa C2 v 2 pasovih ($F = 0,92$, Dk je $< 94\%$) (Slika 16).



Slika 16: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GA.
Figure 16: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GA.

Genotipa C1 in C4 sta bila ugotovljena samo pri kokoših nesnicah. Genotip C2 smo ugotovili tudi pri prašičih, mestnih golobih in pri ljudeh (Tabela 32).

4.7.1.2 Gospodarstvo GB

Na gospodarstvu je bila okužba s *S. Enteritidis* ugotovljena v 2 jatah, ki sta si sledili. Pri izolatih so bili ugotovljeni genotipi B1 in B3 (Tabela 14). Genotip B3 je bil ugotovljen pri enem izolatu, izoliranem iz vzorca prahu. Ta genotip je genetsko tesno povzan z genotipom B1 ($F = 0,95$, Dk je $< 95,2\%$) (Slika 17).

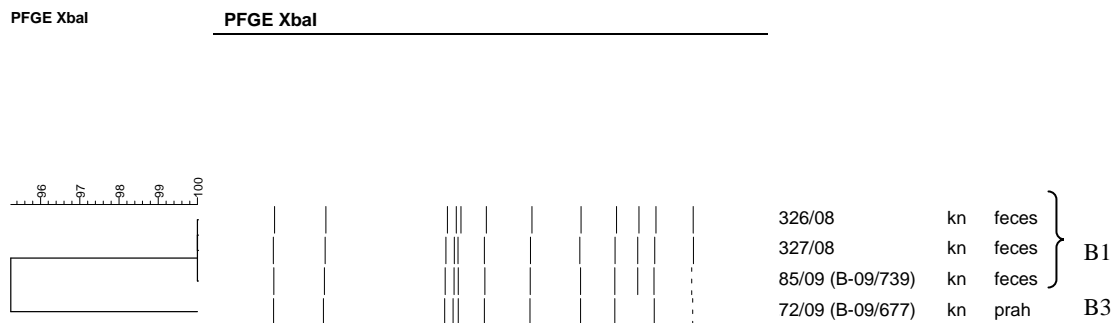
Tabela 14.: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GB, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 14: Samples taken on holding GB in the monitoring and control of *S. Enteritidis* in laying hens flocks and identified genotypes.

Kokoši nesnice			Gospodarstvo GB, jata 2000 nesnic					
Zap. št.	Izolat	Vzorec	Genotip PFGE		Starost	Odvzem vzorca		Izvor izolata
1	326/08	feces	B1	jata 1	27t	dec. 08	UV	Novo mesto
2	327/08	feces	B1		27t	dec. 08	UV	Novo mesto
3	85/09	feces	B1	jata 2	30t	apr. 09	UV po izb.	Novo mesto
4	72/09	prah	B3		30t	apr. 09	UV po izb.	Novo mesto

Legenda: UV po izb. – uradni vzorec po izbruhu okužbe pri človeku; UV – uradni vzorec; t – teden.

Legend: UV po izb. – official sample after the outbreak of the infection in humans; UV – official sample; t – week.



Slika 17: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GB.
Figure 17: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GB.

Genotip B1 je bil izoliran iz vzorca fecesa in je bil v reji kokoši nesnic prisoten najmanj od leta 2008 do leta 2009. Genotip B1 je bil ugotovljen tudi pri brojlerjih, puranih, prašičih, mestnih golobih, nojih in ljudeh (Tabela 32). Genotip B3 je bil ugotovljen samo pri kokoših nesnicah.

4.7.1.3 Gospodarstvo GC

Na gospodarstvu GC so bili izolati *S. Enteritidis* pridobljeni v eni jati iz vzorcev fecesa in prahu (Tabela 15).

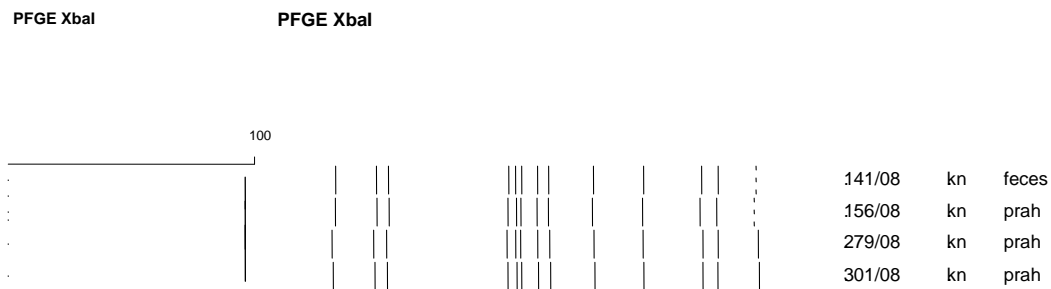
Tabela 15: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GC, v monitoringu pri kokoših nesnicah, za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 15: Samples taken on holding GC in the monitoring and control of *S. Enteritidis* in laying hens flocks and identified genotypes.

Kokoši nesnice			Gospodarstvo GC, jata 2000 nesnic					
Zap. št.	Izolat	Vzorec	Genotip PFGE	Oznaka jate	Starost	Odvzem vzorca		Izvor izolata
1	141/08	feces	A1	jata 1	52 t	jun. 08	ND	Novo mesto
2	156/08	prah	A1		52 t	jun. 08	UV pot	Novo mesto
3	301/08	prah	A1		70 t	nov. 08	ND	Novo mesto
4	279/08	prah	A1		70 t	nov. 08	UV pot	Novo mesto

Legenda: ND – nosilec dejavnosti; UV pot – uradni potrditveni vzorec; t – teden.

Legend: ND – business operator; UV pot – official confirmation sample; t – week.



Slika 18: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GC.
 Figure 18: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GC.

Pri vseh izolatih je bil ugotovljen genotip A1 (Slika 18). Okužba je bila v jati prisotna najmanj 18 tednov.

4.7.1.4 Gospodarstvo GD

Na gospodarstvu GD so bili izolati *S. Enteritidis* pridobljeni istočasno v eni jati, iz vzorcev fecesa (Tabela 16).

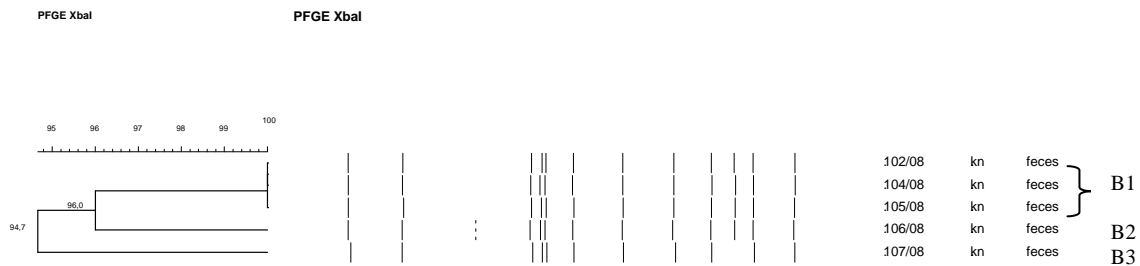
Tabela 16: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GD, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 16: Samples taken on holding GD in the monitoring and control of *S. Enteritidis* in laying hens flocks and identified genotypes.

			Gospodarstvo GD, jata 8700 nesnic				
Zap. št.	Izolat	Vzorec	Genotip PFGE	Oznaka jate	Starost	Datum izolacije	Izvor izolata
1	102/08	feces	B1	jata 1	47 t	apr. 08	Murska Sobota
2	104/08	feces	B1		47 t	apr. 08	Murska Sobota
3	105/08	feces	B1		47 t	apr. 08	Murska Sobota
4	106/08	feces	B2		47 t	apr. 08	Murska Sobota
5	107/08	feces	B3		47 t	apr. 08	Murska Sobota

Legenda: t – teden.

Legend: t – week.



Slika 19: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GD.

Figure 19: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GD.

Pri treh izolatih je bil ugotovljen genotip B1. V jati sta bila ugotovljena tudi genotipa B2 in B3. Genotipi so genetsko tesno povezani (Dk je < 94,7 %) (Slika 19).

4.7.1.5 Gospodarstvo GE

Na gospodarstvu GE so bili izolati *S. Enteritidis* pridobljeni v eni jati, istočasno, iz vzorcev fecesa in prahu. Pri vseh štirih izolatih je bil ugotovljen genotip A1 (Tabela 17; Slika 20).

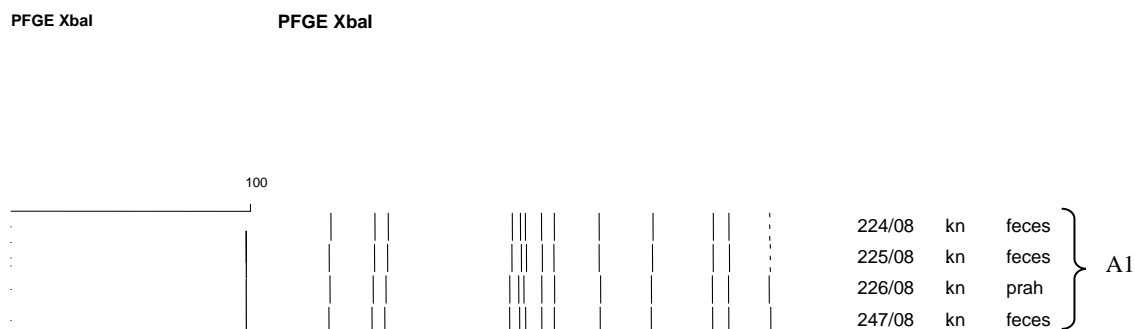
Tabela 17: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GE, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 17: Samples taken on holding GE in the monitoring and control of *S. Enteritidis* in laying hens flocks and identified genotypes.

Gospodarstvo GE, jata 4300 nesnic							
Zap. št.	Izolat	Vzorec	Genotip PFGE	Oznaka jate	Starost	Datum izolacije	Izvor izolata
1	224/08	feces	A1	jata 1	26 - 43 t	okt. 08	Novo mesto
2	225/08	feces	A1	jata 1	26 - 43 t	okt. 08	Novo mesto
3	247/08	feces	A1	jata 1	26 - 43 t	okt. 08	Novo mesto
4	226/08	prah	A1	jata 1	26 - 43 t	okt. 08	Novo mesto

Legenda: t – teden.

Legend: t – week.



Slika 20: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GE.
 Figure 20: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GE.

4.7.1.6 Gospodarstvo GF

Na gospodarstvu GF so bili izolati *S. Enteritidis* pridobljeni v dveh jatah kokoši nesnic. Okužba je bila ugotovljena v vzreji jarkic pri starosti 16 tednov in pri kokoših nesnicah v proizvodnji v starosti 41 in 62 tednov in ponovno v novi jati pri starosti kokoši nesnic 36 tednov. Pri treh izolatih je bil ugotovljen genotip A2 in pri enem genotip A7 (Tabela 18). Genotipa se razlikujeta v enem pasu (Dk je < 96 %) (Slika 21).

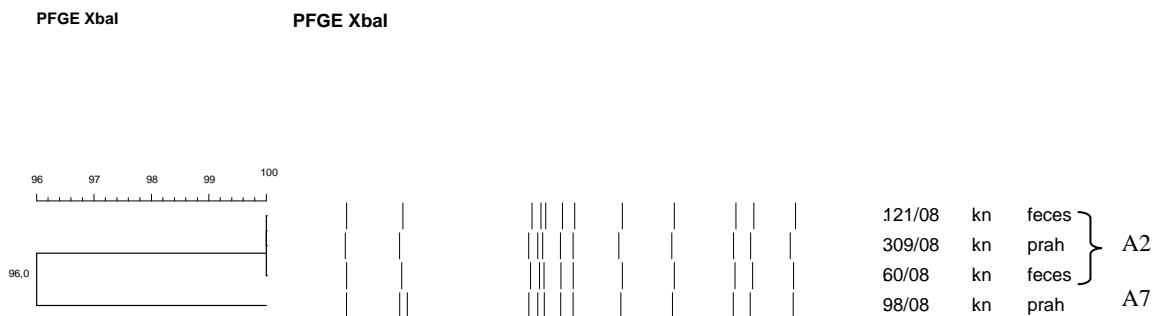
Tabela 18: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GF, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 18: Samples taken on holding GF in the monitoring and control of *S. Enteritidis* in laying hens flocks and identified genotypes.

Gospodarstvo GF, jata 6300 nesnic								
Zap. št.	Oznaka izolata	Vzorec	Genotip PFGE	Oznaka jate	Starost	Odvzem vzorcev		Izvor izolata
1	60/08	feces	A2	jata 1	16 t	mar. 08	ND	Maribor
2	98/08	prah	A7		41 t	apr. 08	UV pot.	Maribor
3	121/08	feces	A2		62 t	maj. 08	UV	Maribor
4	309/08	prah	A2	jata 2	36 t	nov. 08	UV	Maribor

Legenda: ND – nosilec dejavnosti; UV pot. – uradni vzorec, potrditveno vzorčenje; UV – uradni vzorec; t – teden.

Legend: ND – business operator; UV pot – official confirmation sample; UV – official sample; t – week.



Slika 21: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GF.
Figure 21: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GF.

4.7.1.7 Gospodarstvo GG

Na gospodarstvu GG so bili izolati *S. Enteritidis* pridobljeni v eni jati iz vzorcev fecesa in prahu. Pri vseh štirih izolatih je bil ugotovljen genotip A1 (Tabela 19; Slika 22).

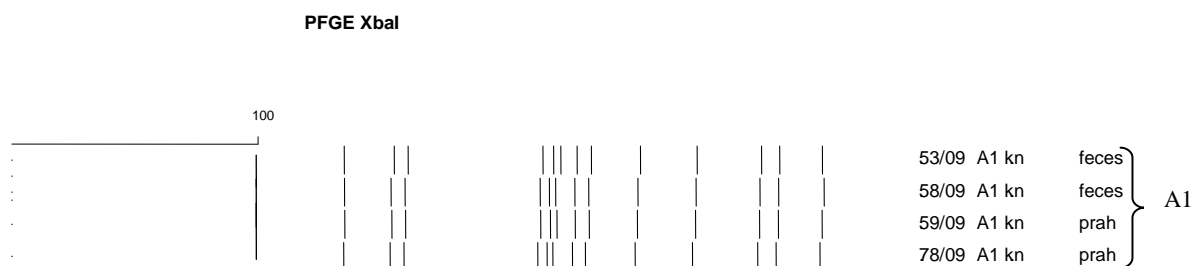
Tabela 19: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GG, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 19: Samples taken on holding GG in the monitoring and control of *S. Enteritidis* in laying hens flocks and identified genotypes.

Gospodarstvo GG, jata 6300 nesnic								
Zap. št.	Oznaka Izolata	Vzorec	Genotip PFGE	Oznaka jate	Starost	Odvzem vzorca		Izvor izolata
1	53/09	feces	A1	jata 1	30-44t	mar. 09	ND	Kranj
2	58/09	feces	A1			apr. 09	UV	Kranj
3	59/09	prah	A1			apr. 09	UV	Kranj
4	78/09	prah	A1			apr. 09	UV	Kranj

Legenda: ND – nosilec dejavnosti; UV – uradni vzorec; t – teden.

Legend: ND – business operator; UV – official sample; t – week.



Slika 22: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis*, na gospodarstvu GG.
Figure 22: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GG.

4.7.1.8 Gospodarstvo GH

Na gospodarstvu GH so bili izolati *S. Enteritidis* pridobljeni v letih 2006 in 2009. Pri okužbi v letu 2006 so bili pri izolatih iz vzorcev fecesa ugotovljeni genotipi A2, A17, B1 in B2. V jatah so bile kokoši različnih starosti. V mladih jatah so bile kokoši stare 17 in 23 tednov, v starejših pa 49, 70 in 101 teden (Tabela 20).

Tabela 20: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GH, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 20: Samples taken on holding GH in the monitoring and control of *S. Enteritidis* in laying hens flocks and identified genotypes.

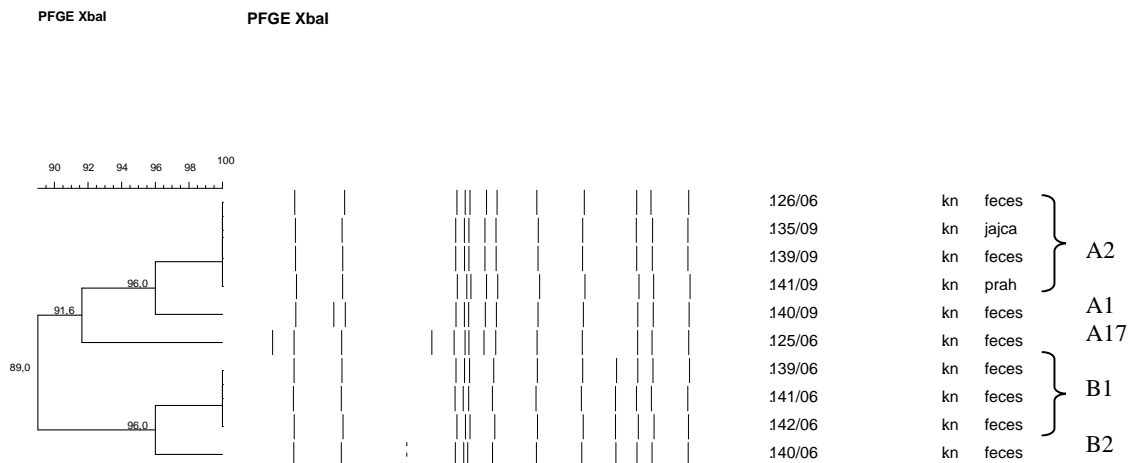
			Gospodarstvo GH, jata 6300 nesnic					
Zap. št.	Oznaka Izolata	Vzorec	Genotip PFGE	Oznaka jate	Starost	Odvzem vzorcev		Izvor izolata
1	125/06	feces	A17	jata 6	17t	avg. 06	ND	Ljubljana
2	126/06	feces	A2	jata 9	17t	avg. 06	ND	Ljubljana
3	139/06	feces	B1	jata 3	49t	sep. 06	UV pot.	Ljubljana
4	140/06	feces	B2	jata 4	101t	sep. 06	UV pot.	Ljubljana
5	141/06	feces	B1	jata 5	70t	sep. 06	UV pot.	Ljubljana
6	142/06	feces	B1	jata 6	23t	sep. 06	UV pot.	Ljubljana
7	139/09	feces	A2	jata 11	56t	maj. 09	UV po izb.	Ljubljana
8	140/09	feces	A1	jata 11	56t	maj. 09	UV po izb.	Ljubljana
9	141/09	prah	A2	jata 11	56t	maj. 09	UV po izb.	Ljubljana
10	135/09	jajca	A2	jata 11	56t	maj. 09	UV po izb.	Ljubljana

Legenda: ND – nosilec dejavnosti; UV pot. – uradni vzorec, potrditveno vzorčenje; UV po izb. – uradni vzorec po izbruhu okužbe pri ljudeh; t – teden.

Legend: ND – business operator; UV pot – official confirmation sample; UV po izb. – official sample after the outbreak of the infection in humans; t – week.

Pri okužbi v letu 2009 sta bila ugotovljena genotipa A1 in A2. *S. Enteritidis* je bila ugotovljena v vzorcih fecesa, prahu in jajc. Kokoši nesnice so bile stare 56 tednov. Okužbama

iz leta 2006 in iz leta 2009 je skupen genotip A2. Iz vzorcev, odvzetih po ugotovljenem izbruhu okužbe pri ljudeh, sta bila v jati 11 ugotovljena dva genotipa A1 in A2.



Slika 23: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis*, pridobljenih na gospodarstvu GH.
Figure 23: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GH.

4.7.1.9 Gospodarstvo GI

Na gospodarstvu GI so bili izolati *S. Enteritidis* pridobljeni v treh jatah v letu 2007 (Tabela 21).

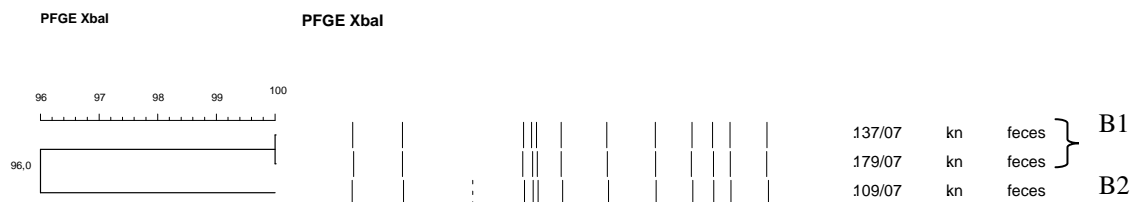
Tabela 21: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GI, v monitoringu pri kokoših nesnicah za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 21: Samples taken on holding GI in the monitoring and control of *S. Enteritidis* in laying hens flocks and identified genotypes.

			Gospodarstvo GI					
Zap. št.	Oznaka vzorca	Vzorec	Genotip PFGE	Oznaka jate	Starost	Odvzem vzorcev		Izvor izolata
1	109/07	feces	B2	jata 1	63t	apr. 07	ND	Celje
2	137/07	feces	B1	jata 2	46t	maj 07	UV pot.	Celje
3	179/07	feces	B1	jata 3	46t	julij. 07	ND	Celje

Legenda: ND – nosilec dejavnosti; UV pot. – uradni vzorec, potrditveno vzorčenje.

Legend: ND – business operator; UV pot – official confirmation sample.



Slika 24: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GI.
Figure 24: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GI.

S. Enteritidis je bila izolirana iz vzorcev fecesa iz treh različnih jat. Pri izolatih sta bila ugotovljena genotipa B1 in B2 (Slika 24).

4.7.1.10 Analiza okužb gospodarstev za rejo kokoši nesnic

Na gospodarstvih za rejo kokoši nesnic, kjer je bila ugotovljena okužba s *S. Enteritidis* in je bil izoliran več kot en izolat, smo ugotovili, da je jata lahko okužena z enim ali dvema sevoma (gospodarstvo GB, GF in GI) in tudi hkrati z več sevi *S. Enteritidis* (gospodarstvo GA, GD in GH), katerih genotipi se razlikujejo. Prevladujoči genotipi so bili ugotovljeni na več gospodarstvih, in sicer; genotipa A1 in A2 na dveh, genotip B1 na štirih, genotip B3 na dveh, genotipi C1, C2 in C3 pa samo na posameznih gospodarstvih. Na 3 gospodarstvih (GA, GB, GF) so bili ugotovljeni enaki genotipi v jatah, ki so si sledile.

Okužbe z enakim genotipom so bile ugotovljene pri različnih starostih kokoši nesnic. Genotip A1 je bil ugotovljen pri enodnevnih piščancih, ter pri kokoših nesnicah starosti 26 in 62 tednov. Genotip A2 je bil ugotovljen pri jarkicah starih 16 tednov, ter pri kokoših nesnicah starih 36, 56 in 62 tednov. Genotip B1 je bil ugotovljen v starosti kokoši nesnic 23, 27, 36, 49 in 70 tednov. Genotip C1 je bil ugotovljen v starosti kokoši nesnic 24 in 36 tednov. Genotip C2 je bil ugotovljen v starosti kokoši nesnic 24, 43 in 64 tednov.

Tabela 22: Pregled ugotovljenih genotipov po gospodarstvih za rejo kokoši nesnic, kjer je bila ugotovljena okužba s *S. Enteritidis* in je bil izoliran več kot en izolat.

Table 22: Overview of identified genotypes in infected laying hens flocks where *S. Enteritidis* has been isolated from more than one sample.

Gospodarstvo	Vzorec	PFGE genotipi										Izvor izolata
		A1	A2	A7	A17	B1	B2	B3	C1	C2	C3	
GA	feces								3	4	1	NM
	prah								2	2		
GB	feces					3						NM
	prah							1				
GC	feces	1										NM
	prah	3										
GD	feces					2	1					MS
	prah							1				
GE	feces					3						NM
	prah					1						
GF	feces		2									MB
	prah		1	1								
GG	feces	2										KR
	prah	2										
GH	feces	1	2		1	3	1					LJ
	prah		1									
	jajca		1									
GI	feces					2	1					CE

Legenda: KN – kokoši nesnice; CE – Celje; KR – Kranj; LJ – Ljubljana; MB – Maribor; MS – Murska Sobota; NM – Novo mesto.

