

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2017/14



ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1401
Naslov projekta	Obvladovanje okužb z E. coli pri perutnini: Določitev kritičnih mest vnosa bakterije E.coli, vključno z E. coli z ESBL v reje perutnine in študija preventivnih ukrepov za zmanjševanje porabe protimikrobnih zdravil Control of E. coli infections in poultry: Determination of critical points of E. coli, including ESBL producing E. coli introduction in poultry flocks and study of preventive measurements to reduce the use of antimicrobials
Vodja projekta	8023 Olga Zorman Rojs
Naziv težišča v okviru CRP	1.01.01 Pojavnost in kritična mesta vnosa bakterije E.coli tipa ESBL in študija programov za zmanjševanje porabe protimikrobnih zdravil v perutninarstvu
Obseg raziskovalnih ur	1180
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	07.2014 - 06.2016
Nosilna raziskovalna organizacija	510 Univerza v Ljubljani 406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	105 Nacionalni inštitut za biologijo 481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta 2106 PERUTNINA PTUJ reja perutnine, proizvodnja krmil, perutninskega mesa in izdelkov, trgovina in storitve d.d. 2476 PAN-NUTRI, Kmetijsko živilski tehnološki center d.o.o
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.03 Terapija in zdravstveno varstvo živali
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	4 Kmetijske vede 4.03 Veterina

2. Sofinancerji

--	--

	Sofinancerji	
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
	Naslov	Dunajska 22, 1000 Ljubljana

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Problem naraščajoče sekundarne oz. pridobljene bakterijske odpornosti proti antibiotikom dobiva velike razsežnosti tako v humani kot tudi v veterinarski medicini. V zadnjem času so posebej izpostavljene različne vrste enterobakterij, ki izločajo različne betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja – ESBL. Okužbe s patogenimi sevi *Escherichia coli* (*E. coli*) lahko privedejo do različnih obolenj tako pri živalih kot tudi pri ljudeh. Kljub temu, da je težko z gotovostjo izslediti izvor okužb, obstaja verjetnost njihovega prenosa iz živali oz. kontaminiranega okolja. V intenzivnih rejah perutnine so okužbe z *E. coli* izjemno pogoste in povzročajo velike ekonomske izgube.

V Sloveniji vse do naše študije nismo razpolagali s podatkom o pojavnosti proti antibiotikom odpornih sevov *E. coli* v rejah perutnine, kar je bil eden od poglobitvenih ciljev projekta. Z našimi raziskavami odpornih sevov *E. coli* nismo potrdili v okoljskih vzorcih, ki smo jih odvzeli v objektih perutnine pred vselitvijo živali. Z nadaljnjim spremljanjem smo prisotnost teh sevov potrdili v vseh kategorijah perutnine. Ugotovili smo, da se njihova pojavnost s starostjo živali stopnjuje. Odporne seve smo v primerljivem odstotku potrdili tako v zraku, kot tudi v iztrebkih in organih živali, kar nakazuje tudi na možnost okužb ljudi, predvsem delavcev na farmah. Pojav rezistentnih sevov se v veliki meri povezuje s prekomerno uporabo protimikrobnih zdravil. V okviru naše raziskave tega nismo potrdili.

Z usmerjenimi raziskavami smo določili dejavnike, ki vplivajo na pojav kolibaciloze pri perutnini z namenom znižanja izgub, manjše uporabe terapevtikov in boljšega počutja živali. Ugotovili smo, da so klinični izbruhi kolibaciloze povezani predvsem s sočasnim delovanjem več patogenov in z oslabilim organizmom živali (okužbe z mikoplazmami in paraziti). S sicer omejenimi raziskavami tudi nismo potrdili učinkovitosti zaščitnega cepljenja proti *E. coli* pri matičnih jatah.

Determinante patogenosti pri sevih APEC še niso popolnoma pojasnjene. Za ločevanje za perutnino patogenih sevov *E. coli* od nepatogenih oz. komenzalov se v zadnjem času uporabljajo predvsem molekularne metode za odkrivanje prisotnosti genov za dejavnike virulence, ki omogočajo različen patogeni potencial *E. coli*. Izolate *E. coli*, ki smo jih pridobili tekom študije smo preiskali na prisotnost 19 genov, povezanih z virulenco *E. coli*. Analiza primerjave prisotnosti genov je pokazala, da bi bilo mogoče ločiti patogene seve od nepatogenih na osnovi detekcije šestih genov.

V okviru projekta smo razvili izotermalno metodo LAMP za določane patogenih sevov *E. coli* pri perutnini na osnovi treh virulentnih genov. Metodo smo najprej optimizirali in določili njeno analitično in diagnostično specifičnost, selektivnost in ponovljivost. Uporabnost in delovanje metode smo preverili tudi v terenskih pogojih. Metoda LAMP se je izkazala kot hitra in zanesljiva za določanje izbranih tarčnih genov na terenu.

ANG

Antimicrobial resistance is a major and increasing global problem in human and veterinary medicine. During the past decade, drug resistance in Enterobacteriaceae has increased dramatically worldwide. This has been caused mainly by an increased prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*), causes a number of diseases in both animals and humans. In poultry, infections with avian pathogenic *E. coli* (APEC) cause colibacillosis, an acute and mostly systemic disease resulting in significant economic losses. Avian colibacillosis is a complex syndrome characterized by multiple organ lesions. Environmental factors as well as other factors influence the outcome of APEC-infections.

Before this study, no data on prevalence of ESBL or AmpC producing *E. coli* in poultry farms were available in Slovenia. Such strains could be transferred via vertical and horizontal routes. In our study no ESBL/AmpC producing *E. coli* were detected in samples taken from poultry environment before chicks' arrival. During the observation period levels of ESBL/AmpC producing *E. coli* increased and ESBL/AmpC producing isolates were confirmed in all poultry flocks. ESBL producing *E. coli* found in the air and faecal samples indicate a risk for people who work on the farms. The results also suggested that intake of antibiotics are a less important factor than vertical transmission or horizontal contamination.

One of the main goals of the project was to determine factors associated with the *E. coli* infection and the clinical outcomes intensive poultry production. The investigation of colibacillosis outbreaks clearly showed the importance of other pathogens on clinical outcome of *E. coli* infection. Although *E. coli* was isolated in 90% of samples taken from clinically healthy flocks, no health problems were present in flocks without concomitant infections. In addition, no positive effect was observed in birds vaccinated against *E. coli*.

To identify virulence factors characteristic for avian *E. coli* we compared outbreak strains with non outbreak strains by

determining their profile of virulence associated genes (VAGs). Each isolate was screened for the presence of 19 different VAGs. The results were analysed by multiple correspondence analysis and six genes were identified as being most significantly associated with pathogenic APEC strains.

Within the project a loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for fast detection of three avian pathogenic *E. coli* virulence genes was developed. The method was first evaluated for analytical and diagnostic specificity, selectivity and repeatability, than it has proven to be fast and reliable for detection of the selected genes in the field.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev na raziskovalnem projektu²

Escherichia coli (*E. coli*) je ena najpogostejših bakterij, ki jih najdemo v intestinalnem traktu tako živali kot ljudi. Večina *E. coli* je komenzalov, nekatere med njimi pa so patogene in povzročajo huda obolenja. Patogene *E. coli* v grobem delimo na tiste, ki povzročajo črevesna obolenja (IPEC, angl. intestinal pathogenic *E. coli*) in tiste, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe (angl. extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC). Pri sesalcih okužbe z enterotoksičinimi, enteropatogenimi ali enterohemoragičnimi patotipi *E. coli* v največji meri povzročajo črevesna obolenja. Okužbe s sevi ExPEC pri ljudeh pogosto povzročajo okužbe sečil in tudi težje ali celo smrtonosne okužbe (bakteriemije, meningitis). Pri živalih, zlasti perutnini, pa je potek obolenja težji in velikokrat povzroča obsežne pogine. Kljub temu, da je težko z gotovostjo izslediti izvor ExPEC, ki povzročajo obolenja pri ljudeh, obstaja velika verjetnost njihovega prenosa iz živali oz. kontaminiranega okolja.

Perutninsko meso je v svetovnem merilu eden od pomembnejših virov beljakovin živalskega izvora. Genetska selekcija perutnine omogoča pridobitev visoko kakovostnega vira prehrane za ljudi, vendar se živali v intenzivni reji soočajo s številnimi stresnimi dejavniki, ki privedejo do večje občutljivosti za povzročitelje različnih obolenj. Eno izmed najpogostejših in tudi ekonomsko najpomembnejših je kolibaciloza. Okužbe z aviarnimi patogenimi *E. coli* (APEC), ki sodijo med ExPEC, so v intenzivnih rejah perutnine zelo pogoste. Poti okužbe še niso popolnoma jasne, perutnina pa se lahko okuži tako po horizontalni kot tudi po vertikalni poti. Odvisno od patogenosti seva, občutljivosti gostitelja in negativnih faktorjev okolja se okužba lahko kaže kot septikemija z visokim poginom ali pa kot lokalizirana vnetja seroznih open, organov in tkiv. Kolibaciloze povzročijo tudi do 20% pogin, posredne škode pa je, zaradi velike uporabe kemoterapevtikov in pogostih zaplemb trupov ob zakolu, še več.