Legend: KN – laying hens; CE – Celje; KR – Kranj; LJ – Ljubljana; MB – Maribor; MS – Murska Sobota; NM – Novo mesto.

Prevladujoči genotipi so bili ugotovljeni v več regijah, in sicer; genotip A1 na področju Novega mesta, Kranja in Ljubljane, genotip A2 na področju Maribora in Ljubljane, genotip B1 na področju Novega mesta, Murske Sobote, Celja in Ljubljane (Tabela 22).

4.7.2 Okužbe pri brojlerjih

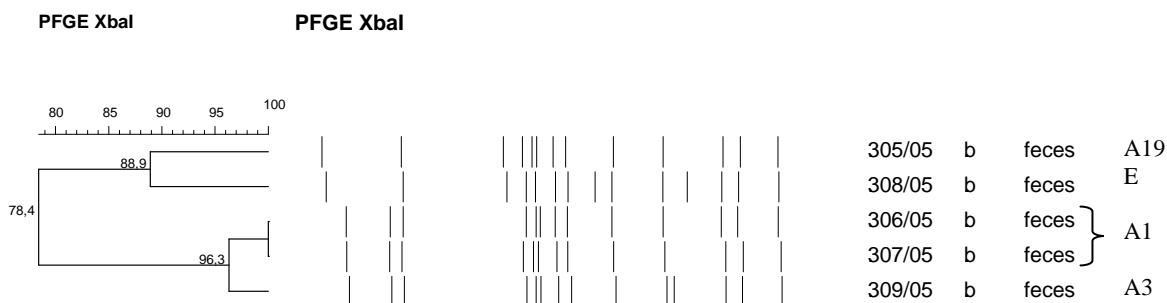
4.7.2.1 Gospodarstvo GB1

Vzorci fecesa so bili v reji brojlerjev odvzeti istočasno v letu 2005 (Tabela 23). Pri izolatih *S. Enteritidis* iz vzorcev fecesa so bili ugotovljeni genotipi A1, A3, A19 in E1 (Slika 25). Gospodarstvo je bilo okuženo z več sevi *S. Enteritidis* hkrati.

Tabela 23: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GB1 za rejo brojlerjev, za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 23: Samples taken on broiler rearing holding GB1 for analysis to detect *S. Enteritidis* and identified genotypes.

Gospodarstvo GB1					
Zap. št.	Vzorec	Oznaka izolata	Genotip PFGE	Odvzem vzorcev	Izvor izolata
1	feces	305/05	A19	nov. 2005	Celje
2	feces	306/05	A1	nov. 2005	Celje
3	feces	307/05	A1	nov. 2005	Celje
4	feces	308/05	E1	nov. 2005	Celje
5	feces	309/05	A3	nov. 2005	Celje



Slika 25: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GB1.

Figure 25: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GB1.

4.7.2.2 Gospodarstvo GB2

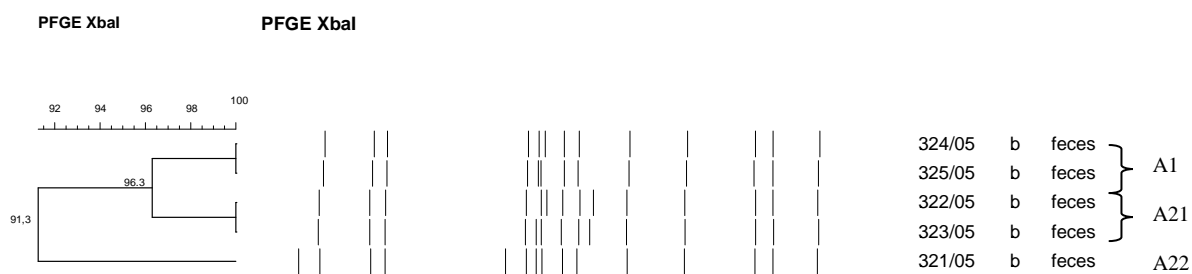
Vzorci fecesa so bili v reji brojlerjev odvzeti istočasno v letu 2005 (Tabela 24).

Tabela 24: Vzorci odvzeti na gospodarstvu GB2 za rejo brojlerjev, za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 24: Samples taken on broiler rearing holding GB2 for analysis to detect *S. Enteritidis* and identified genotypes.

Gospodarstvo GB2					
Zap. št.	Vzorec	Oznaka izolata	Genotip PFGE	Odvzem vzorcev	Izvor izolata
1	feces	321/05	A22	nov. 2005	Ptuj
2	feces	322/05	A21	nov. 2005	Ptuj
3	feces	323/05	A21	nov. 2005	Ptuj
4	feces	324/05	A1	nov. 2005	Ptuj
5	feces	325/05	A1	nov. 2005	Ptuj

Pri izolatih *S. Enteritidis* iz teh vzorcev so bili ugotovljeni trije genotipi A1, A21 in A22. Gospodarstvo je bilo okuženo z več sevi *S. Enteritidis* hkrati. V rejah brojlerjev GB1 in GB2 je bila ugotovljena multiklonalna okužba s *S. Enteritidis*, predvsem s sevi genotipov iz skupine A.



Slika 26: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GB2.
Figure 26: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GB2.

4.7.3 Okužbe pri prašičih

Izolati pri plemenskih prašičih so bili pridobljeni v raziskavi razširjenosti *Salmonella* in proti meticilinu odpornega *Staphylococcus aureus* v čredah plemenskih prašičev v letu 2008 (EFSA, 2009). Odvzetih je bilo 870 vzorcev fecesa na 42 gospodarstvih za rejo plemenskih prašičev. *S. Enteritidis* je bila ugotovljena na treh gospodarstvih (GP1, GP2, GP3).

4.7.3.1 Gospodarstvo GP1

Na gospodarstvu GP1 je bilo 141 plemenskih živali in 580 pitancev (Tabela 25). Reja je od prasiatve do zakola potekala na istem gospodarstvu, večina živali je bila iz lastne reje, merjasci so bili vzrejani v drugi reji. Na gospodarstvu niso izvajali sistema »all in/all out«. Tla so bila delno rešetkasta, prašiči niso imeli možnosti izhoda na prosto. Krmljeni so bili z briketi, obrok je bil pripravljen s probiotiki. Zadnje 3 mesece v reji ni bilo znakov driske. Prašiči niso bili zdravljeni. Na gospodarstvu je bila ugotovljena prisotnost salmonele v vzorcih iz 5 ograd, in sicer je bil v treh ogradah 1, 2 in 4 pozitiven po en vzorec (ugotovljena je bila *S.*

Enteritidis), v ogradi 3 so bili pozitivni 4 vzorci (ugotovljena je bila 4x *S. Enteritidis*), v ogradi 5 pa 3 vzorci (3x *S. Enteritidis*) (Tabela 28).

Tabela 25: Vzorci odvzeti na gospodarstvu GP1 pri plemenskih prašičih za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

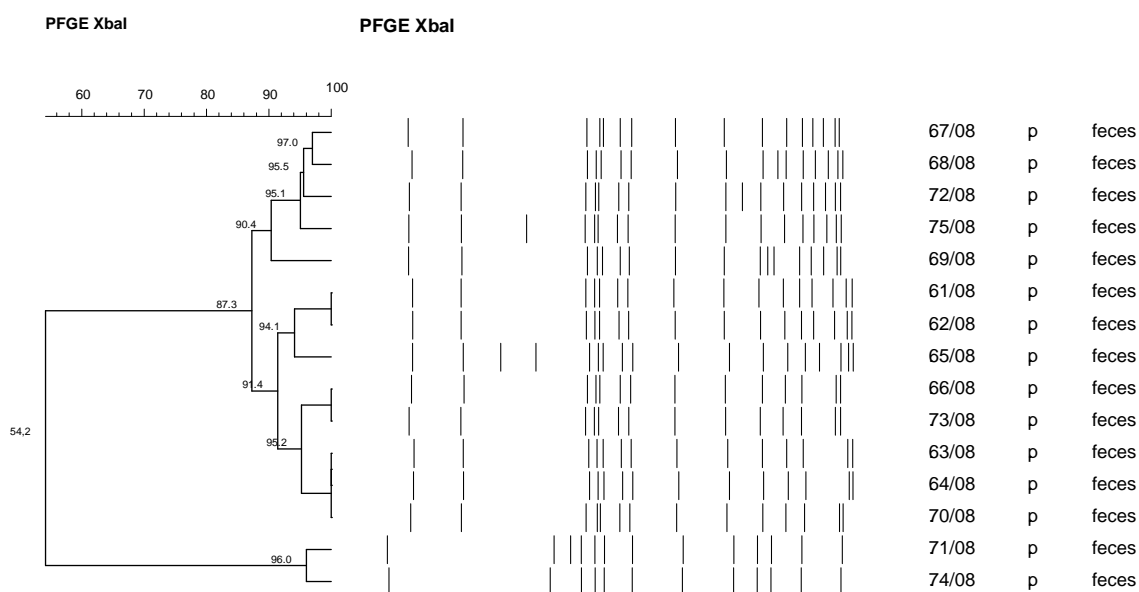
Table 25: Samples taken from the breeding pigs holding GP1 for analysis to detect *S. Enteritidis* and identified genotypes.

Gospodarstvo GP1 (plemenski prašiči 141, pitanci 580)								
Zap. št.	Oznaka vzorca	Vzorec	PFGE genotip	Vir izolatov	Kategorija pl. prašičev	Odvzem vzorca		Izvor izolata
1	61/08	feces	D6	TŠPI	pl. laktacija	mar.	2008	MS
2	62/08	feces	D6	TŠPI	pl. breje	mar.	2008	MS
3	63/08	feces	B5	TŠPI	pl. breje	mar.	2008	MS
4	64/08	feces	B5	TŠPI	pl. breje	mar.	2008	MS
5	65/08	feces	D7	TŠPI	pl. odstavljen	mar.	2008	MS
6	66/08	feces	B5	TŠPI	pl. odstavljen	mar.	2008	MS
7	67/08	feces	D1	TŠPI	pl. odstavljen	mar.	2008	MS
8	68/08	feces	D4	TŠPI	pl. odstavljen	mar.	2008	MS
9	69/08	feces	D5	TŠPI	pl. breje	mar.	2008	MS
10	70/08	feces	B5	TŠPI	pl. breje	mar.	2008	MS
11	72/08	feces	D3	TŠPI	pool laboratorij	mar.	2008	MS
12	73/08	feces	B5	TŠPI	pool laboratorij	mar.	2008	MS
13	75/08	feces	D2	TŠPI	pool laboratorij	mar.	2008	MS
14	74/08	feces	U	TŠPI	pool laboratorij	apr.	2008	MS
15	71/08	feces	T	TŠPI	pool gospodarstvo	maj	2008	MS

Legenda: pl – plemenske svinje; MS – Murska Sobota; TŠPI – temeljna študija pri plemenskih prašičih; pool gospodarstvo – združeni vzorci na gospodarstvu; pool laboratorij – združeni vzorci v laboratoriju.

Legend: pl – sows; MS – Murska Sobota; TŠPI – A baseline study in breeding pigs; pool holding – samples pooled on holding; pool laboratory – samples pooled in laboratory.

Na gospodarstvu GP1 je bila ugotovljena okužba z genotipi iz genske skupine D (D1 – D7), genotipi B5, U in T. Genotipi v skupini D so genetsko tesno povezani (Dk je manjši od 88,8 %). Genotipe iz skupine D, B5, T in U smo ugotovili samo pri prašičih. Genotip B5 se od genotipov skupine D razlikuje v 2 do 4 pasovih (Dk je < 83,6 %). Genotipa U in T smo ugotovili samo pri enem izolatu. Z genotipi iz skupine D (D1 – D7) in genotipom B5 genetsko nista povezana (Dk je manjši od 56,8 %) (Slika 27).



Slika 27: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GP1.
Figure 27: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GP1.

Na gospodarstvu je bila ugotovljena multiklonalna okužba s *S. Enteritidis*, za katero je bilo značilno, da noben genotip ni bil ugotovljen pri drugih vrstah živali ali pri ljudeh (Tabela 32).

4.7.3.2 Gospodarstvo GP2

Na gospodarstvu GP2 so redili 20 plemenskih živali in 512 pitancev. Reja je potekala od prasiatve do zakola, večina živali je bila iz lastne reje, merjasci so bili vzrejeni v drugi reji. Na gospodarstvu niso izvajali sistema »all in/all out«. Tla so bila polna, z nastilom iz slame, prašiči niso imeli možnosti izhoda na prosto. Prašiči so dobivali suho krmo, koruzo s kupljenim dodatkom. Znakov driske v reji ni bilo zadnje 3 mesece. Prašiči niso bili zdravljeni. Na gospodarstvu GP2 je bila prisotnost salmonele ugotovljena v vzorcih iz 3 ograd. V ogradi 1 sta bila pozitivna dva vzorca, v ogradah 2 in 3 pa po eden (Tabela 28). V vseh štirih primerih je bila ugotovljena *S. Enteritidis*.

Tabela 26: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GP2 pri plemenskih prašičih za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 26: Samples taken from the breeding pigs holding GP2 for analysis to detect *S. Enteritidis* and identified genotypes.

Gospodarstvo GP2 (plemnski prašiči 20, pitanci 512)								
Zap. št.	Oznaka izolata	Vzorec	PFGE genotip	Vir izolatov	Kategorija pl. prašičev	Odvzem vzorca		Izvor izolata
1	76/08	feces	B1	TŠPI	mladice	mar.	2008	MS
2	77/08	feces	B1	TŠPI	mladice	mar.	2008	MS
3	78/08	feces	B1	TŠPI	mladice	mar.	2008	MS
4	79/08	feces	B1	TŠPI	pl. breje	mar.	2008	MS

Legenda: pl. – plemenske svinje; MS – Murska Sobota; TŠPI – temeljna študija pri plemenskih prašičih
Legend: pl – sows; MS – Murska Sobota; TŠPI – A baseline study in breeding pigs.



Slika 28: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GP2.

Figure 28: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GP2.

Na gospodarstvu GP2 je bila ugotovljena okužba z genotipom B1 (Slika 28). Genotip B1 je bil ugotovljen tudi pri človeku. Gospodarstvo je na področju Murske Sobote, kjer je bila pri človeku ugotovljena pogosta okužba z genotipom B1. Okužba je bila ugotovljena pri mladich in pri brejih plemenskih svinjah.

4.7.3.3 Gospodarstvo GP3

Na gospodarstvu GP3 so redili 62 plemenskih živali in 67 pitancev. Reja je potekala od prasiatve do zakola, večina živali je bila iz lastne reje, merjasci so bili vzrejeni v drugi reji. Na gospodarstvu niso izvajali sistema »all in/all out«. Tla so bila delno rešetkasta, prašiči niso imeli možnosti izhoda na prosto. Dobivali so suho krmo. Dodatki z učinkom na salmonele se niso uporabljali. Znakov driske v reji ni bilo zadnje 3 mesece. Prašiči niso bili zdravljeni.

Na gospodarstvu GP3 je bila prisotnost salmonele ugotovljena v vzorcih v eni ogradi (Tabela 28). Pozitivna sta bila dva vzorca, v obeh primerih je bila ugotovljena *S. Enteritidis*.

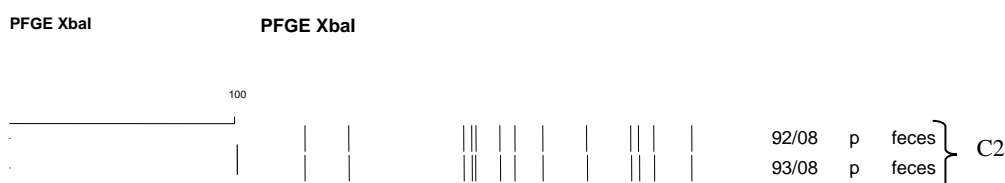
Tabela 27: Vzorci, odvzeti na gospodarstvu GP3 pri plemenskih prašičih za preiskavo na *S. Enteritidis* in ugotovljeni genotipi.

Table 27: Samples taken from the breeding pigs on holding GP3 for analysis to detect *S. Enteritidis* and identified genotypes.

Gospodarstvo GP3 (plemenski prašiči 62, pitanci 67)							
Zap. št.	Oznaka vzorca	Vzorec	PFGE genotip	Vir izolatov	Kategorija pl. prašičev	Odvzem vzorca	Izvor izolata
1	92/08	feces	C2	TŠPI	pl. breje	apr. 2008	MS
2	93/08	feces	C2	TŠPI	pl. breje	apr. 2008	MS

Legenda: pl. breje – breje plemenske svinje; MS – Murska Sobota; TŠPI – temeljna študija pri plemenskih prašičih

Legend: pl – sows; MS – Murska Sobota; TŠPI – A baseline study in breeding pigs.



Slika 29: Primerjava genotipov izolatov *S. Enteritidis* na gospodarstvu GP3.

Figure 29: Comparison of genotypes of isolates of *S. Enteritidis* from holding GP3.

Na gospodarstvu GP3 je bila ugotovljena okužba z genotipom C2, ki je bil ugotovljen tudi pri človeku (Tabela 32).

4.7.3.4 Analiza okužb gospodarstev za rejo prašičev

Pri plemenskih prašičih so bili ugotovljeni genotipi B1, B5, C2, D1 do D7, T in U. Vzorci so bili na posameznih gospodarstvih odvzeti istočasno. Pri plemenskih prašičih so bili ugotovljeni genotipi B1, B5, C2, D1 do D7, T in U. Vzorci so bili na posameznih gospodarstvih odvzeti istočasno. Na gospodarstvih GP2 in GP3 je bila ugotovljena okužba z enim sevom, na gospodarstvu GP1 pa hkrati kar z desetimi sevi, katerih genotipi so se razlikovali (D1 – D7, B5, T in U) (Tabela 29).

Tabela 28: Število izolatov *S. Enteritidis* iz vzorcev fecesa na gospodarstvih za rejo plemenskih prašičev po ogradah in kategorijah prašičev.

Table 28: The number of isolates of *S. Enteritidis* from faecal samples on pigs holdings in pens and categories of pigs.

Gosp.	Ograda 1		Ograda 2		Ograda 3		Ograda 4		Ograda 5		Poz. na SE
	Kategorija	SE	Kategorija	SE	Kategorija	SE	Kategorija	SE	Kategorija	SE	
GP1	laktacija	1	breje	1	po odstavitvi	4	breje	1	po odstavitvi	3	10
GP2	mladice	2	mladice	1	breje	1	-	-	-	-	4
GP3	breje	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2

Legenda: SE – *S. Enteritidis*; Gosp. – gospodarstvo; Poz. – pozitiven. Vir: EFSA.

Legend: SE – *S. Enteritidis*, Gosp. – holding; Poz. – positive. Source: EFSA.

Tabela 29: Pregled ugotovljenih genotipov po gospodarstvih za rejo prašičev, kjer je bila ugotovljena okužba s *S. Enteritidis* in je bil izoliran več kot en izolat.

Table 29: Overview of identified genotypes in infected pig breeding holdings, where *S. Enteritidis* has been isolated from more than one sample.

Gosp.	Vzorec	PFGE genotipi						Skupaj	Izvor
		B1	B5	C2	D1 do D7	T	U		
GP1	feces	-	5	-	8	1	1	15	MS
GP2	feces	4	-	-	-	-	-	4	MS
GP3	feces	-	-	2	-	-	-	2	MS
SKUPAJ		4	5	2	8	1	1	21	

Legenda: MS – Murska Sobota; Gosp. – gospodarstvo.

Legend: MS – Murska Sobota; Gosp. – holding.

Vse tri okužbe gospodarstev za rejo plemenskih prašičev so bile ugotovljene na področju Murske Sobotice. Genotipa B1 in C2 sta bila ugotovljena tudi pri drugih domačih živalih in pri človeku. Genotipi B5, D1 do D7, T in U so bili ugotovljeni samo pri prašičih (Tabela 32).

4.7.4 Analiza izbruhov okužb pri človeku

V raziskavi smo analizirali dva izbruha okužbe s *S. Enteritidis* pri ljudeh, in sicer: okužbo v letu 2008 s tatarskim biftkom z dodanimi surovimi jajci in okužbo v letu 2009 z vanilijevo kremo z dodanimi surovimi jajci.

Tabela 30: Izolati, pridobljeni v okviru raziskave izbruha okužbe s *S. Enteritidis* v letih 2008 in 2009.

Table 30: Isolates obtained from an epidemiological study of an outbreak of infection with *S. Enteritidis* in years 2008 and 2009.

Okužba	Izvor in število vzorcev			
	živilo	človek, feces	KN, feces	KN, prah
2008	1 TB	4	2	0
2009	1 VK	6	1	1

Legenda: KN – kokoši nesnice; TB – tatarski biftek; VK – vanilijeva krema.

Legend: KN – laying hens; TB – steak tartare; VK – vanilla cream.

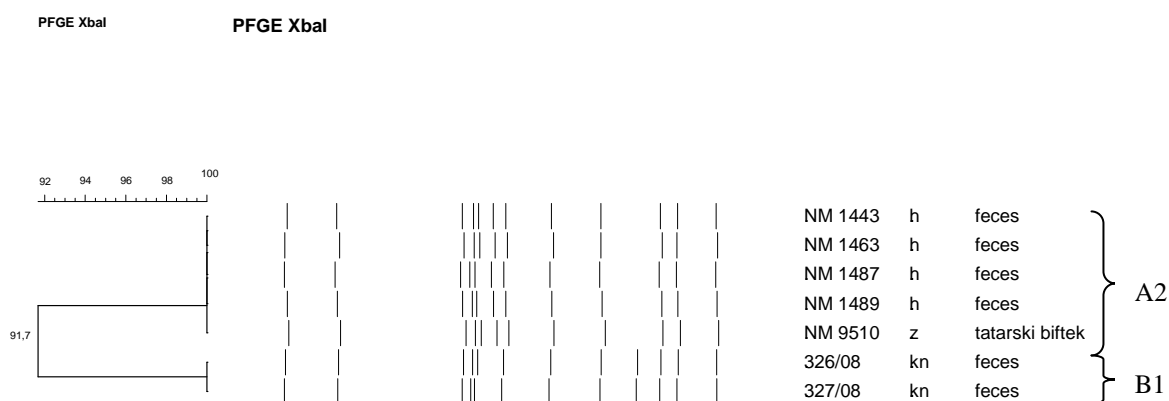
4.7.4.1 Izbruh okužbe s *S. Enteritidis* v letu 2008

Oktober leta 2008 je bil v Splošni bolnišnici Novo mesto postavljen sum na zastrupitev s hrano pri petih hospitaliziranih osebah iz občine Škocjan. Opravljeno je bilo epidemiološko poizvedovanje in odvzeti vzorci za razjasnitev izbruha. Ugotovljeno je bilo, da je z znaki okužbe (pretežno mrzlica, driska, bruhanje in povišana telesna temperatura) zbolelo skupno 19 ljudi. Zboleli so vsi, ki so zaužili tatarski biftek. *S. Enteritidis* je bila dokazana v vzorcu sumljivega živila in v blatu bolnikov.

Na podlagi epidemiološkega anketiranja ter mikrobioloških preiskav živil in blata je bilo ugotovljeno, da je bil izvor okužbe tatarski biftek, kontaminiran s *S. Enteritidis*. Odvzeti so bili vzorci na gospodarstvu izvora jajc, ki so bila sestavina živila (tatarski biftek). Po okužbi je bila okužena jata kokoši nesnic v letu 2008 nadomeščena z novo jato.

Pri izolatih iz živila (tatarski biftek) in ljudi je bil ugotovljen genotip A2. Pri izolatih iz jate kokoši nesnic, ki je bila izvor jajc, je bil ugotovljen genotip B1. Genotipa A2 in B1 se razlikujeta v dveh pasovih (Dk je manjši od 91,7 %).

Izolat z genotipom B1 ni bil ugotovljen niti pri ljudeh niti v tatarskem biftku. V epidemiji je zbolelo najmanj 19 ljudi, v analizo so bili vključeni izolati iz štirih bolnikov.