V redni diagnostiki *E. coli* pri perutnini se uporabljajo standardizirane mikrobiološke metode izolacije, vendar z njimi ne ločujemo za perutnino patogenih (APEC) od komenzalnih *E. coli*. Ta diagnostični postopek traja najmanj 48 ur, ob tem pa ne vemo zagotovo, ali gre za izolate, ki so za perutnino primarno patogeni ali za komenzalne seve. Zato se je pojavila potreba po hitri diagnostični metodi za karakterizacijo izolatov, ki bi nudila možnost hitrega in učinkovitega ukrepanja ob pojavljanju potencialno patogenih sevov v reji.

V ES in seveda tudi v naši državi, je uporaba protimikrobnih zdravil omejena. V večini primerov se uporabljajo usmerjeno; na podlagi kliničnih obolenj in ob potrditvi patogenov. Rezultati testiranj bakterij, izoliranih pri živalih v zadnjih letih, kažejo na povečano odpornost pri številnih bakterijskih vrstah. Pojavlja se odpornost proti različnim skupinam antibiotikov, poleg odpornosti proti betalaktamom je še posebej zaskrbljujoča odpornost proti kinolonom, ki se v veterinarski medicini pogosto uporabljajo, predvsem za zdravljenje okužb s po Gramu negativnimi bakterijami, med katere sodi tudi *E. coli*. Zaradi omejenega izbora protimikrobnih zdravil za uporabo pri perutnini in naraščajoče odpornosti *E. coli* je izbor učinkovine čedalje bolj omejen. V preventivi okužb z *E. coli* je mogoče uporabljati tudi cepiva. V evropskem prostoru so registrirana tako inaktivirana kot tudi živa atenuirana cepiva proti *E. coli*, mnenja o njihovi učinkovitosti so v strokovnem slovstvu deljena. Določena zdravila kot npr. kokcidiostatiki se še vedno množično uporabljajo v preventivi kokcidioze v rejah perutnine. Kakšna je njihova vloga pri pojavu in širjenju *E. coli* z ESBL, je slabo raziskano.

Sevi *E. coli* se pogosto zadržujejo v perutninskih objektih in okolju. Ob tem ne gre zanemariti potencialne možnosti neposrednih okužb ljudi. Kljub temu, da sevi pri živalih praviloma niso identični sevom pri ljudeh, pa se lahko geni, povezani z odpornostjo, sevov *E. coli* z ESBL, ki so prisotni pri perutnini, prenesejo v komenzalne seve *E. coli* pri ljudeh, ki posledično postanejo odporni. V Republiki Sloveniji nismo razpolagali s podatki, kakšna je pojavnost in v katerem obdobju reje pride do vnosa patogenih *E. coli* v jate perutnine. Še manj je podatkov o tem, v kolikšni meri gre za vnos sevov *E. coli*, z genskimi zapisi za rezistenco proti betalaktamom z razširjenim spektrom delovanja (*E. coli* z ESBL/AmpC).

V okviru naše raziskave smo sledili naslednjim ciljem:

- S preiskavami različnih kategorij perutnine določiti stopnjo okuženosti z *E. coli* vključno z ESBL- *E. coli* pri perutnini.
- Določiti vire in kritične točke okužb z *E. coli* pri perutnini in na tej osnovi pripraviti ustrezne protokole preventivnih ukrepov za znižanje okužb
- Določiti vpliv uporabe kokcidiostatikov in antibiotikov na pojavnost *E. coli* z ESBL.
- Ugotoviti v kolikšni meri so potencialno ogroženi ljudje, ki so pri svojem delu v vsakodnevnem stiku s perutnino, da se okužijo z ESBL- *E. coli*, ki jih potem iz svojega delovnega okolja prenašajo v domače okolje
- Ovređnotiti vpliv preventivnega cepljenja proti *E. coli* na pojavnost pojavnosti kolibaciloze, porabe zdravil
- Ugotoviti najbolj prevalentne gene za dejavnike virulence APEC-izolatov.
- Razviti nove hitre diagnostične metode za dokazovanje sevov APEC pri perutnini in jih preiskusiti v praksi.

- Na podlagi rezultatov opravljenih raziskav pripraviti operativne postopke, kako preprečiti oz. omejiti okužbe z *E. coli* v živi proizvodnji in tako znižati uporabo antibiotikov

Z usmerjenimi raziskavami smo določili dejavnike, ki vplivajo na pojav kolibaciloze pri perutnini z namenom znižanja izgub, manjše uporabe terapevtikov in boljšega počutja živali. V ta del raziskave smo vključili 11 jat perutnine, ki smo jih spremljali od vhljevitve do konca reje. Vključene so bile tri matične jate težkih hibridov, 4 piščancev brojlerjev, ki so izvirale iz teh matičnih jat in 4 jate pitovnih puranov. Pogoji reje in zaščitni programi cepljenja so bili v posamezni kategoriji živali primerljivi. Matične jate so se med seboj razlikovale glede koncepta prenevanja kokcidioze in *E. coli*; dve jati sta bili cepljeni proti kokcidiozi, ena je v času vzreje v krmi dobivala kokcidiostatik. Preventivni program cepljenja proti *E. coli* z uporabo živih atenuiranih cepiv in inaktiviranih cepiv je bil izveden le v eni jati. Usmerjene preiskave na *E. coli* in *E. coli* z AmpC/ESBL so bile opravljene pred vselitvijo živali v objekte in v času reje. Matične jate smo vzorčili petkrat, jate brojlerjev tri krat in jate puranov šest krat. V vseh kategorijah perutnine smo skupno odvzeli in preiskali 349 vzorcev različnega izvora; vključeni so bili vzorci zraka, iztrebki in organi poginjenih ali izločenih živali. V vseh jatah smo spremljali zdravstveno stanje, pogin in proizvodne parametre. V raziskavo smo vključili tudi dve jati konzumnih nesnic z izrazitimi znaki kolibaciloze; živali so poginjale, v jati je bila izrazito znižana nesnost. V jatah perutnine, ki smo jih spremljali skozi ves čas reje, izbruhov kolibaciloze ni bilo, kljub temu da smo z bakteriološkimi preiskavami potrdili *E. coli* v več kot 90 % vzorcev. Dodatne laboratorijske preiskave so pokazale, da jate niso bile okužene z mikoplazmami niti z imunopresivnimi virusi. V študiji izbruhov kolibaciloze v jatah konzumnih nesnic smo ugotovili, da so bile kokoši sočasno okužene z *E. coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* in *Mycoplasma synoviae*, hkrati smo potrdili tudi močno invadiranost z rdečo pršico (*Dermyssus gallinae*). Raziskave vsekakor potrjujejo, da so klinični izbruhi kolibaciloze povezani s sočasnim delovanjem več patogenov in z oslabeлим organizmom živali.

Z raziskavami nismo potrdili učinkovitosti zaščitnega cepljenja proti *E. coli* pri matičnih jatah. V času vzreje je bil pogin višji v cepljeni jati kot v tisti, ki ni bila cepljena, proizvodni rezultati ob koncu reje pa so bili med jatami primerljivi. Pri potomcih cepljene jate pa smo potrdili nižje izgube v prvem tednu pitanja, kar je lahko posledica prenesene maternalne imunosti, po drugi strani pa je kakovost dan starega piščanca močno vezana na sanitacijo valilnih jajc. Glede na to, da smo spremljali le eno matično jato, so te ugotovitve vsekakor preuranjene. Za oceno smiselnosti cepljenja bi bilo potrebno vključiti večje število tako matičnih jat kot tudi njihovih potomcev.

V Sloveniji vse do naše študije nismo razpolagali s podatkom o pojavnosti proti antibiotikom odpornih/rezistentnih sevov *E. coli* v rejah perutnine. Različna poročila navajajo, da se rezistentni sevi lahko širijo vertikalno, mogoča je tudi horizontalna pot širjenja. Ta je najverjetneje posledica slabega čiščenja in dezinfekcije objektov. Z našimi raziskavami rezistentnih sevov *E. coli* nismo potrdili v okoljskih vzorcih, ki smo jih odvzeli v objektih perutnine pred vselitvijo živali. Negativni so bili tako vzorci brisov sten, opreme, vode, stelje in krme. Z nadaljnjim spremljanjem pa smo prisotnost rezistentnih sevov potrdili v vseh treh kategorijah perutnine. Pozitivne so bile vse matične jate, v jatah pitovne perutnine pa smo *E. coli* z AmpC/ESBL potrdili v prvem tednu pri 37,5% testiranih jat, ob koncu pitanja je prevalenca narasla na 62,5%. Rezistentne seve smo v primerljivem odstotku potrdili tako v zraku, kot tudi v iztrebkih in organih živali. Potrditev *E. coli* z ESBL v zraku (17,40%) in iztrebkih (23,18%) nakazuje tudi na možnost okužb ljudi, predvsem delavcev na farmah. Pojav rezistentnih sevov se v veliki meri povezuje s prekomerno uporabo protimikrobnih zdravil. V okviru naše raziskave tega nismo potrdili.

Determinante patogenosti pri sevih APEC še niso popolnoma pojasnjene. Za ločevanje za perutnino patogenih sevov *E. coli* od nepatogenih oz. komenzalov se v zadnjem času uporabljajo predvsem molekularne metode za odkrivanje prisotnosti genov za dejavnike virulence (VAGs – angl. virulence associated genes), ki omogočajo različen patogeni potencial *E. coli*. Izolate *E. coli*, ki smo jih pridobili tekom študije, in seve, ki smo jih izolirali iz poginjenih živali z značilnimi znaki kolibaciloze, smo preiskali na prisotnost 19 genov, povezanih z virulenco *E. coli*. Analiza primerjave prisotnosti genov je pokazala, da bi bilo mogoče ločiti patogene seve od nepatogenih na osnovi detekcije genov *ompT*, *iss*, *traT*, *iroN* in *iucD*.

V okviru projekta smo razvili izotermalno metodo LAMP za določanje patogenih sevov *E. coli* pri perutnini na osnovi treh virulentnih genov (*ompT*, *traT*, *sitA*). Metodo smo najprej optimizirali in določili njeno analitično in diagnostično specifičnost, selektivnost in ponovljivost. Uporabnost in delovanje metode smo preverili na setih vzorcev iz dveh lokacij, kjer so se pojavila obolenja tipično povzročena z APEC. Analizirali smo različne tipe vzorcev različnih tkivnotranjih organov poginjenih živali, okoljskih vzorcev in brisov živih živali, kjer smo uporabili enostaven postopek lize celic, ki je lahko izvedljiv na terenu samem. Z metodo LAMP smo v času krajšem od 30 minut določili prisotnost vseh treh virulentnih genov v vzorcih poginjenih živali. Izbrani geni so se pojavljali tudi v vzorcih brisov živih živali in okoljskih vzorcev, vendar v manjši meri. Metoda LAMP se je izkazala kot hitra in zanesljiva metoda za določanje izbranih tarčnih genov na terenu.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Ocenjujemo, da smo zastavljeni program dela in cilje uresničili v celoti:

- Z raziskavo smo potrdili prisotnost rezistentnih sevov E. coli v rejah perutnine.
- Določili smo način prenosa in možnosti širjenja teh sevov v rejah perutnine. Rezultati naše raziskave kažejo, da se ti sevi v reje prenašajo po vertikalni poti, še večji pa je potencialni vnos iz zunanega okolja.
- Rezistentne seve smo potrdili v okoljskih vzorcih, kar kaže na večjo možnost okužb ljudi, ki delajo na perutninskih farmah in klavnica.
- Preučili smo vpliv protimikrobnih terapij in kokcidiostatikov na pojavnost rezistentnih sevov.
- Določili smo molekularne determinante patogenosti E. coli, ki jih je mogoče uporabiti za ločevanje patogenih od komenzalnih sevov.
- Uvedli smo nove diagnostične metode za hitro molekularno določanje patogenih sevov E.coli, ki so uporabni tudi v preprostejših laboratorijih ali na terenu.
- Preučili smo dejavnike, ki povečujejo tveganja za nastanek kolibaciloz.
- Ovrednotili smo možnost preventivnega cepljenja proti kolibacilozi v rejah perutnine.
- Rezultati projekta so strokovna osnova za boljšo in konkurenčnejšo rejo perutnine.
- Pripravili smo Smernice in priporočila za obvladovanje kolibaciloz v rejah perutnine

6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

Odstopanj tako v programu kot tudi v sestavi projektne skupine ni bilo.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek																	
1.	<table border="1"> <tr> <td>COBISS ID</td> <td>4052602</td> <td>Vir: COBISS.SI</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Naslov</td> <td>SLO</td> <td>Možni viri okužbe z Echerichia coli v matičnih jatah in jatah pitovnih puranov v Sloveniji in molekularna karakterizacija izolatov</td> </tr> <tr> <td>ANG</td> <td>Possible sources of Escherichia coli introduction in broiler breeder and turkey flocks in Slovenia and molecular characterization of isolates</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Opis</td> <td>SLO</td> <td>Preučili smo možne dejavnike za vnos E.coli in E.coli z ESBL v matičnih jatah in jatah puranov. V času vzreje smo vzočili organe poginjenih živali, iztrebkov in zraka. Kljub temu, da so bili vsi vzorci okolja pred vselitvijo živali v objekte negativni na prisotnost E.coli z ESBL, smo takšne vzorce potrdili kasneje v času vzreje. V večini primerov so bili pozitivni okoljski vzorci, kar nakazuje na vnos s fecesom in zrakom. Molekularna analiza izolatov, ki smo jih pridobili iz jat z izbruhi kolibaciloze in tistih okoljskih vzorcev, je pokazala, da se statistično značilno pogosteje pojavljajo geni ompT, traT, fyuA irp2 in cvi v vzorcih poginjenih živali.</td> </tr> <tr> <td>ANG</td> <td>We investigated possible sources of E. coli including ESBL producing E. coli introduction in poultry flocks. During the rearing period organs of dead chickens, faeces/boot swabs and air samples were taken. Although all environmental samples and organs from birds at arrival were negative for ESBL producing E. coli, such isolates were confirmed later on. Mostly air samples and boot swabs were positive which indicate faecal and airborne transfer. E. coli VAGs from poultry before placement and transportation boxes was compared with the virulence profile from subsequent isolated animal and environmental strains in each flock. Taken altogether, the following VAGs were statistically significantly more prevalent among isolates from diseased/death animals than in environmental isolates: ompT, traT, fyuA, irp2 and cvi, indicating that they are not environmentally aquired.</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td>World Veterinary Poultry Association; Abstracts, programme and show guide; 2015; Str. 795-799; Avtorji / Authors: Zorman-Rojs Olga, Dovč</td> </tr> </table>	COBISS ID	4052602	Vir: COBISS.SI	Naslov	SLO	Možni viri okužbe z Echerichia coli v matičnih jatah in jatah pitovnih puranov v Sloveniji in molekularna karakterizacija izolatov	ANG	Possible sources of Escherichia coli introduction in broiler breeder and turkey flocks in Slovenia and molecular characterization of isolates	Opis	SLO	Preučili smo možne dejavnike za vnos E.coli in E.coli z ESBL v matičnih jatah in jatah puranov. V času vzreje smo vzočili organe poginjenih živali, iztrebkov in zraka. Kljub temu, da so bili vsi vzorci okolja pred vselitvijo živali v objekte negativni na prisotnost E.coli z ESBL, smo takšne vzorce potrdili kasneje v času vzreje. V večini primerov so bili pozitivni okoljski vzorci, kar nakazuje na vnos s fecesom in zrakom. Molekularna analiza izolatov, ki smo jih pridobili iz jat z izbruhi kolibaciloze in tistih okoljskih vzorcev, je pokazala, da se statistično značilno pogosteje pojavljajo geni ompT, traT, fyuA irp2 in cvi v vzorcih poginjenih živali.	ANG	We investigated possible sources of E. coli including ESBL producing E. coli introduction in poultry flocks. During the rearing period organs of dead chickens, faeces/boot swabs and air samples were taken. Although all environmental samples and organs from birds at arrival were negative for ESBL producing E. coli, such isolates were confirmed later on. Mostly air samples and boot swabs were positive which indicate faecal and airborne transfer. E. coli VAGs from poultry before placement and transportation boxes was compared with the virulence profile from subsequent isolated animal and environmental strains in each flock. Taken altogether, the following VAGs were statistically significantly more prevalent among isolates from diseased/death animals than in environmental isolates: ompT, traT, fyuA, irp2 and cvi, indicating that they are not environmentally aquired.			World Veterinary Poultry Association; Abstracts, programme and show guide; 2015; Str. 795-799; Avtorji / Authors: Zorman-Rojs Olga, Dovč
COBISS ID	4052602	Vir: COBISS.SI															
Naslov	SLO	Možni viri okužbe z Echerichia coli v matičnih jatah in jatah pitovnih puranov v Sloveniji in molekularna karakterizacija izolatov															
	ANG	Possible sources of Escherichia coli introduction in broiler breeder and turkey flocks in Slovenia and molecular characterization of isolates															
Opis	SLO	Preučili smo možne dejavnike za vnos E.coli in E.coli z ESBL v matičnih jatah in jatah puranov. V času vzreje smo vzočili organe poginjenih živali, iztrebkov in zraka. Kljub temu, da so bili vsi vzorci okolja pred vselitvijo živali v objekte negativni na prisotnost E.coli z ESBL, smo takšne vzorce potrdili kasneje v času vzreje. V večini primerov so bili pozitivni okoljski vzorci, kar nakazuje na vnos s fecesom in zrakom. Molekularna analiza izolatov, ki smo jih pridobili iz jat z izbruhi kolibaciloze in tistih okoljskih vzorcev, je pokazala, da se statistično značilno pogosteje pojavljajo geni ompT, traT, fyuA irp2 in cvi v vzorcih poginjenih živali.															
	ANG	We investigated possible sources of E. coli including ESBL producing E. coli introduction in poultry flocks. During the rearing period organs of dead chickens, faeces/boot swabs and air samples were taken. Although all environmental samples and organs from birds at arrival were negative for ESBL producing E. coli, such isolates were confirmed later on. Mostly air samples and boot swabs were positive which indicate faecal and airborne transfer. E. coli VAGs from poultry before placement and transportation boxes was compared with the virulence profile from subsequent isolated animal and environmental strains in each flock. Taken altogether, the following VAGs were statistically significantly more prevalent among isolates from diseased/death animals than in environmental isolates: ompT, traT, fyuA, irp2 and cvi, indicating that they are not environmentally aquired.															
		World Veterinary Poultry Association; Abstracts, programme and show guide; 2015; Str. 795-799; Avtorji / Authors: Zorman-Rojs Olga, Dovč															