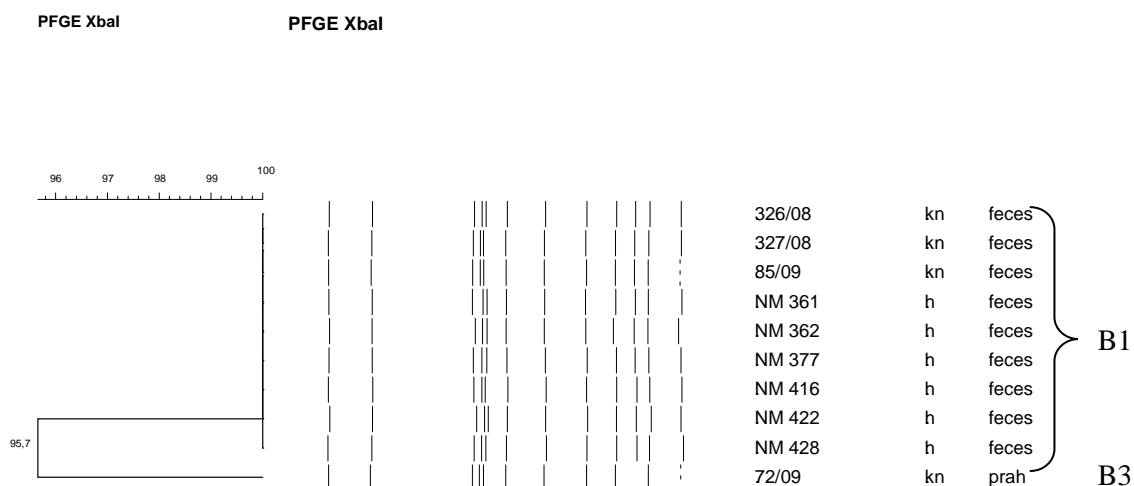


Slika 30: Primerjava izolatov *S. Enteritidis* iz ljudi, živila in iz jate kokoši nesnic, pridobljenih v okviru raziskave izbruha okužbe v letu 2008, h – človek; kn – kokoši nesnice; ž – živilo.

Figure 30: Comparison of isolates of *S. Enteritidis* from humans, food and from flock of laying hens obtained in the survey of an outbreak of infection in 2008, h – human; kn – laying hens; ž – food.

4.7.4.2 Izbruh okužbe s *S. Enteritidis* v letu 2009

Do izbruha okužbe s salmonelami je prišlo konec marca 2009. Zaradi črevesnih težav (pretežno driska in bruhanje) je zbolelo skupno osem ljudi. Črevesne težave so izzvenele v povprečju v treh dneh. Povzročitelj *S. Enteritidis* je bila dokazana iz blata bolnikov. Zboleli so vsi, ki so zaužili sumljivo vanilijevo kremo, ki so ji bila dodana surova jajca. Pri izolatih iz ljudi in iz fecesa kokoši nesnic je bil ugotovljen genotip B1, pri izolatu iz prahu pa genotip B3. Genotipa B1 in B3 sta genetsko tesno povezana (Dk je < 95,7 %). Genotipi izolatov iz ljudi in iz fecesa kokoši nesnic so genetsko neločljivi. Rezultati z veliko verjetnostjo nakazujejo, da so izolati epidemiološko povezani.



Slika 31: Primerjava izolatov *S. Enteritidis* iz ljudi in živila, pridobljenih v okviru raziskave izbruha okužbe v letu 2009, in iz jate kokoši nesnic, pridobljenih v okviru raziskave izbruha okužb v letih 2008 in 2009, h – človek; kn – kokoši nesnice.

Figure 31: Comparison of isolates of *S. Enteritidis* from humans and food obtained in the survey of an outbreak of infection in 2009 and from flock of laying hens obtained in the survey of an outbreaks of infection in 2008 and 2009, h – human; kn – laying hens.

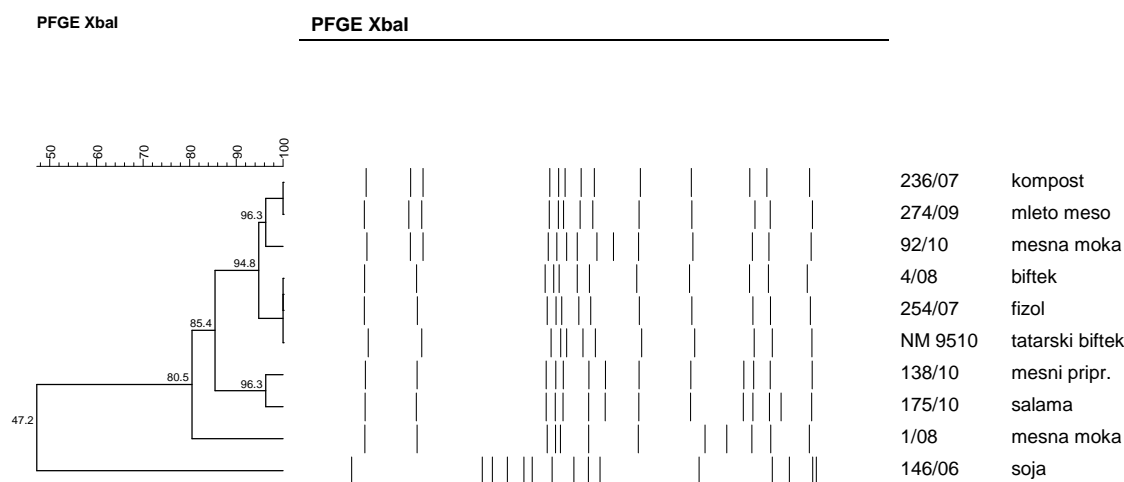
V obeh primerih izbruha okužbe s *S. Enteritidis* so bila jajca z gospodarstva GB. Pri izolatih *S. Enteritidis* iz kokoši nesnic leta 2008 in 2009 smo ugotovili genotip B1. Pri izolatih iz okuženih ljudi leta 2008 smo ugotovili genotip A2, pri izolatih iz leta 2009 pa genotip B1. Pri genotipizaciji izolatov smo ugotavljali majhne razlike med genotipi izolatov. Genotipa A2 in B1 sta se razlikovala v dveh pasovih, genotipa B1 in B3 pa v enem pasu (Slika 31).

4.8 Genotipizacija drugih izolatov

V raziskavo smo uvrstili še 10 izolatov iz različnih virov, in sicer iz mesnih izdelkov, krme, fižola in komposta (Tabela 31).

Tabela 31 : Izolati *S. Enteritidis* iz mesnih izdelkov, krme, fižola in komposta.
Table 31: Isolates of *S. Enteritidis* from meat products, animal feed, beans and compost.

	Izvor vzorca	Oznaka izolata	Genotip
1	mleto mešano meso	274/09	A1
2	kompost	236/07	A1
3	tatarski biftek	9510/08	A2
4	tatarski biftek	4/08	A2
5	fižol	254/07	A2
6	mesna moka	92/10	A4
7	mesna moka	1/08	B4
8	mesni pripravek	138/10	C2
9	pariška salama	175/10	C3
10	soja	146/06	J



Slika 32: Primerjava genotipov, ugotovljenih pri izolatih *S. Enteritidis* iz mesnih izdelkov, krme, fižola in komposta.

Picture 32: Comparison of genotypes found in isolates of *S. Enteritidis* in meat products, animal feed, beans and compost.

Pri izolatih iz mesnih izdelkov smo ugotovili genotip A1 pri izolatu iz mletega mešanega mesa, A2 pri dveh izolatih iz tatarskega bifteka, C2 pri izolatu iz mesnega pripravka in C3 pri izolatu iz pariške salame. Genotipi A1, A2 in C2 so bili pogosto ugotovljeni pri izolatih iz

živali in ljudi, genotip C3 je bil ugotovljen pri izolatih iz prašičev.

Pri izolatih iz krme pa smo ugotovili genotipa A4 in B4 pri dveh izolatih iz mesne moke in J pri izolatu iz soje. Genotip A4 je bil ugotovljen tudi pri izolatih iz kokoši nesnic, B4 in J pa nista bila ugotovljena pri izolatih iz živali ali ljudi. Pri izolatih iz komposta smo ugotovili genotip A1 in iz fižola A2.

4.9 Genotipizacija in epidemiološka analiza vseh izolatov *S. Enteritidis*

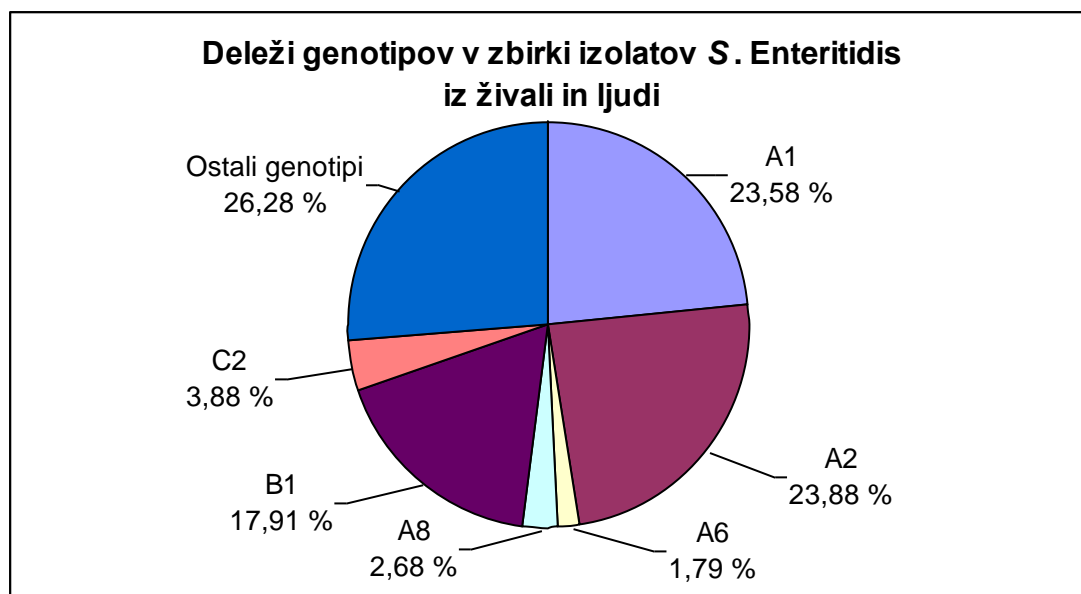
Tabela 32: Ugotovljeni genotipi pri izolatih *S. Enteritidis* iz živali in človeka (n = 368).

Table 32: Observed genotypes of the isolates *S. Enteritidis* in humans and animals (n = 368).

Genetska skupina	Genotip	Čl	KN	B	Pu	P	Pl	MG	Noji	Miši	Dr	Drugo	Skupaj			
1	A	1	A1	38	28	15	3	1				1	2	88		
		2	A2	65	14	1	2	1			1		3	87		
		3	A3			2								2	2	
		4	A4		2									2	2	
		5	A5			1	1							2	2	
		6	A6	5					1						6	6
		7	A7		1										1	1
		8	A8	8	1										9	9
		9	A9			1									1	1
		10	A10			1									1	1
		11	A11					1							1	1
		12	A12					1							1	1
		13	A13			2									2	2
		14	A14			1					1				2	2
		15	A15	1											1	1
		16	A16				1								1	1
		17	A17		1										1	1
		18	A18		1										1	1
		19	A19			1									1	1
		20	A20	2											2	2
		21	A21		1	2									3	3
		22	A22			1									1	1
		23	A23			1									1	1
2	B	24	B1	44	19	1	1	7	1	1		1		76	76	
		25	B2		5	1								6	6	
		26	B3		2										2	2
		27	B4										1		1	1
		28	B5					6							6	6
		29	B6	2											2	2
		30	B7	3											3	3
3	C	31	C1		5									5	5	
		32	C2	6	7			2		1			1		17	17
		33	C3					1					1		2	2
		34	C4		1										1	1
		35	C5	1											1	1
4	D	36	D1				1							1	1	
		37	D2				1							1	1	
		38	D3				1							1	1	
		39	D4				1							1	1	
		40	D5				1							1	1	
		41	D6				2							2	2	2
		42	D7				1							1	1	1
5	N E O P R E D E L J E N I	43	E			1								1	1	
		44	F				1							1	1	1
		45	G	2											2	2
		46	H			2									2	2
		47	I	1											1	1
		48	J										1		1	1
		49	K			1									1	1
		50	L	1											1	1
		51	M							1					1	1
		52	N	2											2	2
		53	O					1							1	1
		54	P		1										1	1
		55	R	1											1	1
		56	S			1									1	1
		57	T					1							1	1
		58	V					1							1	1
		59	U		1										1	1
		60	Z	1											1	1
SKUPAJ			183	90	36	8	32	2	3	2	1	1	10	368	368	

Legenda: Čl-človek, KN-kokoši nesnice, B-brojlerji, Pu-purani, P-prašiči, Pl-plazilci, MG-mestni golobi, Dr-drobnica. Drugo: glej Tabela 31.
Legend: Čl- human, KN- laying hens, B- broilers; Pu- turkeys; P- pigs; Pl- reptiles; Mg- city pigeons; Dr- sheep; Other: See Table 31.

Pri izolatih, ki so bili vključeni v raziskavo ($n = 368$), smo ugotovili 60 genotipov *S. Enteritidis*. Restriksijski vzorci so bili sestavljeni iz 11 pasov do 20 pasov. Sorodne genotipe smo združili v genetske skupine. Genotipe, ki niso uvrščeni v genetske skupine, smo označili kot neopredeljene.



Slika 33: Deleži genotipov A1, A2, A6, A8, B1 in C2 iz zbirke izolatov *S. Enteritidis* iz živali in ljudi, ki smo jih uvrstili v izračun deležev ($n = 335$).

Figure 33: Shares of genotypes A1, A2, A6, A8, B1 and C2 in collection of isolates of *S. Enteritidis* from animals and humans, which we have used in the calculation of the shares ($n = 335$).

Genotipe smo uvrstili v 4 genetske skupine. V skupino A smo uvrstili 23 genotipov na podlagi stopnje podobnosti več kot 88,0 %, v skupino B 7 genotipov na podlagi stopnje podobnosti več kot 88,0 %, v skupino C 5 genotipov na podlagi stopnje podobnosti več kot 92 % in v skupino D 7 genotipov na podlagi stopnje podobnosti več kot 88 %. V genetskih skupinah A in B je bilo zajetih 313 izolatov ali 85,05 % vseh izolatov ($n = 368$), ki so bili vključeni v raziskavo. Pri izolatih iz živali ($n = 161$) je bilo zajetih v skupinah A in B 74,52 % izolatov, skupini A 52,79 % ($85/161$) in v skupini B 21,73 % ($35/161$). Pri izolatih iz ljudi ($n = 174$), je bilo zajetih v skupinah A in B 90,80 % izolatov, v skupini A 66,09 % ($115/174$) in v skupini B 24,71 % ($43/174$). Genetski skupini A in B imata koeficient podobnosti > 83 % in se razlikujeta v treh pasovih. Najpogosteje so bili ugotovljeni genotipi A1, A2 in B1, ki so bili tesno genetsko povezani (Dk je najmanj 83 %). Genotipa A1 in A2 sta se razlikovala v enem pasu in genotipa A1 in B1 v treh pasovih. Genotip A1 je bil ugotovljen pri 41 izolatih iz živali (25,46 %), genotip A2 pri 19 (11,80 %) in genotip B1 pri 21 (13,04 %). Trije najbolj razširjeni genotipi pri živalih A1, A2 in B1 so bili ugotovljeni pri skupaj 50,31 % ($81/161$) izolatih iz živali.

Tabela 33: Pregled izolatov z genotipi glede na vrsto vzorca ter vrsto in kategorijo živali.

Table 33: Overview of the isolates with genotypes according to specimen type, species and category of animal.

Vrsta živali	Kategorija	Vrsta vzorca	Število izolatov	PFGE genotip	Število izolatov	%
kokoši	nesnice	feces, bris kloake, jetra, kompost feces	20	A1	41	25,46
	piščanci	podložni papir, zamrtki	3			
	brojlerji	feces, meso blato čistilna naprava	13			
purani		feces	3			
drobnica		feces	1			
prašiči	pitanci	bezgavke	1			
gallus gallus	nesnice	feces, prah, jetra, jajca	11	A2	19	11,80
	jarkice	feces	2			
	brojlerji	koža	1			
purani	enodnevni	podložni papir	2			
prašiči	pitanci	bezgavke	1			
	mladice	feces	1			
miši		organi	1			
gallus gallus	nesnice	feces, prah, črevo jajčna lupina bris površine	15	B1	21	13,04
	brojlerji	feces	1			
noj		feces	1			
prašiči	pitanci	bezgavke	2			
	mladice	feces	1			
mestni golob		feces	1			
gallus gallus	nesnice	feces, prah	5	C2	7	4,35
	jarkice	feces	1			
mestni golob		feces	1			
		SKUPAJ A1, A2, B1, C2			88	54,65
		ostali genotipi			73	45,35
		SKUPAJ A1, A2, B1			81	50,31
		SKUPAJ vsi izolati iz živali			161	100,00

Šest genotipov je bilo ugotovljenih pri več vrstah živali. Genotip A1 je bil ugotovljen pri izolatih iz kokoši nesnic, piščancev, brojlerjev puranov, prašičev in drobnice. Genotip A2 je bil ugotovljen pri izolatih iz kokoši nesnic, jarkic, brojlerjev, puranov, prašičev in miši. Genotip A5 je bil ugotovljen pri izolatih iz brojlerjev in puranov. Genotip A14 je bil ugotovljen pri izolatih iz brojlerjev in noja. Genotip B1 je bil ugotovljen pri izolatih iz kokoši nesnic, brojlerjev, puranov, prašičev, plazilcev, mestnih golobov in iz noja. Genotip C2 je bil ugotovljen pri izolatih iz kokoši nesnic, prašičev, mestnih golobov. Ostali genotipi so bili ugotovljeni samo pri eni vrsti živali (Tabela 32).

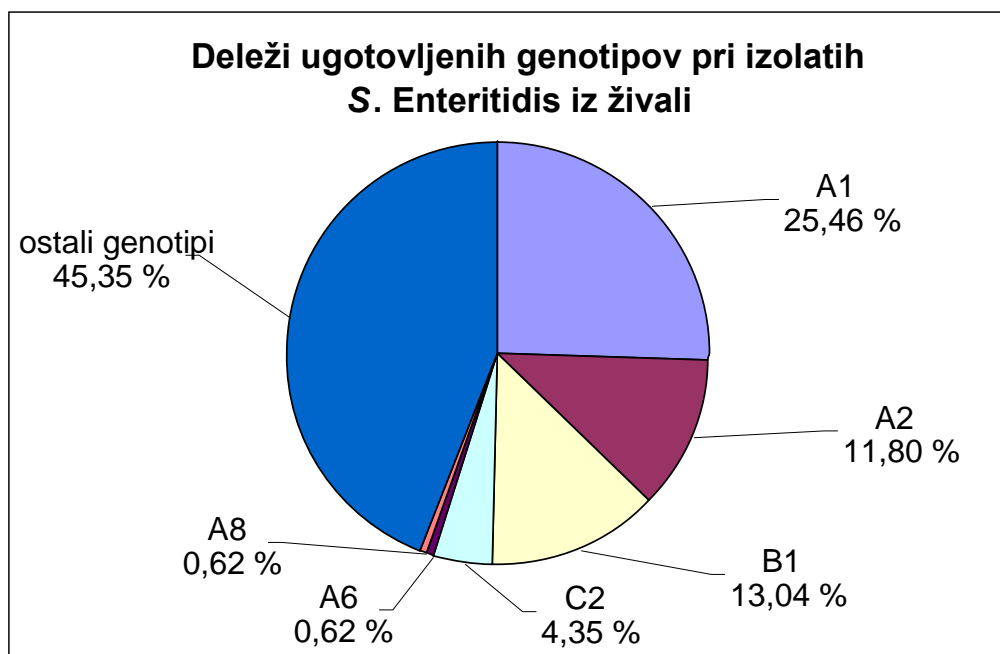
Tabela 34: Najpogosteje ugotovljeni genotipi pri izolatih iz živali, prikazani po geografskih področjih.
Table 34: The most frequently detected genotypes in isolates from animals shown by geographical areas.

Genotip	NM	MB	MS	CE	LJ	KR	PO	NG	SKUPAJ
A1	6	2	7	6	9	5	4	2	41
A2	4	6	0	1	5	1	0	2	19
B1	2	3	7	3	3	0	1	2	21
C2	0	0	1	0	1	4	1	0	7

Legenda: CE – Celje; KR – Kranj; LJ – Ljubljana; MB – Maribor; MS – Murska Sobota; NM – Novo mesto,
PO – Postojna, NG – Nova Gorica

Legend: CE – Celje; KR – Kranj; LJ – Ljubljana; MB – Maribor; MS – Murska Sobota; NM – Novo mesto.

Genotip A1 je bil ugotovljen pri izolatih iz živali, iz vseh regij. Genotip A2 je bil ugotovljen pri izolatih iz živali iz vseh regij razen Murske Sobote in Postojne. Genotip B1 je bil ugotovljen pri izolatih iz živali iz vseh regij razen Kranja. Genotip C2 je bil ugotovljen pri izolatih iz živali s področja Murske Sobote, Ljubljane, Kranja in Postojne.



Slika 34: Deleži genotipov A1, A2, A6, A8, B1 in C2 iz zbirke izolatov *S. Enteritidis* iz živali, ki smo jih uvrstili v izračun deležev (n = 161).

Figure 34: Shares of genotypes A1, A2, A6, A8, B1 and C2 in collection of the isolates of *S. Enteritidis* from animals, which we have used in the calculation of the shares (n = 161).

Pri izolatih iz živali smo ugotovili 47 genotipov, od tega jih je bilo 41 ugotovljenih samo pri živalih. Pri izolatih iz ljudi smo ugotovili 17 genotipov, od tega jih je bilo 11 ugotovljenih samo pri človeku, po en genotip je bil ugotovljen pri izolatu iz soje (J) in mesne moke (B4). Genotipi A1, A2, A6, A8, B1 in C2 so bili skupni živalim in človeku. Delež genotipov, ki niso skupni živalim in ljudem, je bil pri izolatih iz živali 44 % in pri izolatih iz ljudi 9,8 %.

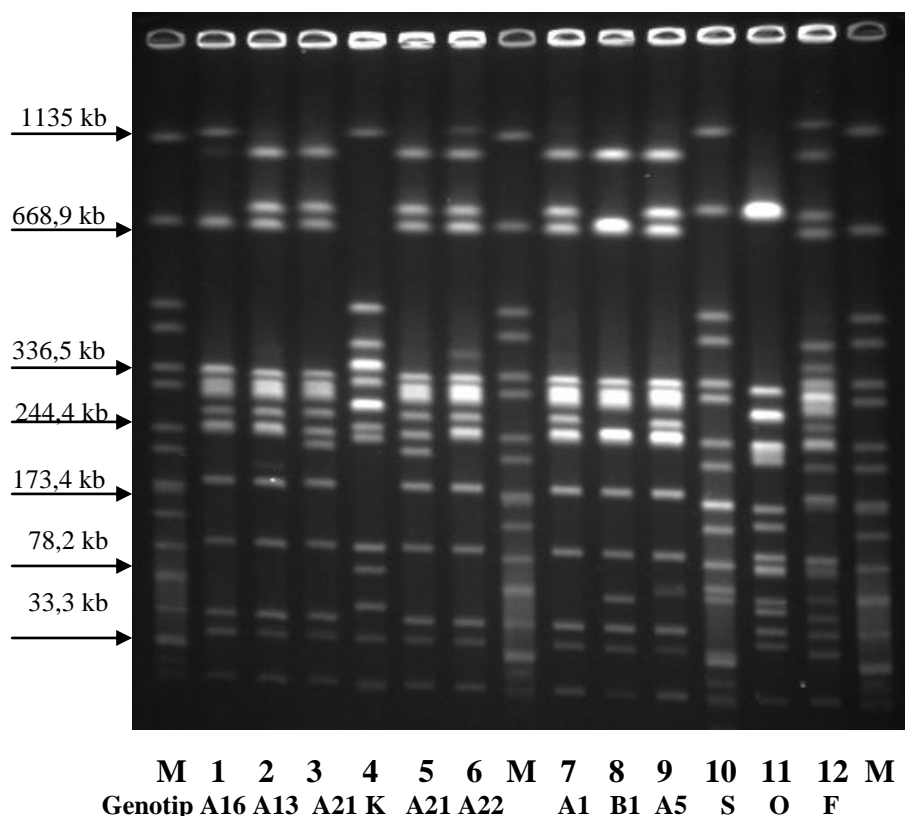
Rezultat kaže na večjo pestrost genotipov izolatov iz živali. Podatki so prikazani na sliki 35, ki je v prilogi.

Tabela 35: Prikaz števila izolatov (n = 174) in deležev najpogosteje ugotovljenih genotipov A1, A2, B1 in C2 pri izolatih *S. Enteritidis* iz ljudi.

Table 35: The number of isolates (n = 174) and shares of the most prevalent identified genotypes A1, A2 and B1 in isolates of *S. Enteritidis* from humans.

Genotip	Št. izolatov	%
A1	38	21,83
A2	61	35,05
B1	39	22,41
C2	6	3,44
ostali genotipi	30	17,24
SKUPAJ vsi izolati	174	100,00
DELEŽ A1, A2, B1	138	79,31
DELEŽ A1, A2, B1, C2	144	82,75

Trije najbolj razširjeni genotipi pri izolatih iz ljudi A1, A2 in B1 so zajeli večino izolatov iz zbirke. Največji delež pripada genotipu A2.

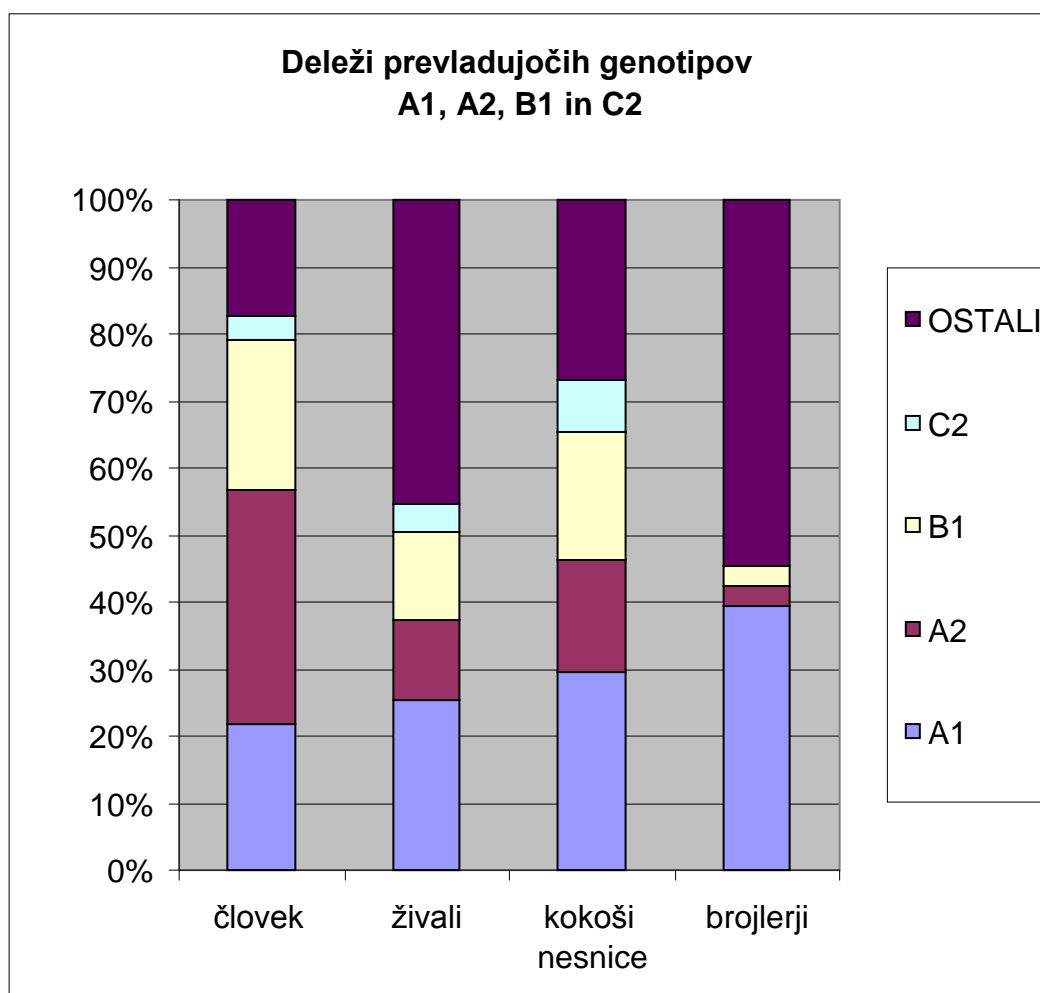


Slika 36: Na sliki je primer rezultatov genotipizacije izolatov *S. Enteritidis* iz živali. Prikazani so genotipi izolatov: iz puranov (1, 7); iz brojlerjev (2 – 6, 8 – 10) iz prašičev (11, 12). Na sliki so trije označevalci velikosti (M) z navedbo velikosti PFGE produktov v kb.

Figure 36: Example of results of genotyping isolates of *S. Enteritidis* from animals. The figure shows the genotypes of isolates from turkeys (1, 7), from broilers (2 – 6, 8 – 10), from pigs (11, 12). The figure shows three size markers (M) with size of PFGE products in kb.

4.10 Epidemiološke povezave med okužbami s *S. Enteritidis* pri živalih in ljudeh

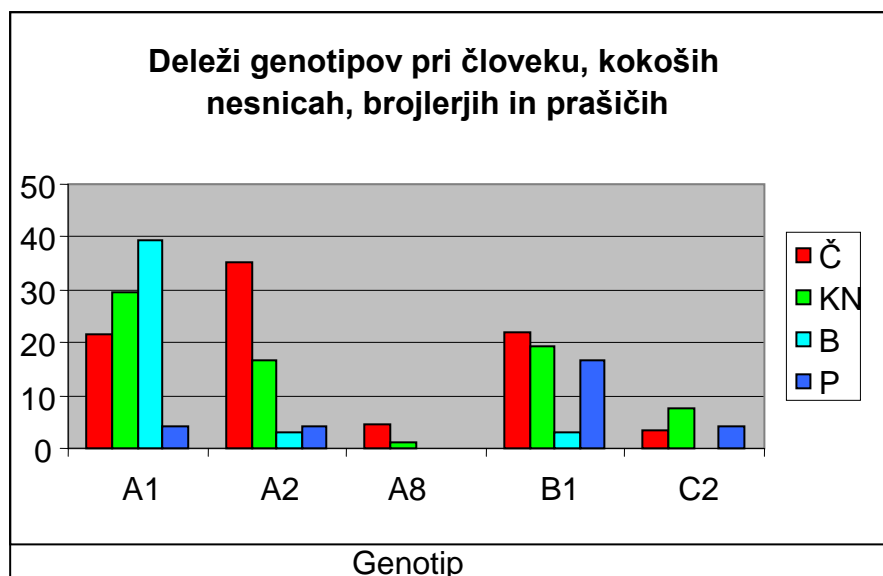
Pri epidemiološki analizi izolatov *S. Enteritidis* smo ugotovili, da je bilo 6 genotipov (A1, A2, A6, A8, B1 in C2) ugotovljenih pri človeku in eni ali več vrstah živali (Tabela 32). Skupaj so bili ti genotipi ugotovljeni pri 247 od 335 izolatov, kar je 73,73 % vseh izolatov, uvrščenih v izračun deležev genotipov. Pri izolatih iz ljudi so prevladujoči genotipi (A1, A2, B1 in C2) zajeli 82,75 % (144/174) izolatov, pri izolatih iz živali pa 54,65 % (88/161). Razlika je bila 28 % (CI 17,8 % - 37,7 %) in je statistično značilna ($P < 0,0001$). Širjenje in kroženje izolatov je omejeno na manjše število genotipov ali klonov, kar je bolj izraženo pri izolatih iz ljudi kot pri izolatih iz živali.



Slika 37: Prikaz deležev prevladujočih genotipov pri izolatih *S. Enteritidis* iz ljudi, živali (vsi vzorci iz živali) ter posebej kokoši nesnic in brojlerjev.

Figure 37: Shares of dominant genotypes in isolates of *S. Enteritidis* from humans, animals (all isolates from animals) and separately laying hens and broilers.

Pri primerjavi deležev genotipov iz človeka in živali je bila ugotovljena statistično značilna razlika pri genotipu A2, razlika v deležih je bila 23,46 % (95 % CI 14,15 % – 32,27 % , $P < 0,0001$). Pri genotipu A1 je bila razlika 3,5 % ($P = 0,5331$) in pri genotipu B1 8,92 % ($P = 0,0453$). Razlike v deležih niso statistično značilne. Pri izolatih iz kokoši nesnic so prevladujoči genotipi zajeli 73,06 % izolatov. V primerjavi z izolati iz človeka je bila razlika v deležu prevladujočih genotipov 9 %. Statistična primerjava je pokazala, da ni statistično značilne razlike ($P = 0,1449$) med zbirkami izolatov iz ljudi in kokoši nesnic. Pri primerjavi posameznih genotipov izolatov iz ljudi in kokoši nesnic je bila ugotovljena statistično značilna razlika pri genotipu A2, in sicer 18,3 % (95 % CI 6,02 % – 29,04 % , $P < 0,0049$). Pri genotipu A1 je bila razlika 7,6 % ($P = 0,2494$), pri genotipu B1 3,18 % ($P = 0,6872$) in pri genotipu C2 4,25 % ($P = 0,2520$). Razlike v deležih niso bile statistično značilne. Pri izolatih iz brojlerjev je močno izstopal genotip A1. Pri primerjavi deleža genotipa A1 pri izolatih iz živali in brojlerjev je bila razlika 13,93 %, razlika ni bila statistično značilna ($P = 0,1575$). Pri primerjavi z deležem genotipa A1 pri kokoših nesnicah je bila razlika 9,91 %, razlika ni bila statistično značilna ($P = 0,0566$). Pri primerjavi z deležem genotipa A1 pri človeku je bila razlika 17,56 %, razlika ni bila statistično značilna ($P = 0,0541$).

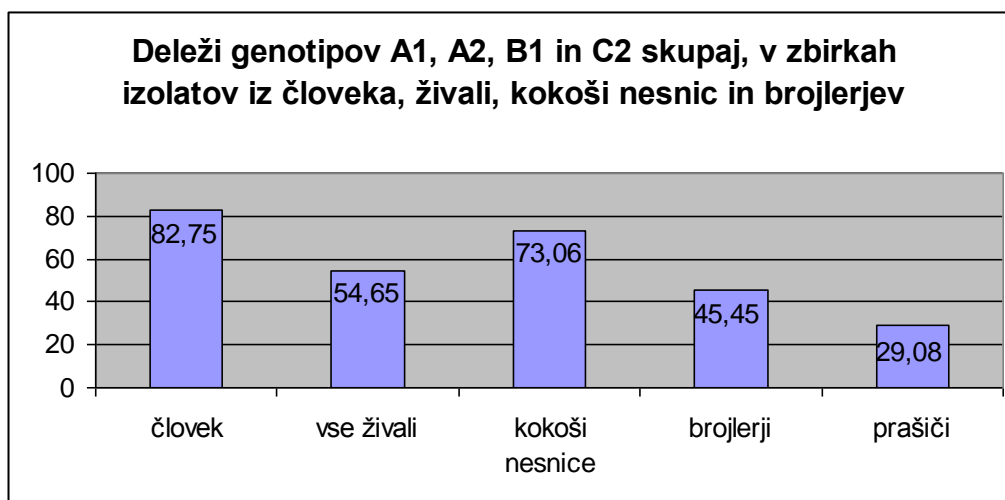


Legenda: Č – človek; KN – kokoši nesnice; B – brojlerji; P – prašiči
 Legend: Č – man; KN – laying hens; B – broilers; P – pigs

Slika 38: Prikaz deležev genotipov, ugotovljenih pri človeku ($\check{C}n = 174$), kokoših nesnicah ($KNn = 78$), brojlerjih ($Bn = 33$) in prašičih ($Pn = 24$).

Figure 38: Proportion of genotypes identified in the man ($\check{C}n = 174$), laying hens ($KNn = 78$), broilers ($Bn = 33$) and pigs ($Pn = 24$).

Enake genotipe kot pri človeku smo ugotovili pri kokoših nesnicah (A1, A2, A8, B1 in C2), brojlerjih (A1, A2 in B1), prašičih (A1, A2, B1 in C2), puranih (A1, A2 in B1), drobnici (A1), miših (A2), noju (B1), mestnem golobu (B1 in C2) in plazilcih (A6 in B1) (Tabela 32). Genotipi, A15 (1/174), A20 (2/174), B6 (2/174), B7 (3/174), C5 (1/174), G (2/174), I (1/174), L (1/174), N (2/174), R (1/174) in Z (1/174) so bili ugotovljeni samo pri človeku. Pri ugotavljanju skupnega deleža štirih najpogosteje ugotovljenih genotipov A1, A2, B1 in C2, ki so razširjeni pri živalih in pri človeku, se je pokazalo, da ti štirje genotipi zajamejo večino izolatov iz zbirke izolatov iz človeka, kokoši nesnic, brojlerjev in prašičev. Delež pri človeku je 82,75 % (144/174), pri živalih skupaj 54,65 % (88/161), pri kokoših nesnicah 73,06 % (57/78), pri brojlerjih 45,45 % (15/33) in pri prašičih 29,06 % (7/24). Deleža, ugotovljena pri izolatih iz vseh živali in človeka, se statistično značilno razlikujeta ($P < 0,0001$). Deleža, ugotovljena pri izolatih iz vseh živalih in kokoši nesnic se statistično značilno razlikujeta ($P = 0,0096$). Deleža, ugotovljena pri izolatih iz vseh živali in brojlerjev, se ne razlikujeta ($P = 0,4393$). Tudi deleža, ugotovljena pri izolatih iz človeka in kokoši nesnic, se ne razlikujeta ($P = 0,1096$). Deleža ugotovljena pri izolatih iz vseh živali ter prašičev pa se razlikujeta ($P = 0,0341$).

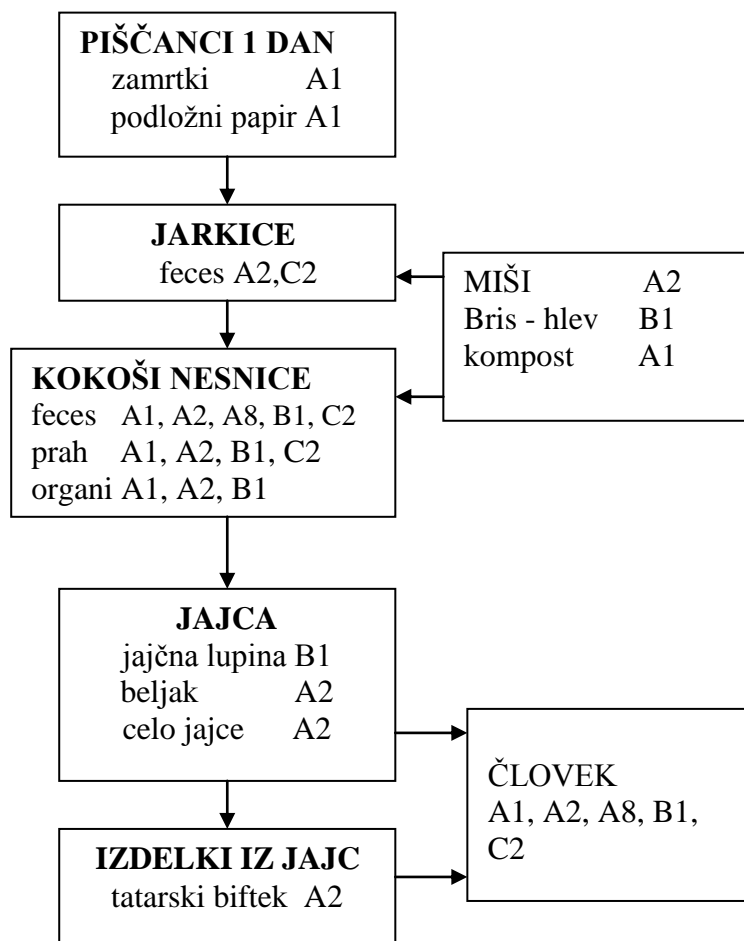


Slika 39: Prikaz deležev genotipov A1, A2, B1 in C2 skupaj, ugotovljenih pri človeku (n = 174), vseh živali (n = 161), kokoših nesnicah (n = 78), brojlerjih (n = 33) in prašičih (n = 24), vse živali – vsi izolati iz živali skupaj.

Figure 39: Shares of genotypes A1, A2, B1 and C2, together identified in humans (n = 174), all animals (n = 161), laying hens (n = 78), broilers (n = 33) and pigs (n = 24), all animals - all isolates from animals.

V raziskavo samo uvrstili tudi izolate iz živil. Genotipe, ki so bili skupni človeku in živalim, smo ugotovili tudi pri izolatih iz živil, in sicer iz jajc (A2 in B1), mletega mesa in fižola (A2), tatarskega bifteka (A2) in iz mesnega pripravka (C2).

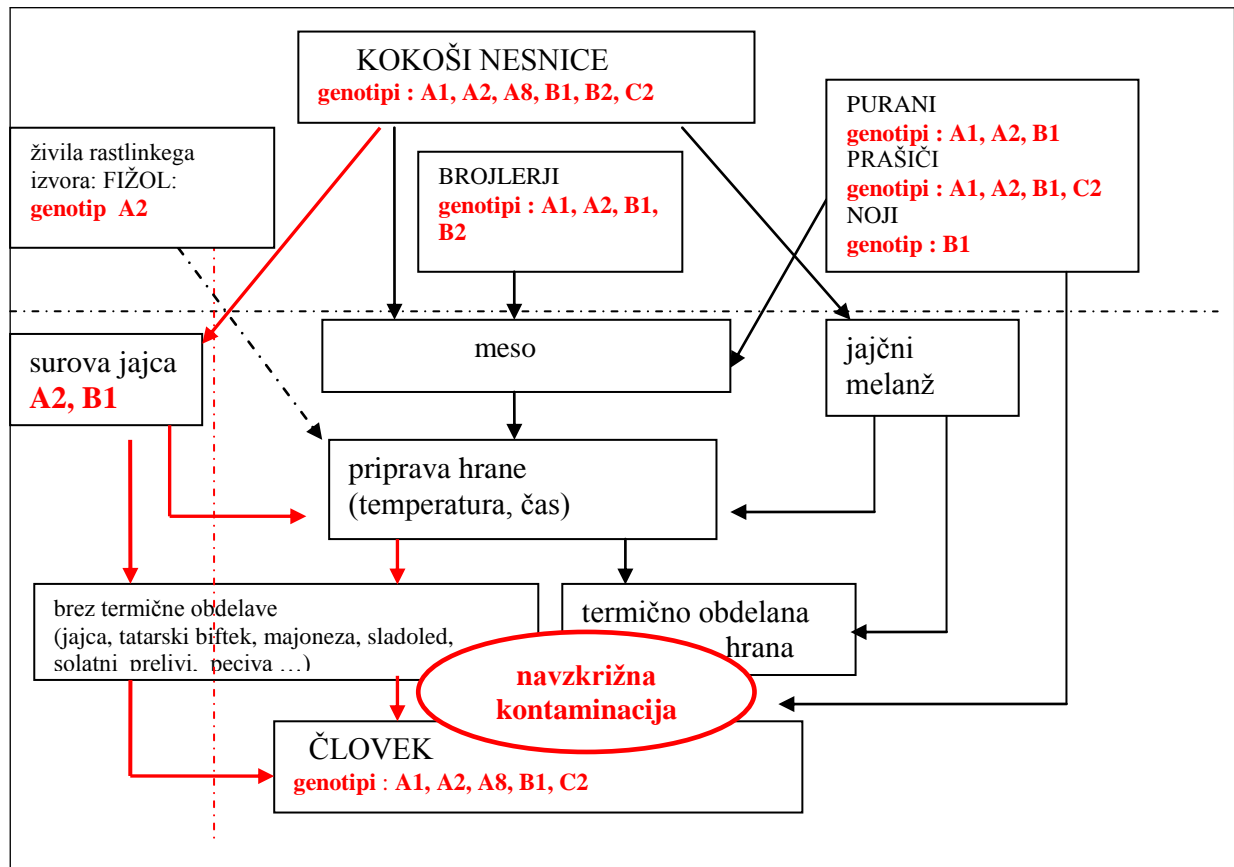
Na povezavo med okužbami s *S. Enteritidis* ljudi in plazilcev, kaže ugotovitev genotipa A6 tako pri ljudeh (n = 5) kot pri plazilcih (n = 1). Genotipa A6 nismo ugotovili pri drugih vrstah živali (Tabela 32). Deleži posameznih genotipov pri človeku se ujemajo z deleži genotipov pri kokoših nesnicah, statistično značilno se razlikujeta deleža genotipa A2. Deleža prevladujočih genotipov (A1, A2, B1 in C2) sta pri ljudeh 82,75 % in pri kokoših nesnicah 73,06 %. Ugotovitve kažejo na to, da so kokoši nesnice vir okužbe s *S. Enteritidis* za ljudi. Ugotovitev potrjuje tudi analiza izbruha okužbe pri ljudeh. Ugotovili smo, da so bila zelo verjetno vir okužbe ljudi s *S. Enteritidis* surova jajca.



Slika 40: Shematski prikaz ugotovljenih genotipov pri izolatih *S. Enteritidis*, izoliranih pri različnih kategorijah kokoši nesnic v okolju, iz jajc in pri človeku ter možne povezave med njimi.

Figure 40: Schematic diagram showing genotypes found in isolates of *S. Enteritidis* isolated from different categories of laying hens in an environment, from eggs and humans and possible routes of connection between them.

Pri izolatih iz enodnevnih piščancev ($n = 3$) je bil ugotovljen genotip A1, pri izolatih iz jarkic ($n = 5$) genotipa A1 in C2, v jajcih ($n = 3$) A2 in B1, v organih miši genotip A1, v izolatu iz hleva za rejo kokoši B1 in v izolatu iz komposta s fecesom kokoši nesnic A1. Rezultat ugotovljenih možnih povezav v procesu vzreje in reje kokši nesnic je proizvodnja okuženih jajc, ki so vir okužbe za ljudi (A1, A2, A8, B1 in C2) (Slika 40).



Slika 41: Prikaz ugotovljenih genotipov pri izolatih iz kokoši nesnic, surovih jajc, brojlerjev, puranov, prašičev, noja, fižola in človeka ter možnih poti okužbe človeka s *S. Enteritidis* in možnih povezav.

Figure 41: Schematic diagram showing genotypes found in isolates from laying hens, raw eggs, broilers, turkeys, pigs, ostriches, beans, and man and possible routes of human infection with *S. Enteritidis*.

Enaki genotipi so bili ugotovljeni pri kokoših nesnicah, surovih jajcih, brojlerjih, puranih, prašičih, noju in pri ljudeh: A1, A2, A8, B1 in C2, kar nakazuje možne povezave med okužbami živali in ljudi (Slika 41).

5 RAZPRAVA

V številnih državah po svetu so okužbe z bakterijami v živilih najpogostejši vzrok za nastanek bolezni želodca in črevesja pri ljudeh. Več kot 90 % okužb z živili povzročajo bakterije iz rodov *Salmonella* in *Campylobacter* (Thorns, 2000). Število okužb s salmonelami je v Sloveniji veliko, v letu 2009 je bilo 626 primerov ali 30,6/100 000 prebivalcev (IVZ, 2010). Dejansko število okužb pa je še bistveno višje, ker tudi pri dobrem sistemu poročanja število prijavljenih primerov predstavlja samo vrh ledene gore v odnosu na dejansko stanje (De Jong in Ekdahl, 2006).

V naši raziskavi smo s tipizacijo in primerjavo izolatov iz živali in ljudi želeli raziskati okužbe s *S. Enteritidis* pri živalih ter povezave med okužbami živali in ljudi ter z novimi spoznanji prispevati k razvoju metod za preventivo, zatiranje in nadzor okužb s *S. Enteritidis*. V raziskavi smo s tipizacijo zbranih izolatov *S. Enteritidis* s PFGE ugotovili razlike v genomu izolatov, kar nam je omogočilo ugotavljanje stopnje genetske raznolikosti. Ob pomoči epidemioloških podatkov smo raziskali, kateri genetski tipi so razširjeni pri živalih in ljudeh, kako so razširjeni geografsko ter kakšne so povezave med njimi.