	Objavljeno v	Alenka, Slavec Brigita, Krapež Uroš, Mlakar Nina, Mićunović Jasna, Zdovc Irena, Pintarič Štefan, Juršič-Cizerl Rahela, Kovačič Tomaž, Šemrov Neva, Ambrožič Jerneja	
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
2.	COBISS ID	450053626	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	SLO	Hitra molekularna analiza LAMP za določanje virulenčnih genov APEC v reji perutnine
		ANG	Rapid molecular analysis for detection of APEC virulence genes in poultry
	Opis	SLO	Za hitro določanje treh virulenčnih genov za perutnino patogenih <i>Escherichia coli</i> (APEC) smo razvili metodo izotermalno pomnoževanje posredovano z zanko (loop mediated isothermal amplification, LAMP). Uporabnost in delovanje metode smo preverili na setih vzorcev iz dveh lokacij, kjer so se pojavila obolenja tipična za APEC. Analizirali smo različne tipe vzorcev različnih tkiv notranjih organov poginjenih živali, okoljskih vzorcev in brisov živih živali, kjer smo uporabili enostaven postopek lize celic, ki je lahko izvedljiv na terenu samem. Z metodo LAMP smo v času krajšem od 30 minut določili prisotnost vseh treh virulenčnih genov v vzorcih poginjenih živali. Izbrani geni so se pojavljali tudi v vzorcih brisov živih živali in okoljskih vzorcev, vendar v manjši meri. Metoda LAMP se je izkazala kot hitra in zanesljiva metoda za določanje izbranih tarčnih genov na terenu
		ANG	A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for fast detection of three avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> (APEC) virulence genes was developed. Applicability and performance of the method was tested on sets of samples from two different locations where disease symptoms typical of APEC occurred. Different types of samples of various tissues of the dead animals' internal organs, environmental samples, and live animals' swabs were tested. A simple procedure of cell lysis which is feasible to be done on the field was used for sample preparation. We were able to detect virulence genes in samples isolated from dead animals in less than 30 minutes with LAMP method. Selected genes were detected also in samples of swabs of live animals, and environmental samples, but to a lesser extent. Method LAMP has proven to be fast and reliable method for detection of the selected genes in the field.
	Objavljeno v	KOGOVSĚK, Polona, VRŠĚAJ, Marjetka, AMBROŽIĚ, Jerneja, DOVĚ, Alenka, SLAVEC, Brigita, RAVNIKAR, Maja, POJE, Janez, JURŠIĚ CIZERL, Rahela, KRAPEŽ, Uroš, ZORMAN-ROJS, Olga. Hitra molekularna analiza LAMP za določanje virulenčnih genov APEC v reji perutnine = LAMP: rapid molecular analysis for detection of APEC virulence genes in poultry. V: MAJDIĚ, Gregor (ur.). 6. Slovenski veterinarski kongres 2016 = 6th Slovenian Veterinary Congress 2016 : Portorož, 2. -3. December 2016, 6. slovenski veterinarski kongres, Portorož, 2. -3. december 2016, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Vol. 53, suppl. 17, 2016). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2016, str. 143-144.	
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	4053626	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	<i>Escherichia coli</i> - eden od pogostejših in pomembnejših patogenov pri perutnini
		ANG	<i>Escherichia coli</i> - one the most common and important pathogen in poultry

Opis	SLO	Kolibaciloza, ki se pojavlja pri vseh vrstah tic, je ene najpomembnejših bolezni v intenzivnih rejah perutnine. Četudi je <i>Escherichia coli</i> normalen prebivalec prebavnega trakta perutnine, so nekateri sevi zelo patogeni in povzročajo velike ekonomske izgube. V zadnjih letih so bile okužbe z <i>E. coli</i> v naši državi precej pogoste in so povzročile tudi do 11% pogin. Takšne jate je bilo seveda potrebno zdraviti s protimikrobnimi zdravili, vendar uspeh ni bil vedno dober. V študiji smo se osredotočili na ugotavljanje vzrokov za nastalo situacijo, določili smo dejavnike virulentnosti in določili občutljivost izolatov na pogosteje uporabljane antibiotike. Poleg tega smo raziskali tudi možne vire okužb z rezistentnimi sevi, posebej z vidika možnega prenosa na humano populacijo.	
	ANG	Avian colibacillosis has been reported in birds of all ages and in the intensive poultry production colibacillosis is one of the most important health and economical problem. Although <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) is a normal inhabitant of the gastrointestinal tract of poultry; however, some strains can induce severe disease in birds. Such strains are known as avian pathogenic <i>E. coli</i> (APEC). In Slovenia, in the last years infections with APEC caused very high economic losses in broilers as well as in broiler breeders in various form of the disease. In some broiler flocks APEC outbreaks caused as much as 11% mortality. Flocks were treated with antimicrobials, but very often with limited success. This situation called for special attention and further studies were focused on virulence factors of <i>E. coli</i> strains and the detection of antimicrobial susceptibility of isolates. Beside this, possible sources of infection with resistant strains were investigated having in mind possible transition of resistance strains to humans through contaminated meat or via environmental contamination	
Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci		
Objavljeno v	Ciiip žvinarstvo; Zbornik radova; Žvinarstvo; 2015; God. 49, br. 7/8; str. 2-8; Avtorji / Authors: Slavec Brigita, Dovč Alenka, Krapež Uroš, Mlakar Nina, Micunovič Jasna, Zdovc Irena, Pintarič Štefan, Ambrožič Avguštin Jerneja, Zorman-Rojs Olga		
Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci		
2. COBISS ID	4051322	Vir: COBISS.SI	
Naslov	SLO	Optimal vaccinal programmes and efficacy of drug treatment in poultry	
	ANG	Optimalna vakcinalna zaščita za uspeh antibiotičnih terapij	
Opis	SLO	Predstavili smo možne patogene (predvsem respiratorne in imunosupresivne), ki vzpodbudijo izbruhe bakterijskih bolezni pri perutnini in pomen ustreznih imunoprofilaktičnih programov za zaščito zdravja živali in preprečevanja antibiotične terapije.	
	ANG	Influence of respiratory and immunosuppressive pathogens on outbreaks of bacterial diseases (mainly on <i>E. coli</i>) was presented and the importance of establishing effective immunoprophylactic programmes on health status and antimicrobial therapy were discussed.	
Šifra	B.04 Vabljen predavanje		
Objavljeno v	The Faculty of Veterinary Medicine; 2015; Avtorji / Authors: Zorman-Rojs Olga		
Tipologija	3.16 Vabljen predavanje na konferenci brez natisa		

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

- Predstavitve rezultatov projekta za zainteresirano strokovno javnost Rezultate smo predstavili tudi v okviru enodnevnega seminarja Komisije za perutnino pri Veterinarski Zbornici

Slovenije dne 17.12.2016. Vodja projekta Olga Zorman Rojs je rezultate projekta predstavila tudi na mednarodnem strokovnem seminarju v organizaciji Krke d.d. v Beogradu dne 1.6.2016 »Krka v zdravstvenem varstvu prašičev in perutnine« v okviru dveh predavanj: "Laboratory testing: when, where and how many" in "Interplay of management, health and production results in poultry flocks". - Aktivnosti članov projektne skupine Alenka Dovč: pridobila naziv diplomata na evropski ravni: Diplomate of the European College of Animal Welfare & Behavioural medicine (ECAWBM-AWSEL), podpredsednica Strokovnega sveta za zaščito živali pri MKO. Olga Zorman Rojs: predsednica Sveta za veterinarstvo, članica Znanstveno raziskovalnega sveta za biotehniko, vodja slovenskega partnerja projekta 544270 TEMPUS 1 2013 1 RS TEMPUS JPCR Serbia: striving towards excellence in veterinary education. Maja Ravnikar članica Sveta za znanost Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, je aktivna članica evropskega društva za patologijo rastlin EPPO (European Plant Protection Organization), deluje v Panelu za diagnostiko in zagotavljanje kakovosti diagnostičnih laboratorijev Matjaž Ocepek je predsednik Mikrobiološkega društva Slovenije in član večih uredništev mednarodnih znanstvenih in strokovnih revij. Raziskovalci so vodje referenčnih laboratorijev, ki delujejo v okviru Nacionalnega veterinarskega inštituta (Zdovc, Krapež, Mičunovič, Slavec, Ocepek).

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Problem naraščajoče sekundarne oz. pridobljene bakterijske odpornosti proti antibiotikom dobiva velike razsežnosti tako v humani kot tudi v veterinarski medicini. V zadnjem času so posebej izpostavljene različne vrste enterobakterij, ki izločajo različne betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja - ESBL (extended-spectrum β -lactamase). Okužbe s patogenimi sevi *Escherichia coli* (*E. coli*) lahko privedejo do različnih obolenj tako pri živalih kot tudi pri ljudeh. V intenzivnih rejah perutnine so okužbe z *E. coli* izjemno pogoste. Kolibaciloze - okužbe z za perutnino patogenimi sevi *E. coli* (ang. avian pathogenic *E. coli*, APEC), povzročajo velike ekonomske izgube. Gre za kompleksno obolenje, saj se bolezenska stanja izražajo v različnih oblikah. Odvisno od patogenosti seva, občutljivosti gostitelja in negativnih vplivov okolja ter sočasnih drugih obolenj, okužba lahko poteka v septikemični obliki z visokim poginom ali pa pride do lokaliziranih vnetij seroznih open. Zapažanja, da so sevi potrjeni pri perutnini serotopsko kot po dejavnih virulenc podobni humanim sevov, izpostavlja tudi njihov morebitni zoonotski potencial. Eden od glavnih ciljev projekta je bil ugotoviti, kakšna je pojavnost in katere so kritične točke vnosa *E. coli* s posebnim poudarkom na *E. coli* z ESBL v reje perutnine. Z usmerjenimi raziskavami smo želeli določiti dejavnike, ki vplivajo na pojav kolibaciloze pri perutnini z namenom znižanja izgub, manjše uporabe terapevtikov in boljšega počutja živali. Sloveniji vse do naše študije nismo razpolagali s podatkom o pojavnosti proti antibiotikom odpornih/rezistentnih sevov *E. coli* v rejah perutnine. Čeprav rezistentnih sevov *E. coli* nismo potrdili v okoljskih vzorcih, ki smo jih odvzeli v objektih perutnine pred vselitvijo živali, smo v času reje potrdili te seve pri vseh vrstah in kategorijah perutnine. Potrditev *E. coli* z ESBL v zraku (17,40%) in iztrebkih (23,18%) pa nakazuje tudi na možnost okužb ljudi, predvsem delavcev na farmah. Pojav rezistentnih sevov se v veliki meri povezuje s prekomerno uporabo protimikrobnih zdravil, vendar tega rezultati naše raziskave ne potrjujejo, najverjetneje je pomembnejši vertikalni in horizontalni prenos. V okviru raziskave smo poskusili identificirati tudi faktorje virulentnosti APEC. Izolate *E. coli*, ki smo jih pridobili tekom študije, in seve, ki smo jih izolirali iz poginjenih živali z značilnimi znaki kolibaciloze, smo preiskali na prisotnost 19 genov, povezanih z virulenco *E. coli*. Analiza primerjave prisotnosti genov je pokazala, da bi bilo mogoče ločiti patogene seve od nepatogenih na osnovi detekcije šestih genov. V okviru projekta smo razvili izotermalno metodo LAMP za določane APEC. Uporabnost in delovanje metode smo preverili v laboratorijskih in terenskih pogojih.

ANG

Antimicrobial resistance is a major and increasing global problem in human and veterinary medicine. During the past decade, drug resistance in Enterobacteriaceae has increased dramatically worldwide. This has been caused mainly by an increased prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*), causes a number of diseases in both animals and humans. In poultry,

infections with avian pathogenic *E. coli* (APEC) cause colibacillosis, an acute and mostly systemic disease resulting in significant economic losses. Avian colibacillosis is a complex syndrome characterized by multiple organ lesions. Environmental factors as well as the constitution of poultry or initial viral infections influence the outcome of APEC-infections. As APEC share not only identical serotypes with human pathogens but also specific virulence factors, their zoonotic potential is under consideration. One of the main goal of the project was to determine critical points of introduction of *E. coli* including ESBL producing *E. coli*, in poultry flocks in order to reduce production losses, antibiotic treatment and to increase animal welfare. In addition, factors associated with the *E. coli* infection and the clinical outcomes of infection in all categories of poultry were evaluated. Before this study, no data on prevalence of ESBL or AmpC producing *E. coli* in poultry farms were available in Slovenia. Results of our study showed that although environmental samples taken before placement of birds in the farms were negative for ESBL and AmpC producing *E. coli*, ESBL/AmpC producing *E. coli* were detected in all production types of poultry. ESBL producing *E. coli* found in the air (17.40%) and faecal (23.18%) samples indicate a risk for people who work on the farms. The results also suggest that intake of antibiotics are a less important factor than vertical transmission or horizontal contamination. To identify virulence factors characteristic APEC we compared outbreak strains isolated from diseased chickens with non-outbreak strains by determining their profile of 19 virulence associated genes (VAGs). The results were analyzed by multiple correspondence analysis and six genes were identified as being most significantly associated with pathogenic APEC strains. Within the project a loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for fast detection of avian pathogenic *E. coli* was developed. The method has proven to be fast and reliable for detection of the selected genes in laboratory as well as in field conditions.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Perutninsko meso je eno od najpomembnejših virov animalnih proteinov za prehrano ljudi. Reja perutnine je ena najpomembnejših panog živinorejske proizvodnje v Sloveniji. Načini intenzivne reje perutnine zaradi svojih značilnosti zahtevajo specifični pristop pri ohranjanju zdravja teh živali in preprečevanju okužb. Gre za večje aglomeracije živali na relativno majhnem prostoru, to omogoča izjemno hitro širjenje različnih patogenov in širjenja bolezni. V primeru bakterijskih okužb je zdravljenje z antibiotiki nujno, s tem pa obstaja večja možnost razvoja in širjenja odpornih sevov. Intenzivni pogoji reje predstavljajo za živali stres, kar se lahko izkaže na različne načine; najpogosteje gre za imunospresivno delovanje, kar privede do večje dovzetnosti za različne bolezni. Okužbe perutnine s patogenimi sevi *E. coli* so ena najpogostejših bolezni perutnine v intenzivnih rejah. Gre za kompleksne okužbe, ki se kažejo v različnih oblikah, od akutne septikemije do kroničnih lokalnih vnetij. Kolibaciloza v rejah perutnine povzroča visok pogin, znižano nesnost, znižano valilnost, bolne jate pa je potrebno zdraviti. V okviru naših raziskav smo opredelili dejavnike tveganja, ki so pomembni za pojav okužb perutnine z *E. coli*. Na osnovi dognanj smo pripravili smernice in priporočila za preprečevanje okužb z *E. coli* in kolibaciloze, kar omogoča zdravje perutnine, njeno dobro počutje in znižanje uporabe protimikrobnih zdravil. Projekt je bil naravnano izjemno aplikativno in njegovi rezultati kot taki omogočajo ohranjanje in večjo konkurenčnost te živinorejske panoge v Sloveniji. Preprečevanje okužb z *E. coli* in kolibaciloze v perutninskih jatah vodi do zmanjšanja uporabe antibiotikov, kar je eden od najpomembnejših dejavnikov v boju proti protimikrobni odpornosti.

ANG

Poultry meat is one of the world's most important sources of animal proteins for human consumption. In Slovenia, poultry farming is one of the most stable livestock industries. With numerous animals housed on confined area intensive poultry production requires a special approach in disease prevention. Namely, within a flock infections can spread very rapidly and therapy is problematic due to antimicrobial resistance. On the other hand, animals in intensive poultry farming systems are facing stress, which manifests itself in different ways, very often as a negative effect on immune system which could result in increased susceptibility for various diseases. Infections with avian pathogenic *E. coli* (APEC) cause colibacillosis, an acute and mostly systemic disease which is one of the major health problem in intensive raised poultry. Outbreaks can cause high economical losses due to higher mortality, reduced egg production, reduced hatchability and need for antibiotic treatment. Within the project we

evaluated the factors associated with the E. coli infection and the clinical outcomes of the disease in all categories of poultry. In addition, efficiency of prophylactic vaccination against E. coli was evaluated and the sources of E.coli introduction into the poultry farms were studied. The very important outcome of the project is development of the guideline for the control of colibacillosis in poultry flocks. The results of the project are directly applicable for poultry producers in Slovenia and as such have positive effect from the view of competition of international poultry market. Moreover, infection prevention and control of colibacillosis in poultry flocks enables reduction of antibiotic use, which is important for the effective battle against antimicrobial resistance.

11.Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

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

- v domačih znanstvenih krogih
 pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sfinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹¹

Ker je bil projekt izrazito aplikativno naravnani in se podobna problematika pojavlja tudi drugod o svetu, so interes po novih spoznanjih pokazali vsi nosilci perutnine proizvodnje v Sloveniji. Preliminarne rezultate že tekom študije predstavili na simpoziju perutninarjev v Srbiji, interes so pokazale tudi farmacevtske firme (Krka), ki nas je zaprosila za predavanja za njihove poslovne partnerje iz Rusije.