Namen raziskave je bil tudi ustvariti bazo podatkov o izolatih iz živali, ki bi bila vir epidemioloških spoznanj o izvoru okužb, širjenju in kroženju *S. Enteritidis* v prehranski verigi. S stalnim in načrtnim epidemiološkim spremljanjem kroženja bakterije v prehranski verigi se baza podatkov postopoma dopolnjuje, kar omogoča epidemiološko analizo novih primerov okužb s *S. Enteritidis*. Tudi Singh in sod. (2006) ugotavljajo, da je za ugotovitve o variabilnosti genoma organizma ključna vzpostavitev velike zbirke podatkov o organizmu. Zbirka podatkov na osnovi restriksijskih vzorcev je zaradi njihove stabilnosti in visokega odstotka ponovljivosti rezultatov, pridobljenih s PFGE, tudi mednarodno primerljiva (Thong in sod., 1995; Singh in sod., 2006).

Že vrsto let se izvajajo monitoringi, temeljne študije in zbirajo podatki o izolatih *S. Enteritidis* pri živalih in pri ljudeh. Doslej v Sloveniji pa še ni bila opravljena raziskava, ki bi rezultate in ugotovitve posameznih monitoringov in študij analizirala kot celoto. Za poznavanje stanja in gibanja okužb s *S. Enteritidis* je pomembno, da s pomočjo teh podatkov pridobimo dodatne informacije o izolatih ter o povezavah okužb pri živalih z okužbami ljudi v Sloveniji.

V pričujoči raziskavi smo epidemiološkim podatkom dodali informacije, pridobljene z metodo genotipizacije (PFGE), ki omogoča razlikovanje sevov znotraj posameznega serovara salmonel. V zbirki izolatov, ki smo jih uvrstili v našo raziskavo, smo ugotovili, da so se

neopredeljeni genotipi razlikovali tudi do 53 odstotkov, večina genotipov *S. Enteritidis* pa si je bila od 83–100-odstotno podobna. Zaradi majhnih razlik v genomu najpogosteje ugotovljenih tipov smo kot kriterij za razlikovanje genotipov uporabili razliko v enem pasu. Tudi van Belkum in sod. (2007) dopuščajo, da razlika samo v enem pasu lahko pomeni različno biološko in epidemiološko poreklo seva. Zato je tudi razlika v enem pasu lahko osnova za razlikovanje med izolati.

Kljub poudarjeni genetski homogenosti smo pri izolatih *S. Enteritidis* ugotovili, da se v populaciji nahaja večje število genotipov *S. Enteritidis*. Pri analizi 368 izolatov smo ugotovili 60 genotipov. Restriksijski vzorci so se razlikovali v enem, dveh, treh in tudi več pasovih. V zbirki izolatov so prevladovali genotipi A1, A2 in B1, ki so bili močno razširjeni in so kazali tendenco širjenja. Genotipi, ki smo jih opredelili kot razširjene v prehranski verigi in imajo tendenco širjenja, so bili ugotovljeni pri dveh ali več vrstah živali in pri človeku, bili so geografsko razširjeni in so bili izolirani vsaj v dveh različnih letih. Tendenca širjenja je bila ugotovljena tudi pri genotipih A5, A8, A14 in C2. Rezultati analize potrjujejo genetsko homogenost in klonalno širjenje *S. Enteritidis* v Sloveniji in so skladni z ugotovitvami drugih avtorjev. Širjenje samo nekaterih genotipov so ugotovili tudi Thong in sod. (1995), Liebana in sod. (2002), Pang in sod. (2007), ki menijo, da so določeni kloni razširjeni pandemično po celem svetu, saj so bili enaki kloni ugotovljeni v ZDA, EU, Tajvanu, Maleziji in Koreji.

Prevladujoči tipi A1, A2 in B1 so najpogosteje ugotovljeni pri kokoših nesnicah. V raziskavi smo ugotovili, da je človeku in živalim skupnih samo 6 genotipov, 5 od tega jih je ugotovljenih pri kokoših nesnicah in v jajcih. Klonalno širjenje je bilo bolj izrazito pri izolatih iz ljudi kot pri izolatih iz živali. Murase in sod. (1995) navajajo, da se restriksijski vzorci *S. Enteritidis* zaradi točkovnih mutacij praviloma ne spreminjajo. Stabilni lahko ostanejo tudi pri genetskem premiku iz enega fagotipa v drugega (Tassios in sod., 1997). Ugotovitve kažejo na to, da so restriksijski vzorci, ki smo jih določili, dovolj stabilni biološki označevalci, ki omogočajo tudi dolgoročno epidemiološko raziskovanje in spremljanje okužb.

Vendar lahko z omejenim obsegom podatkov pride tudi do napačnih zaključkov glede epidemioloških značilnosti določenega klona v prehranski verigi (Singh in sod., 2006; Pang in sod., 2007). Za epidemiološko spremljanje okužb s *S. Enteritidis* je potrebno ustvariti stalno zbirko izolatov in določiti standardne postopke tipizacije. Zbirka restriksijskih vzorcev bo omogočila odkrivanje hitrosti širjenja pomembnih tipov *S. Enteritidis* v prehranski verigi, odkritje pojava novega tipa, odkrivanje tipov *S. Enteritidis* z večjim potencialom širjenja, epidemiološko raziskovanje epidemij in odkrivanje izvora sevov *S. Enteritidis*, ki so povzročitelji okužb pri živalih in človeku.

5.1 Epidemiološka analiza okužb kokoši nesnic

S. Enteritidis je povzročiteljica večine okužb ljudi s salmonelami. Pomemben vir teh okužb pa so s *S. Enteritidis* okužene kokoši nesnice. Povezave med okužbami v jatah kokoši nesnic in okužbami pri ljudeh so potrdili številni raziskovalci (Rodrigue in sod., 1990; Poppe in sod., 1991; Guard-Petter, 2001; Crum Cianflone, 2008; Callaway 2008; Stevens in sod., 2009; Gantois in sod., 2009; EFSA, 2010). Okužbe so predvsem posledica uživanja surovih ali slabo termično obdelanih, kontaminiranih jajc in izdelkov iz jajc. *S. Enteritidis* ima še posebno afiniteto do kolonizacije reproduktivnega trakta, kjer se jajca okužijo že v procesu formiranja (Keller in sod., 1995; Guard-Petter, 2001; Gantois in sod., 2009).

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, kakšna je genetska raznolikost med sevi, ki povzročajo okužbe pri kokoših nesnicah. Ugotovljena je bila znatna genetska raznolikost med sevi, skupaj smo ugotovili 16 različnih genotipov, med katerimi je bilo šest genotipov ugotovljenih pri štirih ali več izolatih in razširjenih v več rejah, ostale genotipe pa smo našli pri enem ali dveh izolatih. Genotipi A1, A2, B1 in C2, so bili najpogosteje ugotovljeni genotipi v naši zbirki in so zajeli 73,06 % izolatov iz kokoši nesnic, ki smo jih uvrstili v raziskavo. Ugotovljeni so bili pri izolatih, pridobljenih v obdobju petih let z več geografskih področij v Sloveniji.

Nadalje smo želeli ugotoviti, kateri genotipi so razširjeni pri posameznih kategorijah kokoši. Okužba s prevladujočimi sevi je bila razširjena tudi pri različnih kategorijah kokoši nesnic (enodnevnih piščanceh, jarkicah in odraslih nesnicah) in kontaminirana so bila tudi jajca. Število izolatov iz enodnevnih piščancev (4/78), jarkic (5/78) in jajc (3/78) je bilo majhno, smo pa enake genotipe, kot so bili ugotovljeni pri teh kategorijah živali, ugotovili tudi pri odraslih kokoših nesnicah. Ugotovitve nakazujejo, da se lahko okužba iz valilnice z enodnevnimi piščanci vertikalno prenese v rejo kokoši nesnic, kjer se obdrži med vzrejo jarkic tudi v obdobje nesnosti, kar ugotavljata tudi Gast in Holt (1998), ni pa bila ugotovljena povezava med okužbami s sevom določenega genotipa in določeno kategorijo kokoši nesnic.

Prav tako je bila ugotovljena okužba z istim genotipom v dveh in tudi več jatah, ki so si sledile na okuženem gospodarstvu, kar je verjetno posledica prenosa okužbe iz jate v jato zaradi ohranjanja okužbe v hlevu, pri glodalcih, žuželkah, divjih pticah. Prenos okužbe na novo jato, pri kateri je bil dokazan isti genotip, je bil ugotovljen na gospodarstvih GA, GB in GF. Prenos okužbe iz okužene v novo jato ugotavljajo tudi Davies in sod. (2001), Corry in sod. (2002) in Callaway in sod. (2008). *S. Enteritidis* lahko preživi najmanj eno leto v

praznem hlevu in tudi do 26 mesecev v okuženi krmi (Kim in sod., 2007; Arnold in sod., 2010). V raziskavi so nas zanimale tudi povezave z okužbami drugih vrst živali in ljudi. Enake genotipe kot pri kokoših nesnicah smo ugotovili tudi pri brojlerjih, puranih in prašičih. Neposredne povezave med okužbami kokoši nesnic in drugih vrst rejnih živali na podlagi zbranih epidemioloških podatkov nismo ugotovili. Rezultati tipizacije kažejo, da se kokoši nesnice, druge vrste domačih živali in ljudje okužujejo z enakimi tipi *S. Enteritidis*. Prav tako smo enake genotipe kot pri kokoših nesnicah ugotovili še pri mestnih golobih, miših, na hlevskih površinah in prahu. Okužba s *S. Enteritidis* se med rejami živali lahko prenese z glodalci, divjimi pticami, žuželkami, vodo, krmo ali z ljudmi (Henzler in Opitz, 1992; Guard-Petter, 2001; Heyndrickx in sod., 2007; Holt in sod., 2007; Callaway in sod., 2008). Do okužbe živali lahko pride že v valilnici (Davies in sod., 2001; Corry in sod., 2002) in se nato s slabo očiščenimi transportnimi kletkami prenese v več rej kokoši nesnic (Heyndrickx in sod., 2002; 2007), kar je lahko vzrok za pojavljanje enakih genotipov pri različnih kategorijah kokoši nesnic, drugih vrstah živali in tudi pri človeku.

5.2 Epidemiološka analiza okužb brojlerjev

Kot poroča EFSA (2007), je meso brojlerjev v državah EU pomemben vir okužb ljudi s salmonelami. V literaturi nismo zasledili podatkov, kakšen je delež okužb s salmonelami, katerih vir je meso brojlerjev v Sloveniji.

V naši raziskavi smo tipizirali 36 izolatov iz brojlerjev, pri katerih smo ugotovili 18 različnih genotipov, ki so se razlikovali v enem do štirih pasovih. Močno so prevladovali genotipi iz skupine A, od teh predvsem genotip A1, ki je bil ugotovljen pri 39,39 % izolatov, medtem ko sta bila genotipa A2 in B1 ugotovljena samo pri enem. Klonalno širjenje *S. Enteritidis* je bilo bolj izraženo kot pri kokoših nesnicah in je bilo v večini omejeno na genotip A1. Enaki genotipi so bili ugotovljeni tako iz vzorcev fecesa kot iz mesa brojlerjev. Tudi drugi avtorji so pri izolatih iz brojlerjev ugotavljali prevladujoč genotip. Kang in sod. (2009) so ugotovili prevladujoč oz. dominanten genotip pri 51,4 % izolatov iz raziskave. O podobnih rezultatih poročajo tudi Cardinale in sod. (2005), Cheong in sod. (2007) in Pang in sod. (2007), ki so pri primerjavi izolatov *S. Enteritidis* iz Nemčije in Tajvana z metodo PFGE ugotovili prevladujoč klon, kar lahko pomeni geografsko razširjenost določenega klona *S. Enteritidis*. O podobnih ugotovitvah poročajo tudi Thong in sod. (1995) za izolate iz Švice in Malezije, Tsen in Lin (2001) za izolate iz Tajvana, Filipinov in Malezije ter Liebana in sod. (2002) za izolate iz Anglije, Severne Irske, Španije, Hong Konga in ZDA.

Na podlagi ugotovljenih genetskih značilnosti izolatov iz brojlerjev nas je zanimalo, kakšne so povezave z izolati iz drugih vrst živali in ljudi. Tako so bili ugotovljeni enaki genotipi kot pri brojlerjih tudi pri kokoših nesnicah, prašičih, puranih in človeku. Pri izolatih iz brojlerjev in iz ljudi se deleža genotipa A1 statistično nista razlikovala ($P = 0,05$). Z metodo PFGE so povezave med okuženim mesom brojlerjev in okužbami s *S. Enteritidis* pri ljudeh ugotavljali tudi Woo (2005), Kim in sod. (2008) in Kang in sod. (2009). Okužene jate brojlerjev so vir *S. Enteritidis*, ki se iz reje brojlerjev do klavnice prenese z okuženimi živalmi, transportnimi kletkami in opremo v klavnici (Heyndricks in sod., 2007). Okužene živali imajo v prebavilih veliko število bakterij. Zaradi fekalne kontaminacije je tudi na koži in perju veliko bakterij (Bryan in Doyle, 1995). Med postopki zakola živali prihaja do navzkrižne kontaminacije med klavnimi trupi iste jate ter med okuženimi in neokuženimi jatami (Bem in sod., 2003; Heyndricks in sod., 2007).

Glede na ugotovitve v raziskavi je meso brojlerjev v Sloveniji lahko vir okužbe za ljudi. V letu 2010 je bilo v Sloveniji zaklanih 31.336.517 pitovnih piščancev (Statistični urad RS). Ugotovljena razširjenost *S. Enteritidis* pri brojlerjih v letu 2006 je bila 1,6 % (95 % CI 1,3 % – 1,9 %) (EFSA, 2007). Ugotovljena razširjenost *S. Enteritidis* je nizka, kar pa ima popolnoma drugačen epidemiološki pomen, če upoštevamo skupno število zaklanih brojlerjev (1,6 % je 501.384 trupov). Vsak okužen ali po zakolu kontaminiran trup piščanca je lahko vir okužbe za ljudi. Meso perutnine se običajno zaužije dovolj termično obdelano, da se salmonеле uničijo. Vendar pa lahko pride zaradi napak pri ravnanju s trupi med pripravo hrane do navzkrižne kontaminacije drugih živil, kar je v povezavi s prenizko temperaturo obdelave med pripravo jedi in s previsoko temperaturo hranjenja pripravljenih jedi lahko vzrok za izbruh okužbe pri ljudeh. Ker so bili pri izolatih iz brojlerjev ugotovljeni enaki genotipi kot pri ljudeh, je zelo verjetno, da je meso brojlerjev lahko vir okužb ljudi s *S. Enteritidis*. Zato je izvajanje postopkov za preprečevanje okužb perutnine v reji in proizvodnji mesa za zmanjšanje števila okužb ljudi nujno.

5.3 Epidemiološka analiza okužb puranov

Purani se s salmonelami največkrat okužijo v prvih dveh tednih po izvalitvi (Hafez in Stadler, 1997). Najpogosteje ugotovljen serovar salmonel pri puranih v temeljni študiji, izvedeni v letih 2006 in 2007, je bil *S. Infantis*, sledili sta *S. Saintpaul* in *S. Enteritidis*. Ugotovljena skupna razširjenost za *S. Enteritidis* in *S. Tyhimurium* pri puranih v Sloveniji je

bila 4,7 % (95 % CI 1,7 % – 12,1 %), povprečna v EU pa 3,5 % (95 % CI 3 – 5 %) (EFSA, 2008a).

V naši raziskavi je bilo genotipiziranih 8 izolatov *S. Enteritidis* iz puranov. Ugotovili smo 5 genotipov, najpogostejši so bili A1, A2 in B1. Vsi trije genotipi so bili ugotovljeni iz vzorcev podložnega papirja in iz organov enodnevnih puranov, ki so bili uvoženi. Ugotovitev kaže na geografsko razširjenost enakih genotipov. Enaki genotipi, kot so bili ugotovljeni in razširjeni v Sloveniji, so razširjeni tudi v državah izvora puranov.

Ugotovljeni genotipi pri puranih, ki so v večini enaki kot pri izolatih iz ljudi, kažejo na možne povezave med okužbami puranov in ljudi. V raziskavi povezav okužb puranov in ljudi s *S. Enteritidis* v Kanadi je bila ugotovljena majhna stopnja korelacije med izolati, izoliranimi pri človeku in pri puranih (Irwin in sod., 1993). Prav tako EFSA (2008b) poroča, da je ugotovljena majhna stopnja korelacije med serovari, izoliranimi pri človeku in pri puranih, zato je tveganje za okužbo s salmonelami pri mesu puranov veliko manjše kot pri ostalih vrstah perutnine. V naši raziskavi smo ugotovili genotipe, ki so razširjeni v prehranski verigi in ugotovljeni tudi pri ljudeh, kar kaže na to, da bi bilo meso puranov kljub temu lahko vir okužbe predvsem v primeru nezadostne termične obdelave ali navzkrižne kontaminacije živil.

5.4 Epidemiološka analiza okužb prašičev

Okužbe s *S. Enteritidis* so večinoma povezane z okužbami pri perutnini, še posebej v jatah kokoši nesnic, medtem ko so okužbe v rejah prašičev samo sporadične (Rodrigue in sod., 1990; Baggesen in sod., 2000; EFSA, 2008c). *S. Enteritidis* ni med najpogosteje ugotovljenimi serovari pri prašičih niti v ZDA niti v EU. V nasprotju s temi ugotovitvami je bil v Sloveniji, v raziskavi razširjenosti salmonel pri klavnih prašičih v EU v letih 2006 in 2007, najpogosteje ugotovljen serovar *S. Enteritidis*, sledili so mu *S. Typhimurium*, *S. Derby* in *S. Saintpaul* (EFSA, 2008a). EFSA (2010b) ugotavlja, da tiste države članice EU, v katerih se pojavlja *S. Enteritidis* pri prašičih (Poljska, Češka, Slovaška, Madžarska, Slovenija), poročajo tudi o relativno visoki prevalenci *S. Enteritidis* pri kokoših nesnicah in brojlerjih.

Pri izolatih iz prašičev so nas v naši raziskavi zanimale razlike in povezave med kategorijami plemenskih prašičev in prašičev pitancev. Z genotipizacijo 32 izolatov iz prašičev smo ugotovili 19 genotipov. V večini primerov so se genotipi izolatov iz plemenskih in pitovnih prašičev razlikovali, skupen je bil samo genotip B1. Na istem gospodarstvu je bilo hkrati okuženih več kategorij plemenskih živali s sevi z enakim genotipom. Gospodarstva za rejo

plemenskih prašičev so bila okužena s sevi *S. Enteritidis*, njihovi genotipi so se med gospodarstvi razlikovali.

Nadalje so nas zanimala povezave okužb prašičev z okužbami drugih domačih živali. Pri izolatih iz prašičev smo ugotovili genotipe A1, A2, B1 in C2, ki so bili močno razširjeni v prehranski verigi in so bili ugotovljeni tudi pri kokoših nesnicah, brojlerjih, puranih, nojih, drobnici in ljudeh. Ugotovljeni so bili pri posameznih izolatih, razen genotipa B1, ki je bil ugotovljen pri sedmih (7/32) izolatih. V zbirki izolatov iz prašičev smo ugotovili tudi genotipe, ki so bili ugotovljeni samo pri prašičih: A11, A12, B5, C3, genotipi iz skupine D (D1 do D7), genotip F, O, T in U. Delež genotipov, ki so bili ugotovljeni samo pri prašičih, je prevladoval (70,83 %). Možno je, da nekateri genotipi *S. Enteritidis* krožijo med rejami različnih vrst živali ali pa se te okužujejo iz istega vira. Povezave med prašiči in perutnino so ugotavljali tudi drugi avtorji (Rodrigue in sod., 1990; Baggesen in sod., 2000; EFSA, 2008c). V Sloveniji pogosto redijo več vrst živali na isti kmetiji, vendar na podlagi epidemioloških podatkov nismo ugotovili neposredne povezave med izolati iz okuženih rej prašičev in perutnine ali iz drugih vrst rejnih živali. Pri izolatih iz bezgavk prašičev smo ugotovili genotipe A1, A2, A11, A12, B1, C3, O in F. Genotipi A1, A2 in B1 so bili ugotovljeni tudi pri izolatih iz ljudi. Čeprav so bile ugotovljene salmonele v bezgavkah klavnih trupov in protitelesa v mesnem soku v 40 % vzorcev, odvzetih v temeljni študiji pri klavnih prašičih v Sloveniji (EFSA, 2008a), ni bil noben bris s površine klavnih trupov (n = 442) pozitiven na salmonele. To potrjuje, da je higiena pri proizvodnji mesa pomembna pri prizadevanjih za zmanjšanje možnosti okužbe mesa prašičev v klavnici in zmanjšanje tveganja za okužbo s salmonelami pri ljudeh.

Kljub temu, da smo ugotovili enake genotipe pri izolatih iz prašičev kot pri ljudeh, je večina genotipov ugotovljena samo pri prašičih. Rezultati nakazujejo, da epidemiološki pomen prašičev pri okužbah ljudi s *S. Enteritidis* ni tako velik, kot je pomen perutnine. Vendar na podlagi ugotovljenih genotipov izolatov iz prašičev ne moremo izključiti možnosti okužbe ljudi z živili, ki izvirajo od prašičev.

5.5 Epidemiološka analiza okužb plazilcev, mestnih golobov, nojev, ovc in miši

Plazilci so okuženi s številnimi serovari salmonel. Število okužb ljudi, pri katerih so vir plazilci, se povečuje (Bertrand in sod., 2008; Aiken in sod., 2010), vendar pa okužbe ljudi s serovarom *S. Enteritidis*, katere vir so plazilci, kljub temu niso pogoste. Na Nizozemskem so od leta 1984 do 2007, od več kot 2200 ugotovljenih salmoneloz epidemiološko povezanih s

plazilci, ugotovili 22 primerov okužb ljudi s *S. Enteritidis* (Bertrand in sod., 2008). V Veliki Britaniji ocenjujejo, da so plazilci vzrok za približno 1 odstotek okužb s salmonelami (Aiken in sod., 2010). Podatkov o številu okužb ljudi s salmonelami, katerih vir so bili plazilci, v Sloveniji nismo zasledili.

V raziskavi smo pri izolatih iz plazilcev (pitona in varana) ugotovili genotipa A6 in B1, ki sta bila ugotovljena tudi pri človeku. Genotip B1 je bil pogosto ugotovljen pri izolatih iz živali, medtem ko genotip A6 pri izolatih iz domačih živali ni bil ugotovljen. Na podlagi ugotovljenih genotipov pri izolatih iz plazilcev je mogoče zaključiti, da so plazilci lahko vir okužb s *S. Enteritidis*. Cardinale in sod. (2005) so ugotovili tudi razlike v genotipih, ugotovljenih pri perutnini in ljudeh, zato menijo, da obstajajo še drugi viri okužb ljudi s *S. Enteritidis*. Eden od virov so tudi plazilci, ki so v stiku s človekom kot hišne živali. Okužbam so izpostavljeni predvsem otroci (Aiken in sod., 2010).

Pri izolatih iz nojev in ovce smo ugotovili genotipa B1 in A1, ki sta razširjena v prehranski verigi. Pri mestnih golobih in miših smo ugotovili genotipa B1 in C2, ki sta prav tako razširjena v prehranski verigi. Ugotovitve kažejo na to, da so noji in ovce lahko vir kontaminiranih živil in da so mestni golobi in miši lahko vir okužbe za živali. Tudi Henzler in Opitz (1992) ugotavljata, da so miši pogosto okužene z enakimi sevi *S. Enteritidis* kot živali v reji.

5.6 Epidemiološka analiza okužb ljudi

Več kot 95 % okužb ljudi s salmonelami nastane z zaužitjem kontaminirane hrane. Vzrok za okužbo so največkrat jajca in izdelki iz jajc (Rodrigue in sod., 1990) in tudi meso perutnine, mleto meso, mlečni izdelki. Do okužbe ljudi lahko pride tudi s kontaminirano vodo ali z direktnim stikom z okuženimi rejnimi živalmi, tudi v stiku z mačkami, psi, glodalci in z direktnim stikom z okuženimi ljudmi (Callaway in sod., 2008; Crum Cianflone, 2008).

V naši raziskavi nas je zanimalo, kateri genotipi se pojavljajo pri okuženih ljudeh in kako so posamezni genotipi razširjeni. Z genotipizacijo je bilo ugotovljenih 17 genotipov, med katerimi so močno prevladovali A1, A2 in B1, ki so zajeli 79,31 % vseh izolatov iz ljudi.

Najpogosteje zastopani genotipi so bili ugotovljeni na vseh geografskih področjih v Sloveniji, ki so bila vir izolatov v raziskavi. Razširjenost posameznih genotipov se je po področjih razlikovala. Na področju Murske Sobote je močno in statistično značilno izstopal genotip B1. Na istem področju smo genotip B1 pogosto ugotovili tudi pri živalih. Sklepamo lahko, da genotip B1 *S. Enteritidis* na področju severovodne Slovenije pri okužbah ljudi prevladuje.

Nasprotno pa genotip B1 na področju Novega mesta ni bil pogost; delež je statistično značilno odstopal od deleža pri vseh izolatih iz ljudi.

Nekatere genotipe izolatov *S. Enteritidis* smo ugotovili samo pri ljudeh. Zato obstajajo zelo verjetno, poleg rejnih živali in živil živalskega izvora, še drugi viri okužbe, kar poročajo tudi Cardinale in sod. (2005). V naši raziskavi smo enake genotipe kot pri ljudeh ugotovili pri izolatih iz fižola, mestnih golobov, plazilcev, miši. Pri izolatu *S. Enteritidis* iz fižola smo ugotovili genotip A2, ki je bil pogosto ugotovljen pri izolatih iz ljudi in živali. Raziskovalci poročajo o številnih virih okužbe s *S. Enteritidis*, med njimi so tudi živila rastlinskega porekla (Pui in sod., 2011) in voda (Akinyemi in sod., 2010). Glede na izvor izolatov in z genotipizacijo ugotovljene povezave samo z ukrepi za izkoreninjenje okužb pri kokoših nesnicah ni mogoče preprečiti vseh okužb pri ljudeh.

5.7 Epidemiološka analiza okužb s *S. Enteritidis* pri živalih in pri ljudeh

Okoliščine okužb s *S. Enteritidis* so kompleksne, na njihov potek vplivajo številni dejavniki. Z zbranimi podatki o vrsti in izvoru živil, okoliščinah priprave hrane, uživanju hrane in vrsti povzročitelja se ne da vedno zanesljivo ugotoviti vira okužbe. Za epidemiološko raziskovanje je temeljnega pomena razlikovanje med izolati, saj to omogoča spremljanje nastanka okužbe. Potrebno je ugotoviti epidemiološko povezavo med vzrokom in posledico okužb. Tenover (1995) navaja, da je za epidemiološke raziskave potrebno opraviti tipizacijo izolatov, katere cilj je pridobiti laboratorijske dokaze, da so epidemiološko povezani izolati med izbruhom bolezni tudi genetsko povezani. Ugotovitev enakih genotipov še ne dokazuje povezanosti izolatov iz epidemije, nakazuje pa verjetnost istega porekla.

5.7.1 Okužbe pri živalih

Podrobno poznavanje epidemiologije okužb živali je osnova za pripravo učinkovitih nacionalnih programov za odkrivanje, zatiranje in preprečevanje okužb.

V naši raziskavi smo pri analizi primerov okužb s *S. Enteritidis* pri živalih ugotovili, da je lahko jata kokoši nesnic ali čreda prašičev okužena hkrati z več sevi *S. Enteritidis*, katerih genotipi se razlikujejo. Na gospodarstvu za rejo kokoši nesnic GH je bilo hkrati ugotovljenih 5 genotipov (Tabela 20). Razlikovali so se v enem ali več pasovih v restriktivnem vzorcu. Zato pri ugotavljanju vzroka okužbe živali ali ljudi samo en izolat iz posameznih virov

(kokoši nesnic, jajc, živila, človeka...) ne omogoča zanesljivega ugotavljanja povezav med viri okužbe. Pri epidemiološki raziskavi izbruha je zato potrebno pridobiti več vzorcev iz vsakega potencialnega vira okužbe za katerega se sumi, da bi lahko bil vzrok za epidemijo. Arnold in sod. (2010) ugotavljajo, da se lahko z odvzemom enega skupnega (angl. pool) vzorca fecesa in enega sestavljenega vzorca prahu, ki se uporablja v nacionalnih programih odkrivanja okužb s *S. Enteritidis* v jati, ugotovi 20-odstotno prevalenco s 93-odstotno zanesljivostjo. Z odvzemom desetih skupnih vzorcev fecesa in desetih skupnih vzorcev prahu pa je možno ugotoviti 0,1-odstotno prevalenco z 98-odstotno zanesljivostjo. Majhno število odvzetih vzorcev v okuženi reji je lahko vzrok, da se okužb v jatah z nizkim odstotkom okuženih kokoši ne odkrije, zlasti pa se ne odkrije vseh sevov, če je reja hkrati okužena z več sevi.

Glede na ugotovitve pri analizi okužb reje kokoši nesnic lahko ugotovimo, da je *S. Enteritidis*, ko se enkrat vnese v rejo, težko popolnoma izkoreniniti. Številni avtorji ugotavljajo, da je za zaščito reje pred vnosom *S. Enteritidis* pomembno izvajanje biovarstvenih ukrepov. Za uspešno zaščito reje ali izkoreninjenje okužbe v njej, je potrebno upoštevati, da ne obstaja ukrep, s katerim bi lahko v celoti rešili problem okužbe s *S. Enteritidis* (Forshell in Wierup, 2006; Callaway in sod., 2008). Uporabiti je potrebno več oziroma toliko ukrepov za preprečevanje vnosa salmonel, da skupaj zagotavljajo dovolj zanesljivo zaščito pred vnosom okužbe v rejo in so še vedno tudi ekonomsko sprejemljivi.

Pri okužbah na gospodarstvih za rejo kokoši nesnic smo poleg genotipov, ki so bili pogosto ugotovljeni in razširjeni pri več vrstah živali in ljudeh, ugotovili tudi genotipe, ki so bili ugotovljeni samo pri kokoših nesnicah in predstavljajo samo manjše odstopanje od genotipa, ki je prevladoval v reji. Tako smo na gospodarstvu GA ugotovili genotip C4, na gospodarstvu GB genotip B3 in na gospodarstvu GD genotip B3. Genetsko so zelo podobni prevladujočim genotipom (Dk je > 95,7 %), kar pomeni, da so verjetno posledica genetskih sprememb, ki so se zgodile v krajšem obdobju po okužbi in so lahko posledica pridobitve manjšega plazmida, vključitve ali delecije genskega materiala (Akinyemi in sod., 2010). Heyndrickx in sod. (2007) so ugotovili spremembo genotipa *S. Enteritidis* PT4 med vzrejo jarkic zaradi pridobljenega plazmida. Dopušča se možnost prenosa plazmidov med bakterijami v jati perutnine, kar so domnevali tudi Liebana in sod. (2001). Za te genotipe nismo ugotovili tendence širjenja ali kroženja med različnimi vrstami živali in tudi pri izolatih iz ljudi jih nismo ugotovili.

Tudi pri okužbi v reji prašičev smo ugotovili genotipe (skupina D (D1 – D7), B5, T in U), ki so bili ugotovljeni samo pri prašičih in niso bili razširjeni. Na gospodarstvu je bila

ugotovljena multiklonalna okužba, noben od teh genotipov pa ni bil ugotovljen pri drugih vrstah živali ali pri človeku (Tabela 32).

Okužene živali, predvsem s sevi s pogosto ugotovljenimi in razširjenimi genotipi, so rezervoar in vir okužb za druge živali, kontaminacije živil živalskega izvora in vir okužb ljudi. Lastnosti genotipov, ki so kazali samo manjše odstopanje od prevladujočih, pa se bodo pokazale s spremljanjem okužb skozi daljše obdobje.

Odkrivanje in zatiranje okužb živali ter nadaljnje spremljanje lastnosti povzročitelja je ključnega pomena pri prizadevanjih za zmanjšanje števila okužb ljudi.

5.7.2 Okužbe pri ljudeh

Cilj epidemioloških raziskav je odkriti in nadzorovati izvor okužbe pri ljudeh, ustrezno ukrepati (vzeti izdelek iz prometa, začasno prekiniti delo v restavraciji ali industrijskem obratu) in pridobiti spoznanja za učinkovitejše preprečevanje podobne epidemije v prihodnosti. Okužbe povzročajo velike ekonomske izgube, še posebej, če upoštevamo tudi kronične posledice akutnih okužb.

Pri izbruhu okužbe pri ljudeh obstaja neposredna povezava med povzročiteljem, virom okužbe in okuženimi ljudmi (Greig in Ravel, 2009). Povezave med njimi lahko ugotovljamo na podlagi zbranih epidemioloških podatkov ter izolacije in tipizacije povzročitelja. Pri ugotovljeni visoki stopnji genetske podobnosti izolatov povzročitelja obstaja velika verjetnost, da sta izolata povezana, še zlasti, če na to kažejo tudi epidemiološki podatki. Epidemiologija okužb, katerih vir so sestavljeni izdelki ali jedi, je kompleksna in zahteva veliko raziskovalnega dela. Vsaka od sestavin sestavljenega živila je lahko kontaminirana s *S. Enteritidis*. Sestavine so lahko okužene že pred pripravo ali pa se med pripravo navzkrižno kontaminirajo z živilom, ki sploh ni sestavina kontaminiranega izdelka ali celo obroka, ki je bil vzrok za okužbo. V raziskavi smo analizirali dva izbruha okužbe pri ljudeh. Izdelka, ki sta bila vzrok za okužbo, tatarski biftek in vanilijeva krema, sta bila sestavljena iz več sestavin, med njimi tudi iz surovih jajc, ki so bila v obeh primerih proizvedena na istem gospodarstvu, v dveh jatah, ki sta si sledili. Genotipa sevov, ki sta povzročila okužbo pri ljudeh v letu 2008 in 2009, sta se razlikovala. Na podlagi rezultatov analize lahko ugotovimo, da obstaja velika verjetnost, da izbruha okužbe pri ljudeh v letu 2008 ni povzročil sev *S. Enteritidis*, ki je bil ugotovljen na gospodarstvu izvora jajc. Seveda je bil lahko na gospodarstvu poleg seva

genotipa B1 prisoten še dodaten sev, tudi sev genotipa A2, ki je povzročil okužbo ljudi, vendar ni bil ugotovljen.

Arnold in sod. (2010) ugotavljajo, da se z odvzemom večjega števila vzorcev poveča verjetnost izolacije povzročitelja okužbe v jati. Vendar imamo pri raziskovanju izbruha okužbe *S. Enteritidis* največkrat na voljo omejeno število izolatov za tipizacijo in primerjavo. Med genotipi izolatov pa so tudi majhne razlike. Na podlagi rezultatov v naši raziskavi lahko ugotovimo, da določanje tipov *S. Enteritidis* na osnovi razlike v restrikcijskem vzorcu v enem ali dveh pasovih lahko pomembno prispeva k iskanju vira okužbe v epidemiološkem raziskovanju izbruha okužbe ljudi s *S. Enteritidis*. Enak pristop so uporabili tudi Thong in sod. (1995), Tsen in Lin (2001), Fernanadez in sod. (2003) ter Pang in sod. (2005, 2007). Raven razlikovanja med sevi pa se lahko poveča tudi z uporabo več metod tipizacije hkrati (Lacóncha in sod., 2000; Gunmundsdottir in sod., 2003; Delgado in sod., 2006; Kim in sod., 2008).

Ugotovitve pri epidemiološki analizi izbruha okužbe lahko prispevajo k boljšemu poznavanju lastnosti povzročitelja in pogosto načenjajo nova raziskovalna vprašanja ter vzbujajo potrebo po uvajanju novih metod tipizacije. Razreševanje teh vprašanj je pomembno za izvajanje učinkovitih preventivnih ukrepov v prehranski verigi za zagotavljanje varne hrane. To pa zahteva usklajeno organiziranje in izvajanje epidemioloških raziskav med inštitucijami s področja zdravstva in veterinarstva, kot ugotavljajo tudi Pate in sod. (2011).

5.8 Epidemiološke povezave med okužbami živali in ljudi s *S. Enteritidis*

Razumevanje dejavnikov, ki so vzrok za nastanek okužbe pri človeku, je ključnega pomena za oblikovanje programov javnega zdravstva in proizvodnih procesov (Woo, 2005). Da so okužbe ljudi povezane z okužbami živali, so potrdili že številni raziskovalci, ugotovljeni so bili zelo podobni ali enaki tipi salmonel pri različnih vrstah živali in pri ljudeh (Yan in sod., 2003). Povezave med okuženim mesom brojlerjev in okužbami ljudi s *S. Enteritidis* so potrdili Woo (2005), Kim in sod. (2008), Kang in sod. (2009), povezave z okužbami pri kokoših nesnicah in jajcih so ugotavljali Rodrigue in sod., 1990), Poppe in sod. (1991), Guard-Petter (2001), Callaway (2008), Crum Cianflone (2008), Stevens in sod. (2009), Gantois in sod. (2009), EFSA (2010).

V naši raziskavi nas je zanimalo, kateri tipi *S. Enteritidis* se pojavljajo pri živalih in pri ljudeh in kakšne so povezave med njimi. Z genotipizacijo izolatov iz ljudi in živali ter z analizo

epidemioloških podatkov lahko nakažemo na možne povezave med sevi *S. Enteritidis*, izoliranimi iz živali in ljudi. S tipizacijo izolatov *S. Enteritidis* smo ugotovili, da je bilo od 60 ugotovljenih genotipov 6 genotipov (A1, A2, A6, A8, B1 in C2) ugotovljenih pri človeku in pri eni ali več vrstah živali. Enake genotipe kot pri človeku smo ugotovili pri kokoših nesnicah (A1, A2, A8, B1 in C2), brojlerjih (A1, A2 in B1), prašičih (A1, A2, B1 in C2), puranih (A1, A2 in B1), drobnici (A1), miših (A2), nojih (B1), mestnih golobih (B1 in C2) in pri plazilcih (A6 in B1) (Tabela 32). Na podlagi ugotovljenih tipov *S. Enteritidis* pri živalih in pri človeku ter nakazanih povezav med njimi lahko opredelimo nekatere dejavnike, ki so vzrok za nastanek okužb ljudi:

1. Okužbe rejnih živali: Enake genotipe kot pri človeku smo ugotovili pri izolatih iz brisov površine v hlevu, pri miših, divjih pticah, kompostu, v jajcih, živilih. Pri primerjavi deležev genotipov, ki so skupni človeku in živalim, smo ugotovili, da se delež genotipov A1 in B1, ugotovljenih pri kokoših nesnicah, ne razlikuje od deleža pri ljudeh, zelo podobna sta tudi deleža genotipov A2 in C2. Na podlagi ugotovitev v raziskavi so nakazane tudi povezave med okužbami ljudi in okužbami pri brojlerjih, puranih, prašičih in plazilcih. Povezave med okužbami živali in ljudi nedvomno obstajajo, vendar pa smo tudi ugotovili, da ni podatkov o stopnji okuženosti s *S. Enteritidis* v nekaterih okoljih, npr. v rejah z manj kot 1000 kokošmi nesnicami in še pri nekaterih vrstah živali (race, prepelice, pegatke, noji), hišnih živalih, divjih pticah, glodalcih. Monitoringi pri perutnini se izvajajo samo v večjih rejah, stopnja okuženosti manjših rej ni znana. Prav tako nimamo podatkov o deležu okužb, ki nastanejo v tujini in se nato ugotovijo v Sloveniji. Pri preprečevanju okužb ljudi je potrebno upoštevati vse znane vire okužbe. Zato bi bilo potrebno nadaljnje spremljanje in raziskovanje okužb s *S. Enteritidis* tudi na teh področjih, ker je zatiranje okužb pri živalih bistvenega pomena za uspešno preprečevanje okužb ljudi.

2. Kontaminacija živil: Rejne živali so vir živil, ki so lahko kontaminirana s *S. Enteritidis*, če so bile živali okužene. Do kontaminacije živil pa lahko pride tudi kjerkoli na poti od živali do priprave hrane za uživanje. V raziskavi smo ugotovili enake genotipe *S. Enteritidis* kot pri ljudeh tudi pri izolatih iz jajc, mesa piščancev, mletega mesa, mesnih pripravkov. Ali bo prišlo do okužbe ljudi s kontaminiranim živilom, pa je odvisno od številnih dejavnikov. Na nastanek okužb pri ljudeh lahko pomembno vplivajo napake pri ravnanju z živilom. Zaradi navzkrižne kontaminacije in hranjenja živil pri sobni temperaturi lahko okužbo s *S. Enteritidis* povzroči večina živil, ki jih človek zaužije, če pridejo v stik s salmonelami. Do okužb ljudi v veliki meri prihaja tudi zato, ker razmnoževanje salmonel v jajcih ne povzroča

sprememb v barvi, vonju ali konsistenci jajčne vsebine (Gantois in sod., 2009). Organoleptično zaznavnih sprememb, ki bi opozarjale na prisotnost bakterije, prav tako ni pri drugih živilih. Do okužbe ljudi lahko pride tudi z uživanjem živil, ki so zadosti termično obdelana, če se že pripravljena hrana kontaminira v stiku s surovim, kontaminiranim živilom, bolnim človekom ali klicenoscem (Pui in sod., 2011). Lo Fo Wong in sod. (2002) in Braden (2006) poudarjajo, da so način ravnanja z živilom, čas priprave pred uživanjem hrane ter temperatura priprave in shranjevanja živil pomembni dejavniki pri preprečevanju okužb s hrano. Nadalje prispevajo k nastanku okužb tudi prehranske navade oziroma način priprave hrane. Pogosto je vzrok za okužbo uživanje živil, ki niso termično obdelana ali so obdelana pri temperaturi, s katero se *S. Enteritidis* ne uniči. Jajca se pogosto uživajo kot hrana ali kot dodatek drugim živilom, brez ali z nezadostno termično obdelavo, ki bi lahko uničila salmonele (Braden, 2006). Uživajo se sveža, mehko kuhana ali sveža dodana v jedi, na primer: doma pripravljene solatne prelive, majoneza, francoska solata, domača kremna peciva (sladoled, rolade, tiramisu, ledene torte ...). Davies in sod. (2008) ugotavljajo, da priprava umešanih jajc in jajc, pečenih na oko, ne zagotavlja vedno zanesljivega uničenja *S. Enteritidis*. Zaradi prehranskih navad ljudi je gospodarstvo za proizvodnjo jajc pravzaprav obrat, ki proizvaja živila za neposredno uživanje. Pogosto se tudi meso ali pripravki iz mesa zaužijejo

termično neobdelani ali obdelani na prenizki temperaturi, kot npr. tatarski biftek, čevapčiči, pleskavice ipd. Za preprečevanje okužb ljudi, do katerih pride zaradi napak pri ravnanju z živilom in pri pripravi hrane, je temeljnega pomena zdravstvena vzgoja, kar je potrebno upoštevati pri oblikovanju javnozdravstvenih izobraževalnih programov in programov za zatiranje in preprečevanje okužb ljudi s salmonelami. Zaradi ugotovljenih neposrednih povezav med rejo kokoši nesnic in človekom je izvajanje ukrepov za preprečevanje okužb živali (HACCP, DPP, DHP, biovarstvenih ukrepov ...), ki zagotavljajo proizvodnjo neokuženih jajc, ključnega pomena za preprečevanje okužb ljudi.

3. Okužbe hišnih živali: Hišne živali so pogosto v tesnem stiku z ljudmi. V naši raziskavi je bil genotip A6 ugotovljen samo pri plazilcih in človeku, kar je lahko posledica neposrednega stika človeka s plazilci. Prav stik s plazilci kot hišnimi živalmi je dejavnik, ki je, po podatkih iz literature, v porastu in so mu izpostavljeni tudi otroci. Ljudje se lahko okužijo tudi v stiku z mačkami, psi in glodalci (Crum Cianflone, 2008), dvoživkami (Zarecki in sod. 2013). Stopnja okuženosti hišnih živali ni znana, zaradi česar bo potrebno nadaljnje raziskovanje in spremljanje okužb pri hišnih živalih.

V raziskavi je nastala velika zbirka restrikcijjskih vzorcev PFGE izolatov *S. Enteritidis* iz živali in ljudi v Sloveniji ($n = 368$), razvrščenih v skupine in genotipe na podlagi razlike v enem pasu (Tabela 32). Genotipi so bili prisotni v prehranski verigi najmanj šest let in so se izkazali kot stabilni biološki označevalci. Potrdili smo izrazito klonalno širjenje *S. Enteritidis* v Sloveniji. Ugotovitve so skladne z ugotovitvami drugih avtorjev, da je širjenje *S. Enteritidis* klonalno, z omejeno genetsko raznolikostjo (Thong in sod., 1995; Baggesen in sod., 1997; Liebana in sod., 2001; Woo, 2005; Cheong in sod., 2007 in Olson in sod., 2007) in da so nekateri kloni razširjeni pandemično (Thong in sod., 1995; Liebana in sod., 2002 in Pang in sod., 2007). S primerjavo genotipov, smo ugotovili prenos okužbe kokoši nesnic iz okužene jate v novo jato. Pomembna je ugotovitev, da so v rejah kokoši hkrati lahko prisotni različni kloni istega serovara salmonel. Po veljavnih protokolih se običajno iz vsakega vzorca tipizira le ena kolonija, zato je v epidemiološkem smislu tak rezultat lahko pomanjkljiv. Na podlagi te ugotovitve bi bilo smiselno razmisliti o novem načinu epidemiološkega spremljanja salmoneloz pri ljudeh. V raziskavi smo prav tako ugotovili povezavo med okužbami živali (kokoši nesnic, brojlerjev, puranov, prašičev, nojev, mestnih golobov) in ljudi v Sloveniji. Prvič smo v Sloveniji z metodo PFGE ugotovili povezavo med okužbami plazilcev in ljudi. Pri delu smo uporabili standardiziran postopek, ki ga uporablja mreža Pulse-Net Europe (Swaminathan in sod., 2006, EFSA, 2009c). Z zbirko restrikcijjskih vzorcev PFGE izolatov *S. Enteritidis* smo v Sloveniji pridobili epidemiološki pripomoček, ki je medlaboratorijsko primerljiv.

6 SKLEPI

1. Ugotovljena je bila omejena genetska raznolikost med sevi *S. Enteritidis*, ki so razširjeni v prehranski verigi kar potrjuje prvo hipotezo. Širjenje v prehranski verigi je zato izrazito klonalno, kar je bolj izraženo pri izolatih iz ljudi kot pri izolatih iz živali.
2. Prevladujoči genotipi so bili ugotovljeni pri več vrstah živali, kar kaže na razširjenost določenih sevov *S. Enteritidis* pri več vrstah rejnih živalih, ki so vir živil, in tudi pri mestnih golobih, miših ter plazilcih. Sevi izolirani pri različnih vrstah živali se v večini primerov ne razlikujejo, kar ovrže drugo hipotezo.
3. Okužbe s *S. Enteritidis* v reji kokoši nesnic, brojlerjev in prašičev so lahko monoklonalne, biklonalne in tudi multiklonalne, kar delno ovrže tretjo hipotezo.
4. Povezava med okužbami s sevom določenega genotipa in določeno kategorijo kokoši nesnic ali prašičev ni bila ugotovljena, različne kategorije iste vrste živali so bile okužene z enakim genotipom, kar ovrže četrto hipotezo.
5. Sevi, izolirani iz okolja, se niso razlikovali od sevov iz kokoši nesnic iz istega okolja, kar potrjuje peto hipotezo.
6. Prevladujoči sevi, izolirani v rejah živali, se v večini primerov niso genetsko razlikovali od prevladujočih sevov, izoliranih pri ljudeh, kar ovrže šesto hipotezo in kaže na to, da so živali pomemben vir okužbe ljudi.
7. Razlikovanje genetskih tipov je smiselno že na podlagi razlike v enem pasu zaradi ugotovljenih majhnih razlik med genotipi.
8. Za epidemiološko spremljanje okužb s *S. Enteritidis* je potrebno ustvariti stalno zbirko izolatov in določiti standardne postopke tipizacije. Zbirka restriksijskih vzorcev PFGE bo omogočila odkrivanje tipov *S. Enteritidis* z večjim potencialom širjenja, odkritje pojava novega tipa, raziskovanje epidemij in odkrivanje izvora okužb s *S. Enteritidis*.