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

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

- v mednarodnih znanstvenih krogih
 pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹²

COST Action FA1207 7OP Decathlon - Development of Cost efficient Advanced DNA-based methods for specific Traceability issues and High Level On-site applications EMRP InfectMet - Metrology for monitoring infectious diseases, antimicrobial resistance, and harmful micro-organisms EMRP Bio-SITrace - Implementing traceability for biological relevant molecules and entities Med Vet Net, WP4 PulseNet Europe FP7 AGRICISTRAD COST Action CA15134 FA COST Action FA1404

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹³

Gre za izboljšanje tehnološke razvitosti pri diagnostičnih metodah in poznavanju delovanja patogenov ter izboljšanje tehnologij reje živali.

12.Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj	
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin
	Zastavljen cilj <input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text" value="Dosežen"/>

	Uporaba rezultatov	V celoti
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.05	Spособnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.11	Razvoj nove storitve	

	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
	Uporaba rezultatov	Delno
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE

	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value="Dosežen"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value="V celoti"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value="Dosežen"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value="V celoti"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>

Komentar

Projekt je bil naravnano izrazito aplikativno, vanj so bili vključeni poleg raziskovalcev tudi strokovnjaki iz pomembnejših podjetij, ki se ukvarjajo z prirajo perutnine v Sloveniji. Prav iz njihove strani je bil izkazan interes za takšno raziskavo, saj so zdravstvene težave, ki jih povzročajo okužbe z E. coli, izjemno pogoste in povzročajo velike ekonomske izgube. Projekt je privedel do novih praktičnih znanj in veščin, hkrati pa tudi novih znanstvenih spoznanj. V okviru projekta smo opravili strokovno oceno stanja na področju okužb perutnine z E. coli kot tudi predlagali smernice mogočih rešitev za njeno izboljšanje. Z vidika hitre in zanesljive diagnostike E. coli je razvoj nove diagnostične metode LAMP za dokaz E. coli izjemno pomemben, saj omogoča hitrejšo diagnostiko, ki je izvedljiva tudi na terenu. V okviru projekta smo s sistematičnim pristopom preiskav pridobili podatke o prisotnosti E. coli, ki izločajo encime ESBL pri perutnini, rezultati preiskav okoljskih vzorcev – zraka in iztrebkov nakazujejo na potencialno ogroženost ljudi, ki so pri svojem delu v vsakodnevem stiku s perutnino. Tekom projekta osvojena nova spoznanja smo posredovali širšemu krogu v obliki predavanj na dodiplomskem izobraževanju kot tudi mednarodni strokovni javnosti.

13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
G.09.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Komentar**14. Izjemni dosežek v letu 2016¹⁴****14.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Projekt je bil zelo obsežen, zato izjemnega znanstvenega dosežka še ne moremo predstaviti, je pa v pripravi.

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

V okviru projekta smo izdelali SMERNICE IN PRIPOROČILA ZA OBVLADOVANJE KOLIBACIOZ V REJAH PERUTNINE in PRIPOROČILA ZA OBVLADOVANJE E. coli Z ESBL/AmpC. Dosežke projekta smo predstavili na Strokovno izobraževalnem seminarju komisije za perutnino, pri veterinarski zbornici Slovenije dne, 21.11.2016 (Sora pri Medvodah). Strokovnega srečaa se je udeležilo 28 slušateljev iz Slovenije in tujine. prof. dr. Olga Zorman Rojs (VF, Univerza v LJ): Predstavitev rezultatov projekta (V4-1401): Obvladovanje okužb z E.coli pri perutnini: Določitev kritičnih mest vnosa E.coli, vključno z E.coli z ESBL v reje perutnine in študija preventivnih ukrepov za zmanjševanje porabe protimikrobnih zdravil.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

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

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Veterinarska
fakulteta

Olga Zorman Rojs

ŽIG

Datum:

6.3.2017

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2017/14

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

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

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

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

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta.

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

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta.

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

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

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

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

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

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁴ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2016 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu.

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

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2017 v1.00

57-38-FC-C5-8C-98-CF-C5-53-29-9A-E8-DE-2E-91-F3-46-D1-16-4A

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP)
»ZAGOTOVIMO.SI HRANO ZA JUTRI« 2011 – 2020«

Naslov projekta: Obvladovanje okužb z *E. coli* pri perutnini: Določitev kritičnih mest vnosa bakterije *E. coli*, vključno z *E. coli* z ESBL v reje perutnine in študija preventivnih ukrepov za zmanjševanje porabe protimikrobnih zdravil (V4-1401)

Izvajalci:

- Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
- Nacionalni inštitut za biologijo
- Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
- PERUTNINA PTUJ, reja perutnine, proizvodnja krmil, perutninskega mesa in izdelkov, trgovina in storitve d.d.
- PAN-NUTRI, Kmetijsko živilski tehnološki center d.o.o

Odgovorni nosilec: prof. dr. Olga Zorman Rojs, dr. vet. med., dipl. ECPVS

Ljubljana, marec 2017

Obvladovanje okužb z *E. coli* pri perutnini: Določitev kritičnih mest vnosa bakterije *E. coli*, vključno z *E. coli* z ESBL v reje perutnine in študija preventivnih ukrepov za zmanjševanje porabe protimikrobnih zdravil

Izvleček

Problem naraščajoče sekundarne oz. pridobljene bakterijske odpornosti proti antibiotikom dobiva velike razsežnosti tako v humani kot tudi v veterinarski medicini. Proti različnim antibiotikom odporni sevi se pojavljajo v različnih skupinah oz. rodovih bakterij. Z nekritično rabo antibiotikov na vseh področjih se izvaja velik selekcijski pritisk, ki ga po krajšem ali daljšem času preživijo le najbolj odporni sevi. Glede na to so bakterije razvile različne oblike odpornosti. V zadnjem času so posebej izpostavljene različne vrste enterobakterij, ki izločajo različne betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja - ESBL (extended-spectrum β -lactamase). Okužbe s patogenimi sevi *Escherichia coli* (*E. coli*) lahko privedejo do različnih obolenj tako pri živalih kot tudi pri ljudeh. Kljub temu, da je težko z gotovostjo izslediti izvor okužb, obstaja verjetnost njihovega prenosa iz živali oz. kontaminiranega okolja. V intenzivnih rejah perutnine so okužbe z *E. coli* izjemno pogoste. Kolibaciloze, okužbe z za perutnino patogenimi sevi *E. coli* (ang. avian pathogenic *E. coli*, APEC), povzročajo velike ekonomske izgube. Gre za kompleksno obolenje, saj se bolezenska stanja izražajo v različnih oblikah. Odvisno od patogenosti seva, občutljivosti gostitelja in negativnih vplivov okolja ter sočasnih drugih obolenj, okužba lahko poteka v septikemični obliki z visokim poginom ali pa pride do lokaliziranih vnetij seroznih open, organov in tkiv.

Eden od glavnih ciljev projekta je bil ugotoviti, kakšna je pojavnost in katere so kritične točke vnosa *E. coli* s posebnim poudarkom na *E. coli* z ESBL v reje perutnine. Z usmerjenimi raziskavami smo želeli določiti dejavnike, ki vplivajo na pojav kolibaciloze pri perutnini z namenom znižanja izgub, manjše uporabe terapevtikov in boljšega počutja živali. V ta del raziskave smo vključili 11 jat perutnine, ki smo jih spremljali od vhljevitve do konca reje. Vključene so bile tri matične jate težkih hibridov, 4 piščancev brojlerjev, ki so izvirale iz teh matičnih jat in 4 jate pitovnih puranov. Pogoji reje in zaščitni programi cepljenja so bili v posamezni kategoriji živali primerljivi. Matične jate so se med seboj razlikovale glede koncepta prenevanja kokcidioze in *E. coli*; dve jati sta bili cepljeni proti kokcidiozi, ena je v času vzreje v krmi dobivala kokcidiostatik. Preventivni program cepljenja proti *E. coli* z uporabo živih atenuiranih cepiv in inaktiviranih cepiv je bil izveden le v eni jati. Usmerjene preiskave na *E. coli* in *E. coli* z Ampc/ESBL so bile opravljene pred vselitvijo živali v objekte in v času reje. Matične jate smo vzorčili pet-krat, jate brojlerjev tri-krat in jate puranov šest-krat. V vseh kategorijah perutnine smo skupno odvzeli in preiskali 349 vzorcev različnega izvora; vključeni so bili vzorci zraka, iztrebki in organi poginjenih ali izločenih živali. V vseh jatah smo spremljali zdravstveno stanje, pogin in proizvodne parametre. V raziskavo smo vključili tudi dve jati konzumnih nesnic z izrazitimi znaki kolibaciloze; živali so poginjale, v jati je bila izrazito znižana nesnost. V jatah perutnine, ki smo jih spremljali skozi ves čas reje, izbruhov kolibaciloze ni bilo, kljub temu da smo z bakteriološkimi preiskavami potrdili *E. coli* v več kot 90 % vzorcev. Dodatne laboratorijske preiskave so pokazale, da jate niso bile okužene z mikoplazmami niti z imunosupresivnimi virusi. V študiji izbruhov kolibaciloze v jatah konzumnih nesnic smo ugotovili, da so bile kokoši sočasno okužene z *E. coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* in *Mycoplasma synoviae*, hkrati smo potrdili tudi močno invadiranost z rdečo pršico (*Dermanyssus gallinae*). Raziskave vsekakor potrjujejo, da so klinični izbruhi kolibaciloz povezani s sočasnim delovanjem več patogenov in z oslabeлим organizmom živali.