7 POVZETEK

Okužbe ljudi s *S. Enteritidis* so v državah EU še vedno velik javnozdravstveni problem. Namen naloge je bil ugotoviti dejansko genetsko raznolikost sevov *S. Enteritidis*, ki krožijo v prehranski verigi v Sloveniji. Poleg tega nas je zanimala razširjenost posameznih genetskih tipov bakterije pri živalih ter kakšne so povezave med okužbami živali in človeka.

V raziskavo smo uvrstili 368 izolatov, od tega 175 izolatov *S. Enteritidis* iz živali (kokoši nesnic, brojlerjev, prašičev, puranov, nojev, plazilcev, mestnih golobov, miši, drobnice, okolja v reji), 183 iz ljudi, ki so zboleli zaradi okužbe s *S. Enteritidis* ter še 10 izolatov iz mesnih izdelkov, krme, fižola in komposta. Izolati so bili pridobljeni v obdobju od leta 2005 do leta 2010.

Z epidemiološko raziskavo, na podlagi zbranih podatkov o izolatih in s tipizacijo izolatov *S. Enteritidis* z metodo PFGE, smo ugotovili 60 različnih genotipov, ki so bili sestavljeni iz 11 do 19 pasov. Večina sevov je pripadalo trem prevladujočim genotipom, ki so zajeli 50,31 % izolatov iz živali in 79,31 % izolatov iz ljudi in so bili pri živalih navzoči najmanj 6 let.

Pri izolatih iz kokoši nesnic smo ugotovili genotipe A1, A2, A8, B1 in C2, ki so bili ugotovljeni tudi pri drugih vrstah živali in pri ljudeh. Pri brojlerjih je prevladoval genotip A1. Pri puranih smo ugotovili vse tri prevladujoče genotipe. Pri mestnih golobih smo ugotovili genotipe B1 in C2. Pri izolatih iz prašičev smo ugotovili genotipe, ki so bili ugotovljeni tudi pri drugih vrstah živali in ljudeh, vendar so prevladovali genotipi skupine D (D1 – D7) in genotip B5. Pri plazilcih smo poleg genotipa B1 ugotovili tudi genotip A6, ki je bil ugotovljen samo pri plazilcih in ljudeh. Prevladujoče genotipe smo ugotovili tudi v mesnih izdelkih, fižolu, v hlevu za rejo kokoši in kompostu.

Šest genotipov *S. Enteritidis* (A1, A2, A6, A8, B1 in C2) je bilo skupnih človeku in več vrstam živali. Pri izolatih *S. Enteritidis* iz kokoši nesnic in iz ljudi smo ugotovili 5 skupnih genotipov (A1, A2, A8, B1 in C2). Enake genotipe kot pri ljudeh smo ugotovili še pri brojlerjih, puranih, prašičih, drobnici, mestnih golobih in plazilcih.

Ugotovili smo, da je bilo širjenje *S. Enteritidis* v Sloveniji izrazito klonalno, kar je bolj izraženo pri izolatih iz ljudi kot pri izolatih iz živali. Z analizo okužb v rejah kokoši nesnic, brojlerjev in prašičev smo ugotovili, da so reje lahko okužene hkrati z več sevi *S. Enteritidis*, katerih genotipi se razlikujejo. Pri okužbah v rejah kokoši nesnic je bilo ugotovljeno, da se je okužba večkrat prenesla iz jate v jato in da so v rejah hkrati lahko prisotni različni kloni istega serovara salmonel.

Ugotovili smo enake genotipe pri živalih in ljudeh. Ugotovitve kažejo na to, da so živali in živila živalskega izvora izvor okužb ljudi.

Ugotovitve iz naše raziskave prispevajo k boljšemu razumevanju dejavnikov, ki so vzrok za pojav okužb s *S. Enteritidis* pri živalih in ljudeh.

8 SUMMARY

Human infections with *S. Enteritidis* are a huge public health problem in EU states. The aim of the study was to determine the actual genetic diversity of strains of *S. Enteritidis* circulating in the food chain in Slovenia. In addition, we were interested in the prevalence of certain genetic types of bacteria in animals and the links between animal and human infections.

A total of 368 *S. Enteritidis* isolates were included in this study, 175 isolates from animals (laying hens, broilers, pigs, turkeys, ostriches, reptiles, city pigeons, mice, sheep and the environment), 183 from infected humans and further 10 isolates from meat products, animal feed, beans and compost. Isolates were obtained during the period from 2005 to 2010.

In the epidemiological study, based on collected data of isolates and typing results with PFGE we found 60 different genotypes, which were composed of 11 to 19 bands. The majority of strains belonged to three predominant genotypes and they were found in 50.31 % isolates of animal and 79.31 % of humans isolates. They have been present for at least 6 years in animal genotypes. In isolates from laying hens, we found genotypes A1, A2, A8, B1 and C2, which have been identified also in other species of animals and in humans. In broilers the most prevalent genotype was A1. In turkeys, we found three predominant genotypes. Genotypes B1 and C2 were observed in city pigeons. In isolates from pigs, we found genotypes that were identified in other species of animals and humans, but the most prevalent were genotypes D (D1 - D7) and genotype B5. In reptiles, in addition to genotype B1, we also found genotype A6, which was found only in reptiles and humans. Predominant genotypes were also found in meat, beans, in the chickens rearing barns and compost.

Six genotypes of *S. Enteritidis* (A1, A2, A6, A8, B1 and C2) were common to man and one or more species of animals. In isolates *S. Enteritidis* from laying hens and the humans, we found five common genotypes (A1, A2, A8, B1, and C2). We found the same genotypes as in humans also in broilers, turkeys, pigs, sheep and goats, pigeons and reptiles.

We found that the spread of *S. Enteritidis* in Slovenia was clonal, which is more pronounced in isolates from humans. We found infections with several strains of *S. Enteritidis* at the same time, with analysis of infection in broilers flocks and in pigs' holdings. In laying hens flocks, we also determined that the infection is often transferred from the infected flock to a new flock and that in infected flock more than one clone of *S. Enteritidis* can be present at the same time.

Analysis of the animal and human isolates indicates the spread of identical genotypes in humans and animals. The findings suggest that animals and food of animal origin are the source of human infections.

The findings from this study contribute to a better understanding of infections with *S. Enteritidis* in animals and humans.

9 ZAHVALA

Mentorju doc. dr. Matjažu Ocepku za vodenje, svetovanje in vzpodbujanje pri delu, saj je vedno ob pravem času usmeril delo proti uspešnemu uresničevanju postavljenih ciljev.

Za veliko pomoč pri izvedbi molekularnih metod in nasvete pri delu dr. Mateji Pate in mag. Jasni Mičunovič.

dr. Vidi Čadonič Špelič za vzpodbujanje pri delu in pomoč.

Mag. Izoku Štrumbelj in Ani Slobodnik Kavčič, univ. dipl. mikrobiol, za posredovane izolate in podatke o njih.

Maji Bajt, dr. vet. med., za pomoč pri zbiranju in urejanju podatkov o izolatih.

Za slogovne in slovnične korekcije pri pripravi naloge se zahvaljujem prof. Veroniki Felicijan.

Giti Vuga, prof. slovenščine za odlično opravljeno lektorsko delo.

Posebna zahvala gre tudi moji družini, ženi Metki, sinu Urošu in hčerki Manci za potrpežljivost in vzpodbude pri delu, ko je že kazalo, da bo naloga, ki sem si jo zadal, preveliko breme.

Hvala!

10 LITERATURA

1. Aiken AM, Lane C, Adak GK. Risk of *Salmonella* infection with exposure to reptiles in England, 2004-2007. *Euro Surveill* 2010; 15(22): e 19581 (art. 2)
<http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N22/art19581.pdf> (6.9.2013)
2. Akinyemi OK, Philipp W, Beyer W, Böhm R. Application of phage typing and pulsed-field gel electrophoresis to analyse *Salmonella enterica* isolates from a suspected outbreak in Lagos, Nigeria. *J Infect Dev Ctries* 2010; 4(12): 828–34.
3. Arnold EM, Carrique-Mas JJ, Davies HR. Sensitivity of environmental sampling methods for detecting *Salmonella* Enteritidis in commercial laying flocks relative to the within-flock prevalence. *Epidemiol Infect* 2010; 138: 330–9.
4. Baggesen DL, Wegener HC, Madsen M. Correlation of conversion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 1, 4, or 6 to phage type 7 with loss of lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 330–33.
5. Bailey JS, Stern NJ, Fedorka-Cray P, Craven SE, et al. Sources and movement of *Salmonella* through integrated poultry operations: a multistate epidemiological investigation. *J Food Prot* 2001; 64: 1690–7.
6. Basim E, Basim H. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. *Turk J Biol* 2001; 25: 405–18.
7. Batis J, Brglez I. Mikrobiologija za veterinarje. Specialni del. Skripta predelana in dopolnjena izdaja. Tretja izdaja. Ljubljana: VTOZD Veterinarski oddelek Biotehniške fakultete, 1983: 47–62.
8. Bem Z, Žlender B, Savić I. Mikrobiologija mesa in mesnih izdelkov. In: Bem Z et al, eds. Mikrobiologija živil živalskega izvora. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2003: 289–422.
9. Berghold C, Kornschöber C, Weber S. A regional outbreak of *S. Enteritidis* phage type 5, traced back to the flocks of an egg producer, Austria. *Euro Surveill* 2003; 8(10): 195–8.
10. Bertrand S, Rimhanen-Finne R, Weill FX, et al. *Salmonella* infections associated with reptiles: the current situation in Europe. *Euro Surveill* 2008; 13(24): e 18902 (art. 4)
<http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V13N24/art18902.pdf>
(30.9.2013)
11. Berrang ME, Frank JF, Buhr RJ, Bailey JS, Cox NA, Mauldin J. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella* through the productive life of a broiler breeder flock. *Poult Sci* 1998; 77: 1446–50.
12. Braden RC. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 512–7.

13. Brown DJ, Baggesen DL, Platt DJ, Olsen JE. Phage type conversion in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis caused by the introduction of a resistance plasmid of incompatibility group X (IncX). *Epidemiol Infect* 1999; 122: 19–22.
14. Bryan FL, Doyle MP. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *J Food Prot* 1995; 58: 326–44.
15. Boonmar S, Bangtrakulnonth A, Pornrunangwong S, et al. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from humans and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(4): 971–4.
16. Cardinale JD, Perrier GC, Rivoal K, Tall F, Mead GC, Salvat G. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *J Appl Microbiol* 2005; 99: 968–77.
17. Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Byrd JA, Nisbet DJ. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *J Anim Sci* 2008; 86: 163–72.
18. Cheong HJ, Lee YJ, Hwang IS, et al. Characteristics of non-typhoidal *Salmonella* isolates from human and broiler-chickens in southwestern Seoul, Korea. *J Korean Med Sci* 2007; 22: 773–8.
19. Clavijo IR, Loui C, Andersen LG, Riley WL, Lu S. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Environ Microbiol* 2006; 72(2): 1055–65.
20. Cogan TA, Jørgensen F, Lappin-Scott HM, Benson CE, Woodward MJ, Humphrey TJ. Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. *Microbiol* 2004; 150: 1063–71.
21. Cogan TA, Bloomfield SF, Humphrey TJ. The effectiveness of hygiene procedures for the prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 354–8.
22. Cogan TA, Humphrey TJ. The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 114–9.
23. Cox NA, Berrang ME, and Cason JA. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs: a review. *Poult Sci* 2000; 79:1571–4.
24. Craven JA, Hurst DB. The effect of time in lairage on the frequency of *Salmonella* infection in slaughtered pigs. *J Hyg* 1982; 88: 107–111.
25. Crum Cianflone FN. Salmonellosis and the GI tract: more than just peanut butter. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 424–31.

26. Davies RH, Dalziel R, Gibbens JC, et al. National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999–2000). *J Appl Microbiol* 2004; 96: 750–60.
27. Davies R, Breslin M. Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in laying flocks. *Vet Rec* 2001; 149(23): 699–704.
28. Davies AL, Curtis PA, Conner DE, McKee SR, Kerth LK. Validation of cooking methods using shell eggs inoculated with *Salmonella* serotypes Enteritidis and Heidelberg. *Poult Sci* 2008; 87: 1637–42.
29. De Jong B, Ekdahl K. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. *BMC Public Health* 2006; 6: e 4 (9 str.)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1352352/> (30.9.2013)
30. De Buck J, Immerseel FV, Meulemans G, Haesebrouck F, Ducatelle R. Adhesion of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates to chicken isthmal glandular secretions. *Vet Microbiol* 2003; 93: 223–33.
31. De Buck J, van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 233–45.
32. De Buck J, Pasmans F, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. *Poult Sci* 2004; 83: 352–8.
33. Dhillon AS, Alisantosa B, Shivaprasad HL, Jack O, Schaberg D, Bandli D. Pathogenicity of *Salmonella* enteritidis phage types 4, 8 and 23 in broiler chicks. *Avian Dis* 1999; 43: 506–15.
34. Doyle ME, Mazzota AS. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. *J Food Prot* 2000; 63: 779–81.
35. Doyle PM, Ericson CM. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult Sci* 2006; 85: 960–73.
36. Epp T. Foodborne zoonoses: challenges for the veterinary profession, *Large Anim Vet Rounds*. 2008, 8: e 1–6.
http://www.larounds.ca/crus/laveng_0708_08.pdf. (15.11.2013)
37. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on biological hazard on request from the commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *EFSA J* 2004; 114: e 1–74.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/114.pdf> (15.11.2013)

38. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on biological hazard on »Risk assesment and mitigation options os *Salmonella* in pig production«. EFSA J 2006; 341: e 1–131.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/341.pdf> (15.11.2013)
39. European Food Safety Authority. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus Gallus*, in the EU, 2005-2006, Part A.
EFSA J 2007a; 98: 1–85.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/98r.pdf> (15.11.2013)
40. European Food Safety Authority. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. EFSA J 2007b; 5(2): e 97 (84 str.)
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/97r.pdf> (15.11.2013)
41. EU Summarry reports. Slovenia: the report referred to in article 9 of Directive 2003/ 99/ EC. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2007c. Parma: European Food Safety Authority, 2007c: 4 – 6.
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/223rax9si.pdf> (15.11.2013)
42. European Food Safety Authority. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs in the EU, 2006-2007, Part A: *Salmonella* prevalence estimates.
EFSA J 2008a; e 6(6): e 135 v.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/135r.pdf> (15.11.2013)
43. European Food Safety Authority. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in turkey flocks, Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J 2008b; 6(5): e 134 v, 91 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/134r.pdf> (15.11.2013)
44. European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the pevalence of *Salmonella* in slaughter pigs in the EU, 2006-2007, Part B: factors associated with *Salmonella* infection in lymph nodes, *Salmonella* surface contamination of carcasses, and the distribution of *Salmonella* serovars. The EFSA J 2008c; 6(12): e 206v (111 str.).
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/206r.pdf> (15.11.2013)
45. European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the pevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008, Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J 2009a; 7(12): e 1377.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1377.pdf> (15.11.2013)
46. European Food Safety Authority. The community summary report on trends and sources of zoonoses, and zoonotic agents in the European Union in 2007.
EFSA J 2009b; 7(1): e 223 v (320 str.).
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/223r.pdf> (15.11.2013)

47. European Food Safety Authority. Report on the availability of molecular typing methods for *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* isolates from food, animals and feedingstuffs in European Union member states (and in some other reporting countries), EFSA J 2009c; 7(4): e 272 v (52 str.).
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/272r.pdf> (15.11.2013)
48. European Food Safety Authority. 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 J 2010a; 8(3): e 1503 (100 str.).
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1503.pdf> (15.11.2013)
49. European Food Safety Authority. Scientific opinion on quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs. EFSA J 2010b; 8(4): e 1547 (90 str.).
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1547.pdf> (15.11.2013)
50. European Food Safety Authority. Scientific opinion on quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for reduction of *Salmonella* in laying hens. EFSA J 2010c; 8(4): e 1546 (86 str.).
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1546.pdf> (15.11.2013)
51. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA J 2011a; 9(3): e 2090 (378 str.).
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf> (15.11.2013)
52. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA J 2011b; 9(7): e 2154 (312 str.).
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2154.pdf> (15.11.2013)
53. Fedorka-Cray PJ, Kelley LC, Stabel TJ, Gray JT, Laufer JA. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. Infect Immun 1995; 63(7): 2658–64.
54. Fernandez J, Fica A, Ebensberger G, et al. Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and bacteriophage typing. J Clin Microbiol 2003; 41: 1617–22.
55. Finlay BB, Falkow S. *Salmonella* as an intracellular parasite. Mol Microbiol 1989; 12: 1833–41.
56. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci 2008a; 86: E173–E187.

57. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Anim Sci* 2008b; 86: E149–E162.
58. Forshell LP, Wierup M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev Sci Tech OIE* 2006; 25(2): 541–55.
59. Galland JC. Risk and prevention of contamination of beef carcasses during the slaughter process in the United States of America. *Rev Sci Tech OIE* 1997; 16(2): 395–404.
60. Gantois I, Ducatelle R, Timbermont L, et al. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella vac*® E and TAD *Salmonella vac*® T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* 2006; 24: 6250–5.
61. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Van Immerseel F. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 6616–22.
62. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *Microbiol Rev* 2009; 33: 718–38.
63. Gast RK, Holt PS. Persistence of *Salmonella* Enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. *Poult Sci* 1998; 77:1759–62.
64. Gast KR, Holt SP. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poult Sci* 2000; 79: 559–63.
65. Gast RK, Holt PS. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. *Poult Sci* 2001; 80: 997–1002.
66. Gillespie IA, Elson R. Successful reduction of human *Salmonella* Enteritidis infection in England and Wales. *Euro Surveill* 2005; 10(46): 4 art 2 (4 str.)
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2834> (15.11.2013)
67. Goering VR. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 866–75.
68. Greig JD, Ravel A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *Int J Food Microbiol* 2009; 130: 77–87.
69. Grein T, O'Flanagan D, McCarthy T, Prendergast T. Minimising the risk of salmonellosis from eggs. *Euro Surveill* 1997; 2(11): e 189.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=189> (15.11.2013)

70. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th ed. Paris: WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*, Institut Pasteur, 2007, 1–124.
<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>
(18.11.2013)
71. Guard-Petter J, Henzler DJ, Mahbubur RM, Carlson RW. On-farm monitoring of mouse-invasive *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and a model for its association with the production of contaminated eggs. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 1588–93.
72. Guard-Petter J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microbiol* 2001; 3: 421–30.
73. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, et al. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* 2010; 161(1): 26–9.
74. Hafez HM, Stadler A. *Salmonella enteritidis* colonization in turkey poults. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1997; 104(3): 118–9.
75. Henzler DJ, Ebel E, Sanders J. *Salmonella* Enteritidis in eggs from commercial chicken layer flocks implicated in human outbreaks. *Avian Dis* 1994; 38: 37–43.
76. Henzler DJ, Opitz HM. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Dis* 1992; 36: 625–31.
77. Heyndrickx M, Vandekerchove D, Herman L, Rollier I, Grijspeerdt K, De Zutter L. Routes for salmonella contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol Infect* 2002; 129: 253–65.
78. Heyndrickx M, Herman L, Vlaes L, et al. Multiple typing for the epidemiological study of the hatchery to the slaughterhouse. *J Food Protect* 2007; 70: 323–34.
79. Hjartardottir S, Gunnarsson E, Sigvaldadottir J. *Salmonella* in sheep in Iceland. *Acta Vet Scand* 2002; 43: 43–8.
80. Holt SP, Gast KR, Porter ER, Stone DH. Hyporesponsiveness of the systemic and mucosal humoral immune system in chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis at one day of age. *Poult Sci* 1999; 78: 1510–17.
81. Holt SP, Geden JC, Moore WR, Gast KR. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis-challenged hens. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 6030–5.
82. Humphrey TJ, Baskerville A, Mawer S, Rowe B, Hopper S. *Salmonella enteritidis* phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. *Epidemiol Infect* 1989; 103: 415–23.

83. Humphrey TJ, Chart H, Baskerville A, Rowe B. The influence of age on the response of SPF hens to infection with *Salmonella* Enteritidis PT4. *Epidemiol Infect* 1991a; 106: 33–43.
84. Humphrey TJ, Whitehead A, Gawler AH, Henley A, Rowe B. Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiol Infect* 1991b; 106: 489–96.
85. Humphrey TJ, Slater E, McAlpine K, Rowbury RJ, Gilbert RJ. *Salmonella* enteritidis phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3161–4.
86. Humphrey TJ, Williams A, McAlpine K, Lever MS, Guard-Petter J, Cox JM. Isolates of *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 with enhanced heat and acid tolerance are more virulent in mice and more invasive in chickens. *Epidemiol Infect* 1996; 117: 79–88.
87. Humphrey T. *Salmonella* stress responses and food safety. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 504–9.
88. Humphrey T. Public health aspects of *Salmonella enterica* in food production In: Mastroeni P, Maskell D, eds. *Salmonella* infection: clinical, immunological and molecular aspects. Cambridge: University Press, 2006: 89–116.
89. Hurd HS, McKean DJ, Griffith WR, Wesley VI, Rostagno HM. *Salmonella enterica* infection in market swine and without transport and holding. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2376–81.
90. Howard ZR, Moore RW, Zabala Diaz IB, et al. Inoculation of poultry isolate *Salmonella* Enteritidis on egg vitelline membrane: Survival and growth in egg components after different refrigeration storage times. *Am J Agric Biol Sci* 2007; 2: 123–9.
91. Irwin JR, Poppe C, Messier S, Finley GG, Oggel J. A national survey to estimate the prevalence of *Salmonella* species among Canadian registered commercial turkey flocks. *Can J Vet Res* 1993; 58: 263–7.
92. IVZ. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2005: letno poročilo. Ljubljana; Inštitut za varovanje zdravja RS, 2006: 27–31.
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5& 5_Filename=1512.pdf& 5_MediaId=1512& 5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (15.11.2013)
93. IVZ. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2006: letno poročilo. Ljubljana; Inštitut za varovanje zdravja RS, 2007: 28–34.
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5& 5_Filename=1511.pdf& 5_MediaId=1511& 5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (15.11.2013)

94. IVZ. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni V Sloveniji v letu 2007: letno poročilo. Ljubljana; Inštitut za varovanje zdravja RS, 2008: 33–39.
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=1510.pdf&_5_MediaId=1510&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (15.11.2013)
95. IVZ. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2008: letno poročilo. Ljubljana; Inštitut za varovanje zdravja RS, 2009: 29–34.
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=1509.pdf&_5_MediaId=1509&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (15.11.2013)
96. IVZ. Epidemiološko spremljanje prijavljenih nalezljivih bolezni v Sloveniji, 2009: letno poročilo. Ljubljana; Inštitut za varovanje zdravja RS, 2010: 39–40.
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=2491.pdf&_5_MediaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (15.11.2013)
97. Kang H, Loui C, Clavijo RI, Riley LW, Lu S. Survival characteristic of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen.
Epidemiol Infect 2006; 134: 967–76.
98. Kang ZW, Jung JH, Kim SH, et al. Genotypic and phenotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and humans in Korea.
J Vet Med Sci 2009; 71(11): 1433–8.
99. Keller LH, Benson CE, Krotec K, Eckroade JR. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens.
Infect Immun 1995; 63: 2443–9.
100. Kilic A, Bedir O, Kocak N, et al. Analysis of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis.
Intern Med 2010; 49: 31–6.
101. Kinde H, Read DH, Chin PR, et al. *Salmonella* Enteritidis, phage type 4 infection in a commercial layer flock in southern California: bacteriologic and epidemiologic findings.
Avian Dis 1996; 40: 665–71.
102. Kinde H, Shivaprasad HL, Daft M, et al. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. *Avian Dis* 2000; 44: 239–48.
103. Kim A, Lee YJ, Kang MS, Kwag SI, Cho JK. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. *J Vet Sci* 2007; 8(2): 155–61.
104. Kim SH, Kim S, Chun SG, Park MS, Park JH, Lee BK. Phage types and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from humans and chickens. *J Microbiol* 2008; 46(2): 209–13.
105. Kotula KL, Davis ME. Broiler skin sampling for optimum recovery of *Salmonella* spp. *J Food Prot* 1999; 62: 284–6.