Z omejenimi raziskavami nismo potrdili učinkovitosti zaščitnega cepljenja proti *E. coli* pri matičnih jatah. V času vzreje je bil pogin višji v cepljeni jati kot v tisti, ki ni bila cepljena, proizvodni rezultati

ob koncu reje pa so bili med jatami primerljivi. Pri potomcih cepljene jate pa smo potrdili nižje izgube v prvem tednu pitanja, kar je lahko posledica prenesene maternalne imunosti, po drugi strani pa je kakovost dan starega piščanca močno vezana na kvaliteto in sanitacijo valilnih jajc. Glede na to, da smo spremljali le eno matično jato, so te ugotovitve vsekakor preuranjene. Za oceno smiselnosti cepljenja bi bilo potrebo vključiti večje število tako matičnih jat kot tudi njihovih potomcev.

V Sloveniji vse do naše študije nismo razpolagali s podatkom o pojavnosti proti antibiotikom odpornih/rezistentnih sevov *E. coli* v rejah perutnine. Različna poročila navajajo, da se rezistentni sevi lahko širijo vertikalno, mogoča je tudi horizontalna pot širjenja. Ta je najverjetneje posledica slabega čiščenja in dezinfekcije objektov. Z našimi raziskavami rezistentnih sevov *E. coli* nismo potrdili v okoljskih vzorcih, ki smo jih odvzeli v objektih perutnine pred vselitvijo živali. Negativni so bili tako vzorci brisov sten, opreme, vode, stelje in krme. Z nadaljnjim spremljanjem smo prisotnost rezistentnih sevov potrdili v vseh treh kategorijah perutnine. Pozitivne so bile vse matične jate, v jatah pitovne perutnine pa smo *E. coli* z AmpC/ESBL potrdili v prvem tednu pri 37,5% testiranih jat, ob koncu pitanja je prevalenca narasla na 62,5%. Rezistentne seve smo v primerljivem odstotku potrdili tako v zraku, kot tudi v iztrebkih in organih živali. Potrditev *E. coli* z ESBL v zraku (17,40%) in iztrebkih (23,18%) nakazuje tudi na možnost okužb ljudi, predvsem delavcev na farmah. Pojav rezistentnih sevov se v veliki meri povezuje s prekomerno uporabo protimikrobnih zdravil. V okviru naše raziskave tega nismo potrdili.

Determinante patogenosti pri sevih APEC še niso popolnoma pojasnjene. Za ločevanje za perutnino patogenih sevov *E. coli* od nepatogenih oz. komenzalov se v zadnjem času uporabljajo predvsem molekularne metode za odkrivanje prisotnosti genov za dejavnike virulence (VAGs – angl. virulence associated genes), ki omogočajo različen patogeni potencial *E. coli*. Izolate *E. coli*, ki smo jih pridobili tekom študije, in seve, ki smo jih izolirali iz poginjenih živali z značilnimi znaki kolibaciloze, smo preiskali na prisotnost 19 genov, povezanih z virulenco *E. coli*. Analiza primerjave prisotnosti genov je pokazala, da bi bilo mogoče ločiti patogene seve od nepatogenih na osnovi detekcije genov *ompT*, *iss*, *traT*, *iroN* *iucD* in *iutA*.

V okviru projekta smo razvili izotermalno metodo LAMP za določane patogenih sevov *E. coli* pri perutnini na osnovi treh virulentnih genov (*ompT*, *traT*, *sitA*). Metodo smo najprej optimizirali in določili njeno analitično in diagnostično specifičnost, selektivnost in ponovljivost. Uporabnost in delovanje metode smo preverili na setih vzorcev iz dveh lokacij, kjer so se pojavila obolenja tipično povzročena z APEC. Analizirali smo različne tipe vzorcev; različnih tkiv notranjih organov poginjenih živali, okoljskih vzorcev in brisov živih živali, kjer smo uporabili enostaven postopek lize celic, ki je lahko izvedljiv na terenu samem. Z metodo LAMP smo v času krajšem od 30 minut določili prisotnost vseh treh virulenčnih genov v vzorcih poginjenih živali. Izbrani geni so se pojavljali tudi v vzorcih brisov živih živali in okoljskih vzorcev, vendar v manjši meri. Metoda LAMP se je izkazala kot hitra in zanesljiva metoda za določanje izbranih tarčnih genov na terenu.

Summary

Antimicrobial resistance is a major and increasing global problem in human and veterinary medicine. During the past decade, drug resistance in Enterobacteriaceae has increased dramatically worldwide. This has been caused mainly by an increased prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*), causes a number of diseases in both animals and humans. In poultry, infections with avian pathogenic *E. coli* (APEC) cause colibacillosis, an acute and mostly systemic disease resulting in significant economic losses. Avian colibacillosis is a complex syndrome characterized by multiple organ lesions with airsacculitis and associated pericarditis, perihepatitis and peritonitis being most typical. Environmental factors as well as the constitution of poultry or initial viral infections influence the outcome of APEC-infections.

As APEC share not only identical serotypes with human pathogens but also specific virulence factors, their zoonotic potential is under consideration.

One of the main goal of the project was to determine critical points of introduction of *E. coli*, including ESBL producing *E. coli*, in poultry flocks in order to reduce production loses, antibiotic treatment and to increase animal welfare. In addition, factors associated with the *E. coli* infection and the clinical outcomes of infection in all categories of poultry were evaluated.

The longitudinal study on the presence and distribution of *E. coli* and extended-spectrum and AmpC β -lactamase (ESBL/AmpC) producing *E. coli* was performed in three broiler breeder flocks, four broiler flocks, originating from investigated breeders, and four meat-type turkey flocks. The management procedures were similar within broiler flocks, as well as within meat-type turkey flocks. In breeders different concepts of prevention on coccidiosis and *E. coli* were compared. Two flocks were vaccinated against coccidiosis, one received coccidiostats in feed. Regarding *E. coli*, live attenuated and inactivated vaccines were used in one flock. Each breeder flock was tested five times during the observation period of 36 weeks, broiler flocks were tested three times and meat-type turkey flocks six times within one fattening period. In total 349 samples originating from the animals and from their environment were collected and cultured for *E. coli* and selectively for ESBL/AmpC producing isolates. In all flocks' health status, mortality rate and production parameters were compared. In the field investigation two commercial layer flocks were included. In both flocks higher mortality and reduced egg production due to colibacillosis were observed.

During the whole observation period no clinical outbreaks related to colibacillosis were observed in any of investigated meat type flocks, although *E. coli* was isolated from more than 90% of samples taken from dead or culled birds or from environmental samples. Birds from all flocks were negative to mycoplasmas and no field infections with immunosuppressive viruses were detected. The investigation of colibacillosis outbreaks in commercial layers clearly showed the importance of other pathogens on clinical outcome of *E. coli* infection. In both flocks concomitant infection with *E. coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae* were confirmed and infestation with *Dermanyssus gallinae* was detected.

No positive effect of vaccination against *E. coli* was observed in breeders during the rearing period. In the end of the production period comparable results were achieved in all breeder flocks. In both broiler flocks originated from vaccinated breeders lower mortality was detected within the first week, which could be related to vaccination or to good management procedure in hatchery. However, for the proper evaluation of impact of vaccination against *E. coli* more trials should be performed.

Before this study, no data on prevalence of ESBL or AmpC producing *E. coli* in poultry farms were available in Slovenia. It was proven that ESBL and AmpC strains could be transferred via vertical and horizontal routes. Contamination of barns, due to insufficient cleaning and disinfection, could be one of major causes of the high incidence of ESBL/AmpC isolates. In our study no ESBL/AmpC producing *E. coli* were detected in samples taken from the walls, equipment and farm floors before chicks' arrival. In addition, all samples of feed, bedding material and water tested negative. Although all environmental samples taken before placement of birds in the farms were negative for ESBL and AmpC producing *E. coli*, during the observation period levels of ESBL/AmpC producing *E. coli* increased in all three production types of poultry. ESBL/AmpC producing isolates were confirmed in all the broiler breeder flocks. Among those in the commercial fattening farms, ESBL/AmpC isolates were detected within the first week in 37.5% of tested flocks, before slaughter the prevalence increased to 62.5%. No significant differences were observed in detection rate of such strains in faeces, air or organs of dead birds. ESBL producing *E. coli* found in the air (17.40%) and faecal (23.18%) samples indicate a risk for people who work on the farms. The results also suggest that intake of antibiotics are a less important factor than vertical transmission or horizontal contamination.