106. Kovats RS, Edwards SJ, Hajat S, Armstrong BG, Ebi KL, Menne B. The effect of temperature on food poisoning: a time series analysis of salmonellosis in ten European countries. *Epidemiol Infect* 2004; 132: 443–53.
107. Laconcha I, Baggesen DL, Rementeria A, Garaizar J. Genotypic characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. *Vet Microbiol* 2000; 75: 155–65.
108. Lapuz R, Tani H, Sasai K, Shirota K, Katoh H, Baba E. An epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis contamination in a rat-infested chicken layer farm, an egg processing facility and liquid egg samples by pulsed-field gel electrophoresis. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 649–52.
109. Le Minor L, Popoff MY. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J System Bacteriol* 2007; 37: 465–8.
110. Liebana E, Guns D, Garcia-Migura LJ, Woodward JM, Clifton-Hadley AF, Davies HR. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol* 2001a; 39(10): 3609–16.
111. Liebana E, Garcia-Migura LJ, Mark F, et al. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. *J Clin Microbiol* 2001; 39(1): 154–61.
112. Liebana E, Garcia-Migura LJ, Guard-Petter J, et al. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 4, 7, 6, 8, 13a, 29 and 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 196–209.
113. Liebana E, Clouting C, Garcia-Migura L, et al. Multiple genetic typing of *Salmonella* Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. *Vet Microbiol* 2004; 100: 189–95.
114. Lillehoj HS, Kim CH, Keeler CL, Zhang S. Immunogenomic approaches to study host immunity to enteric pathogens. *Poult Sci* 2007; 86: 1491–500.
115. Lindqvist R, Andersson Y, Lindbäck J, et al. A one-year study of foodborne illnesses in the municipality of Uppsala, Sweden. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 588–92.
116. Lindsay AJ. Chronic sequelae of foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 1997; 3(4): 443–52.
117. Lister SA. *Salmonella enteritidis* infection in broilers and broiler breeders. *Vet Rec* 1988; 123(13): 350.
118. Liu F, Kariyawasam S, Jayarao MB, et al. Subtyping *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from different sources by using sequence typing based on virulence genes and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(13): 4520–6.

119. Lo Fo Wong DMA, Hald T, van der Wolf PJ, Swanenburg M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livest Prod Sci* 2002; 76(3): 215–22.
120. Lukinmaa S, Schildt R, Rinttilä T, Siitonen A. *Salmonella* Enteritidis phage types 1 and 4: pheno- and genotypic epidemiology of recent outbreaks in Finland. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2176–82.
121. Lu LP, Hwang IJ, Tung YL, et al. Molecular and epidemiologic analysis of a county-wide outbreak caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis traced to a bakery. *BMC Infect Dis* 2004; 4:e 48 (7 str.).
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2334-4-48.pdf> (15.11.2013)
122. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCraig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 607–25.
123. Miljković-Selimović B, Babić T, Kocić B, Ristić L. *Salmonella enteritidis*–tehnike fenotipizacije i genotipizacije. *Acta Medica Medianae* 2009; 48(3): 31–4.
124. Murase T, Okitsu T, Suzuki R, et al. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbiol Immunol* 1995; 39(9): 673–6.
125. Oh YJ, Kang MS, An KB, Song EA, Kwon HJ, Kwon KY. Occurrence of purulent arthritis broilers vertically infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Korea. *Poult Sci* 2010; 89: 2116–22.
126. Okamura M, Miyamoto T, Kamijima Y, Tani H, Sasai K, Baba E. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and in vitro adherences to vaginal explants between *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* serovars. *Avian Dis* 2001a; 45: 962–71.
127. Okamura M, Kamijima Y, Miyamoto T, Tani H, Sasai K, Baba E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis* 2001b; 45: 61–9.
128. Olson AB, Andrysiak AK, Tracz DM, et al. Limited genetic diversity in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *BMC Microbiol* 2007; 7: e 87 (10 str.).
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-7-87.pdf> (15.11.2013)
129. Quintavalla S, Larini S, Mutti P, Baruti S. Evaluation of the thermal resistance of different *Salmonella* serotypes in pork meat containing curing additives. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 107–14.
130. Pang JC, Chiu TH, Chiu CS, et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. *Int J Food Microbiol* 2005; 99: 1472–83.

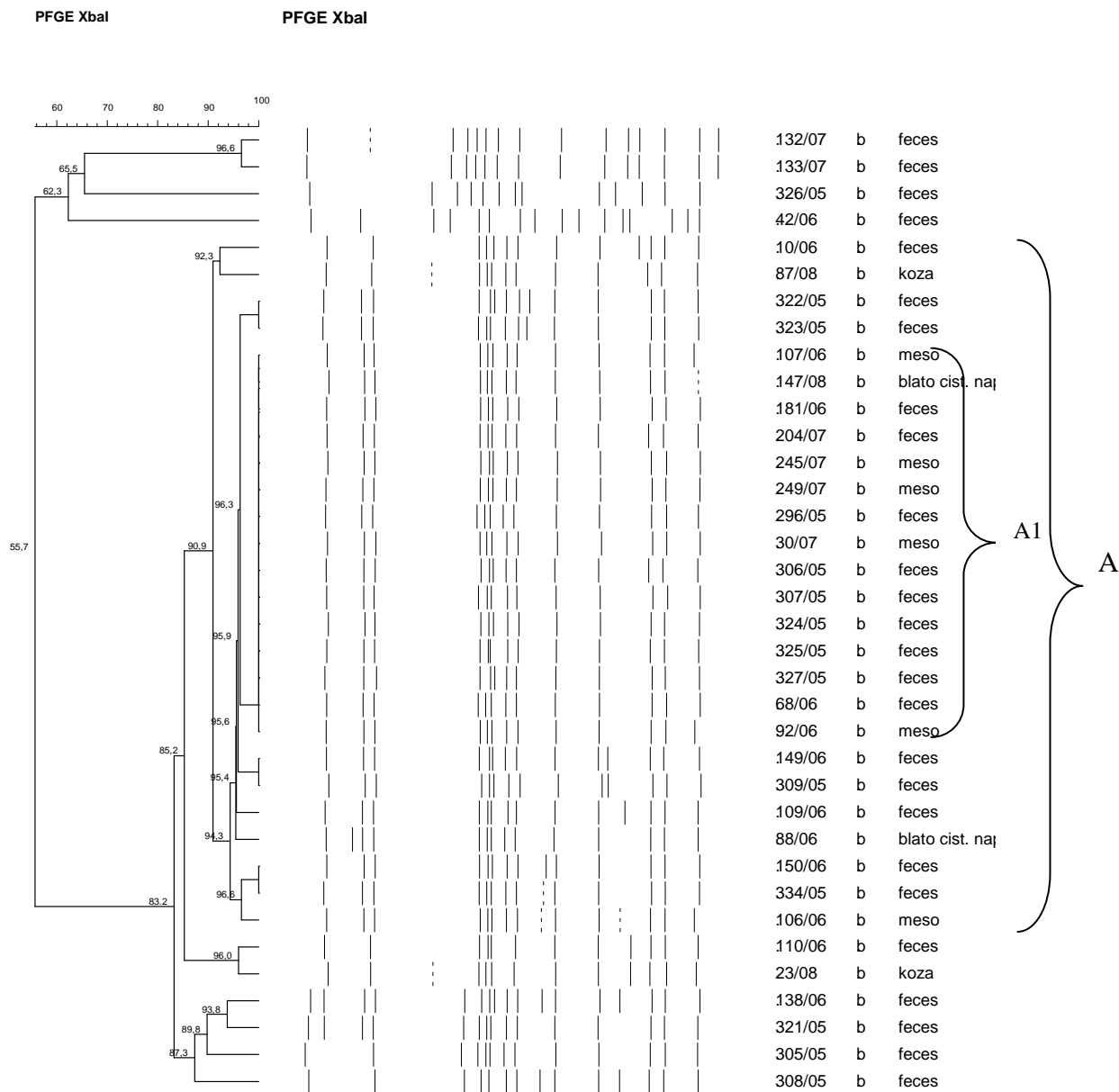
131. Pang JC, Chiu TH, Helmuth R, et al. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 2007; 116(3): 305–12.
132. Pate M, Mićunović J, Bole-Hribovšek V, et al. Investigation of two *Salmonella* serovar Enteritidis outbreaks using the pulsed-field gel electrophoresis: a good example of collaboration at the national level. *Slov Vet Res* 2011; 48(3/4): 99–105.
133. Patkovič-Colarič J. Epidemiološka dejavnost Zavoda za zdravstveno varstvo Novo mesto. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 867–71.
134. Peters TM, Maguire C, Threlfall EJ, Fisher IS, Gill ON, Gatto AJ. The Salm-gene project-a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Euro Surveill* 2003; 8(2): 401.
135. Porwollik S, Santiviago CA, Cheng P, Florea L, Jackson S, McClelland M. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. *J Bacteriol* 2005; 187: 6545–55.
136. Poppe C, Forsberg MC, Irwin JJ, Clarke RC, Oggel RC. The prevalence of *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella spp.* among Canadian registered layer flocks. *Epidemiol Infect* 1991a; 106: 259–70.
137. Poppe C, Irwin JJ, Messier S, Finley GG, Oggel J. The prevalence of *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella spp.* among Canadian registered commercial chicken broiler flocks. *Epidemiol Infect* 1991b; 107: 201–11.
138. Poppe C, Johnson PR, Forsberg MC, Irwin JJ. *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* in laying hens and eggs from flocks with *Salmonella* in their environment. *Can J Vet Res* 1992; 56: 226–32.
139. Poppe C. Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. In: Saeed AM, Gast KR, Potter EM, Wall GP eds. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis, and control. Ames: Iowa State University, 1999: 3–18.
140. Powell NG, Threlfall EJ, Chart H, Schofield SL, Rowe B. Correlation of change in phage type with pulsed field profile and 16S *rrn* profile in *Salmonella enteritidis* phage types 4, 7 and 9a. *Epidemiol Infect* 1995; 114: 403–11.
141. Pui CF, Wong WC, Chai LC, et al. *Salmonella*: a foodborne pathogen. *Int Food Res J* 2011; 18: 465–73.
142. Rajkowski KT, Eblen S, Laubach C. Efficacy of washing and sanitizing trailers used for swine transport in reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J Food Prot* 1998; 61: 31–5.

143. Ricke SC. The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella* Enteritidis colonization in molting hens. *Poult Sci* 2003; 82: 1003–7.
144. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in *Salmonella* enteritidis: a new pandemic? *Epidemiol Infect* 1990; 105: 21–7.
145. Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC. Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(8): 4489–94.
146. Rose N, Beaudeau F, Drouin P, Toux JY, Rose V, Colin P. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev Vet Med* 1999; 39(4): 265–77.
147. Schwartz C, Cantor R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 67–75.
148. Schuman DJ, Sheldon WB, Vandepopuliere MJ, Ball RH. Immersion heat treatments for inactivation of *Salmonella* Enteritidis with intact eggs. *J Appl Microbiol* 1997; 83: 438–44.
149. Singh A, Goering VR, Simjee S, Foley LS, Zervos JM. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 512–30.
150. Soliman ES, Taha E, Infante KD, Laboy K, Sobieh MA, Reddy PG. Stressors influence on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization in broilers. *Am J Anim Vet Sci* 2009; 4: 42–8.
151. Stepanović S, Ćircović I, Mijač V, Švabić-Vlahović M. Influence of incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol* 2003; 20: 339–43.
152. Stevens PM, Humphrey JT, Maskell JD. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infection. *Phil Trans R Soc B* 2009; 364: 2709–23.
153. Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ng LK, et al. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathog Dis* 2006 ;3(1): 36–50.
154. Tassios PT, Markogiannakis A, Vatopoulos AC, et al. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* enteritidis during a 7-year period in Greece. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1316–21.
155. Telzak EE, Budnick LD, Zweig Greenberg MS, et al. A Nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* infection due to the consumption of raw eggs. *N Engl J Med* 1990; 323: 394–7.

156. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen AP, Murray EB, Persing HD, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233–9.
157. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, et al. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res* 2008; 18(10): 1624–37.
158. Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P, Pang T. Molecular analysis of *Salmonella* enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol* 1995; 33(5): 1070–4.
159. Thorns CJ. Bacterial food-borne zoonoses. *Rev Sci Tech OIE* 2000; 19: 226–39.
160. Threlfall EJ, Chart H, Ward LR, de Sa JDH, Rowe B. Interrelationships between strains of *Salmonella* Enteritidis belonging to phage types 4, 7, 7a, 8, 13, 13a, 23, 24 and 30. *J Appl Bacteriol* 1993; 75: 43–8.
161. Tsen HY, Lin JS. Analysis of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from food-poisoning cases in Taiwan by pulsed field gel electrophoresis, plasmid profile and phage typing. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 72–9.
162. Wallis ST. Host-specificity of *Salmonella* infections in animal species. In: Mastroeni P, Maskell D, eds. *Salmonella* infection: clinical, immunological and molecular aspects. Cambridge: University Press, 2006: 57–88.
163. van Belkum A, Tassois PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(3): 1–46.
164. van Immerseel F. Stress-induced survival strategies enable *Salmonella* Enteritidis to persistently colonize the chicken oviduct tissue and cope with antimicrobial factors in egg white: a hypothesis to explain a pandemic. *Gut Pathog* 2010; 2: 23.
165. Varma JK, Molbak K, Barrett TJ, et al. Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *J Infect Dis* 2005; 191: 554–61.
166. Velge P, Cloeckaert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res* 2005; 36: 267–88.
167. Winfield MD, Groisman EA. Role of nonhost environments in the lifecycles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 3687–94.
168. Woo YK. Finding the sources of Korean *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT 4 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol* 2005; 43(5): 424–9.

169. Yan SS, Pendrak LM, Abela-Ridder B, et al. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. *Clinical Appl Immunol Rev* 2003; 4: 189–204.
170. Yoshikawa TT, Herbert P, Oill PA. Salmonellosis. *West J Med* 1980; 133: 408–17.
171. Zarecki LM, Bennett SD, Hall J et al. US outbreak of human *Salmonella* infections associated with aquatic frogs 2008 – 2011. *Pediatrics* 2013;131:724–31.
<http://pediatrics.aappublications.org/content/early/2013/03/06/peds.2012-2031>

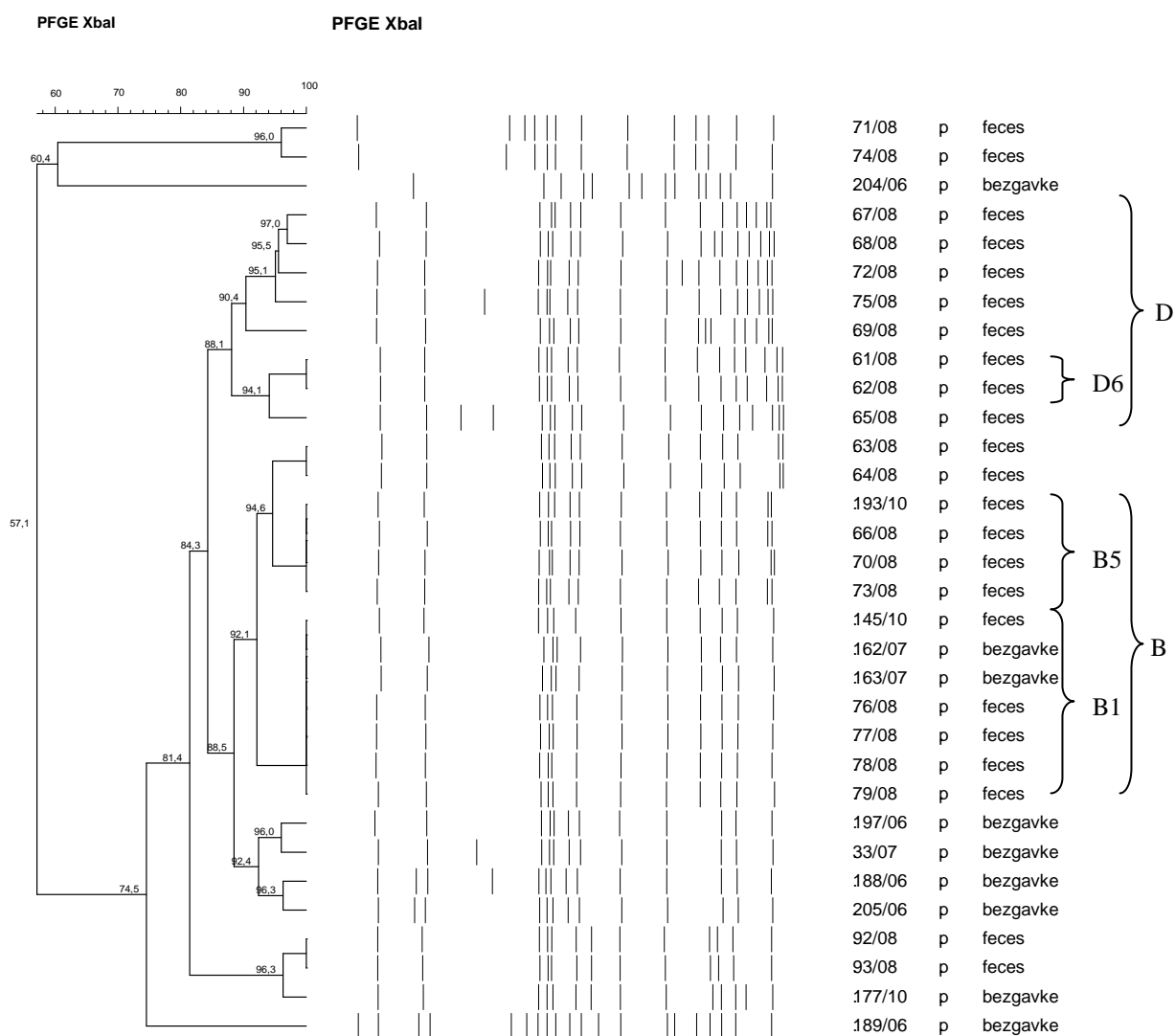
11 PRILOGA



Legenda: b – broiler; A – genetska skupina A; A1 - genetska skupina A1;
Legend: b – broiler; A – cluster A; A1 - cluster A1;

Slika 6: Primerjava genotipov izolatov iz brojlerjev. Izvor izolatov smo označili s feces, meso, koža, blato iz čistilne naprave.

Figure 6 (see annex): Comparison of genotypes of isolates from broilers. Origin of isolates were labeled with faeces, meat, skin, sludge from wastewater treatment plants.

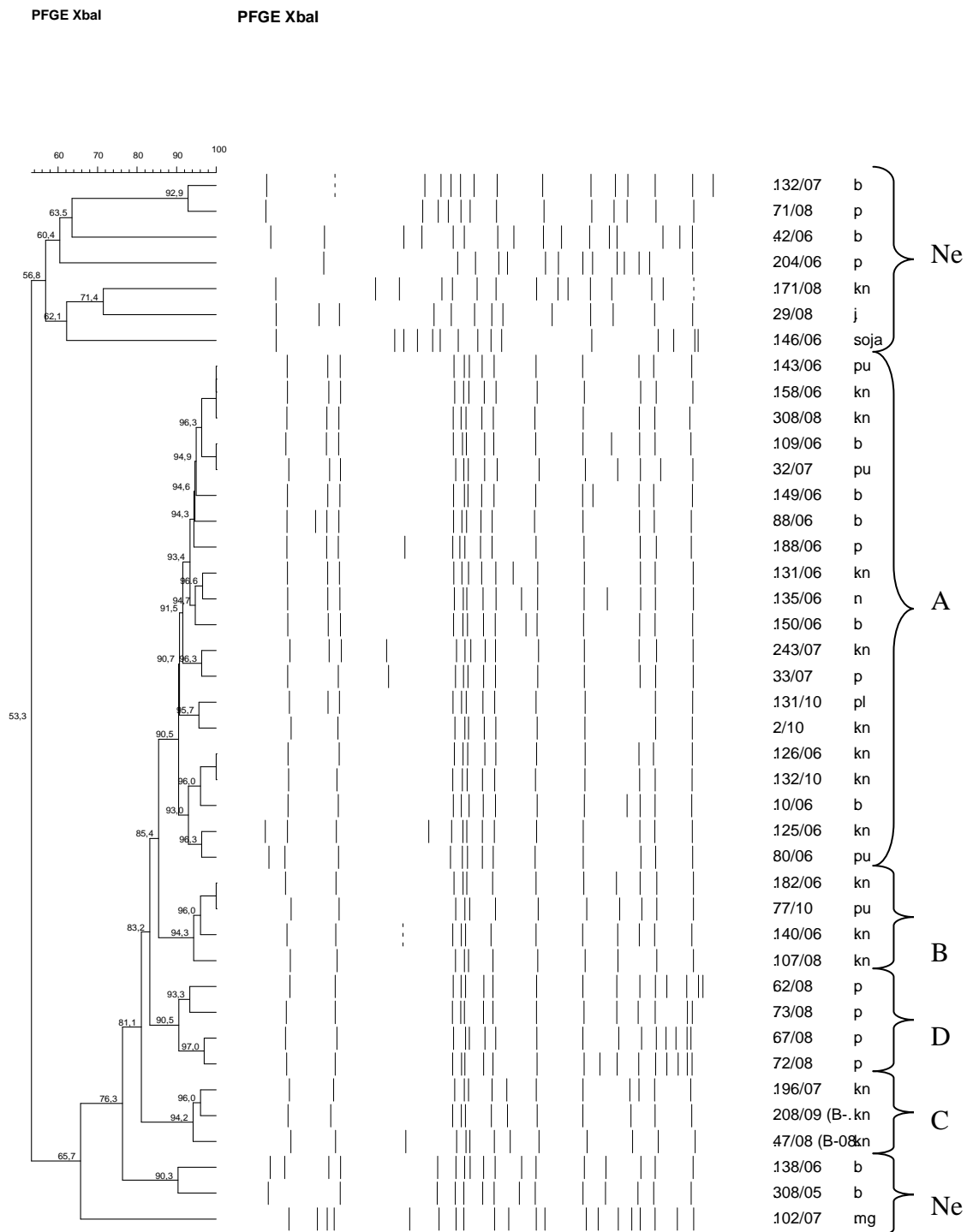


Legenda: p – prašič; B – genetska skupina B; B1 – genotip B1; B5 – genotip B5, D - genetska skupina; D6 - genotip D6

Legend: p – pig; B – cluster B; B1 – genotype B1; B5 – genotype B5, D - genetic group; D6 – genotype D6

Slika 9: Primerjava ugotovljenih genotipov pri izolatih iz prašičev.

Figure 9: Comparison of genotypes found in isolates from pigs.



Legenda: A, B, C, D – genetske skupine A, B, C, D ; Ne – neopredeljeni genotipi; b – brojljerji; j – jarkice; kn – kokoši nesnice; mg – mestni golobi; n – noji; p – prašiči; pl – plazilci; pu – purani.
Legend: A, B, C, D – clusters A B, C, D; Ne – undefined genotypes; b – broilers, j – pullets; kn – laying hens; mg – city pigeons; n - ostriches ; p – pigs; pl – reptiles; pu – turkeys.

Slika 35: Na sliki je prikazana primerjava 24 značilnih genotipov. Na desni strani slike je oznaka izolata, ugotovljena skupina, izvor izolata, vrsta vzorca, iz katerega je *S. Enteritidis* izolirana.

Figure 35: The figure shows comparison of 24 typical genotypes. On the right side of the picture is designation of isolate, identified cluster, source of isolate, type of sample from which is isolated *S. Enteritidis*.