It has been shown that APEC strains as other pathogenic *E. coli* employ a diverse set of virulence factors, including adhesins, protectins, iron uptake or transport systems, capsules, elements involved in evasion of the immune response, toxins, and invasins. To identify virulence factors characteristic for the studied avian *E. coli* we compared outbreak strains isolated from diseased chickens with nonoutbreak strains by determining their profile of virulence associated genes (VAGs). Each isolate was screened for the presence of 19 different VAGs. The results were analyzed by multiple correspondence analysis and six genes were identified as being most significantly associated with pathogenic APEC strains, namely: *ompT*, *iss*, *traT*, *iroN*, *iucD* and *iut*.

Within the project a loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for fast detection of three avian pathogenic *E. coli* virulence genes (*ompT*, *traT*, *sitA*) was developed. The method was first evaluated for analytical and diagnostic specificity, selectivity and repeatability. Applicability and performance of the method was tested on sets of samples from two different locations where disease symptoms typical of APEC occurred. Different types of samples of various tissues of the dead animals' internal organs, environmental samples, and live animals' swabs were tested. A simple procedure of cell lysis which is feasible to be done on the field was used for sample preparation. We were able to detect virulence genes in samples isolated from dead animals in less than 30 minutes with the LAMP method. Selected genes were detected also in samples of swabs of live animals, and environmental samples, but to a lesser extent. Method LAMP has proven to be fast and reliable for detection of the selected genes in the field.

Uvod

Escherichia coli (*E. coli*) je ena najpogostejših bakterij, ki jih najdemo v intestinalnem traktu tako živali kot ljudi. Večina *E. coli* je komenzalov, nekatere med njimi pa so patogene in povzročajo huda obolenja. Patogene *E. coli* v grobem delimo na tiste, ki povzročajo črevesna obolenja (IPEC, angl. intestinal pathogenic *E. coli*) in tiste, ki povzročajo zunajčrevesne okužbe (angl. extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC). Pri sesalcih okužbe z enterotoksičnimi, enteropatogenimi ali enterohemoragičnimi patotipi *E. coli* v največji meri povzročajo črevesna obolenja. Okužbe s sevi ExPEC pri ljudeh pogosto povzročajo okužbe sečil in tudi težje ali celo smrtonosne okužbe (bakteriemije, meningitis). Pri živalih, zlasti perutnini, je potek obolenja težji in velikokrat povzroča obsežne pogine. Kljub temu, da je težko z gotovostjo izslediti izvor ExPEC, ki povzročajo obolenja pri ljudeh, obstaja velika verjetnost njihovega prenosa iz živali oz. kontaminiranega okolja.

Perutninsko meso je v svetovnem merilu eden od pomembnejših virov beljakovin živalskega izvora. Genetska selekcija perutnine omogoča pridobitev visoko kakovostnega vira prehrane za ljudi, vendar se živali v intenzivni reji soočajo s številnimi stresnimi dejavniki, ki privedejo do večje občutljivosti za povzročitelje različnih obolenj. Eno izmed najpogostejših in tudi ekonomsko najpomembnejših je kolibaciloza. Okužbe z aviarnimi patogenimi *E. coli* (APEC), ki sodijo med ExPEC, so v intenzivnih rejah perutnine zelo pogoste. Poti okužbe še niso popolnoma jasne, perutnina pa se lahko okuži tako po horizontalni kot tudi po vertikalni poti. Odvisno od patogenosti seva, občutljivosti gostitelja in negativnih faktorjev okolja se okužba lahko kaže kot septikemija z visokim poginom ali pa kot lokalizirana vnetja seroznih open, organov in tkiv. Kolibaciloze povzročijo tudi do 20% pogin, posredne škode pa je, zaradi velike uporabe kemoterapevtikov in pogostih zaplemb trupov ob zakolu, še več. V redni diagnostiki *E. coli* pri perutnini se uporabljajo standardizirane mikrobiološke metode izolacije, vendar z njimi ne ločujemo za perutnino patogenih (APEC) od komenzalnih *E. coli*. Ta diagnostični postopek traja najmanj 48 ur, ob tem pa ne vemo zagotovo, ali gre za izolate, ki so za perutnino primarno patogeni ali za komenzalne seve. Zato se je pojavila potreba po hitri diagnostični metodi za karakterizacijo izolatov, ki bi nudila možnost hitrega in učinkovitega ukrepanja ob pojavljanju potencialno patogenih sevov v reji. V ES in seveda tudi v naši državi, je uporaba protimikrobnih zdravil omejena. V večini primerov se uporabljajo usmerjeno; na podlagi kliničnih obolenj in ob potrditvi patogenov. Rezultati testiranja bakterij, izoliranih pri živalih v zadnjih letih, kažejo na povečano odpornost pri številnih bakterijskih vrstah. Pojavlja se odpornost proti različnim skupinam antibiotikov, poleg odpornosti proti betalaktamom je še posebej zaskrbljujoča odpornost proti kinolonom, ki se v veterinarski medicini pogosto uporabljajo, predvsem za zdravljenje okužb s po Gramu negativnimi bakterijami, med katere sodi tudi *E. coli*. Zaradi omejenega izbora protimikrobnih zdravil za uporabo pri perutnini in naraščajoče odpornosti *E. coli* je izbor učinkovin čedalje bolj omejen. V preventivi okužb z *E. coli* je mogoče uporabljati tudi cepiva. V evropskem prostoru so registrirana tako inaktivirana kot tudi živa atenuirana cepiva proti *E. coli*, mnenja o njihovi učinkovitosti so v strokovnem slovstvu deljena. Določena zdravila kot npr. kokcidiostatiki se še vedno množično uporabljajo v preventivi kokcidioze v rejah perutnine. Kakšna je njihova vloga pri pojavu in širjenju *E. coli* z ESBL, je slabo raziskano.

Sevi *E. coli* se pogosto zadržujejo v perutninskih objektih in okolju. Ob tem ne gre zanemariti potencialne možnosti neposrednih okužb ljudi. Kljub temu, da sevi pri živalih praviloma niso identični sevom pri ljudeh, pa se lahko geni, povezani z odpornostjo, sevov *E. coli* z ESBL, ki so prisotni pri perutnini, prenesejo v komenzalne seve *E. coli* pri ljudeh, ki posledično postanejo odporni. V Republiki Sloveniji nismo razpolagali s podatki, kakšna je pojavnost in v katerem obdobju reje pride do vnosa patogenih *E. coli* v jate perutnine. Še manj je podatkov o tem, v kolikšni meri gre za vnos sevov *E. coli*, z genskimi zapisi za rezistenco proti betalaktamom z razširjenim spektrom delovanja (*E. coli* z ESBL/AmpC). Glavni cilj projekta je bil ugotoviti, kakšna je pojavnost in katere so kritične

točke vnosa *E. coli*, s posebnim poudarkom na *E. coli* z ESBL, v reje perutnine. Z usmerjenimi raziskavami smo želeli določiti dejavnike, ki vplivajo na pojav kolibaciloze pri perutnini in preučiti vpliv preventivnega cepljenja proti tej bolezni na znižanje uporabe protimikrobnih zdravil in višjo proizvodnost živali. Hkrati smo želeli preveriti tudi morebitni vpliv kokcidiostatikov in protimikrobnih terapij na pojavnost odpornih sevov *E.coli* v rejah. Eden od pomembnih ciljev raziskave je bil uvesti nove diagnostične metode za dokazovanje *E.coli* in določiti molekularne karakteristike izolatov, ki se pojavljajo v okolju perutnine in tistih, ki jih potrdimo ob izbruhih kolibaciloze. Na osnovi teh podatkov smo želeli razviti molekularno diagnostično metodo LAMP, ki bi bila uporabna tudi na terenu. Cilji projekta so sledili tudi Akcijskemu načrtu Evropske Komisije proti naraščajoči nevarnosti protimikrobne odpornosti.

Materiali in metode dela

A. Viri okužb z *E. coli* in *E. coli* z AmpC/ESBL v rejah perutnine, vpliv uporabe protimikrobnih učinkovin na pojavljanje rezistentnih sevov *E. coli* ter vpliv drugih dejavnikov na pojav kolibaciloze pri perutnini

Živali

V ta del raziskave smo vključili tri matične jate težkih hibridov, štiri jate piščancev brojlerjev in štiri jate pitovnih puranov. Preiskave smo opravili tudi v dveh rejah konzumnih nesnic z značilnimi znaki kolibaciloze.

- Matične jate težkih hibridov

Matične jate pasemskega tipa Ross 308 so bile vzrejane pri treh različnih proizvajalcih. Velikost jat je bila med 19.143 do 29.040 živali. Vse jate so bile v Slovenijo uvožene iz tujine. Sistemi reje in preventivnega cepljenja proti virusnim povzročiteljem in salmonelam so bili v vseh jatah primerljivi, z izjemo preventivnega cepljenja proti *E. coli* in programa preprečevanja kokcidioze (Tabela 1).

Tabela 1: Opis preventivnih programov proti *E.coli* in kokcidiozi ter spremljani parametri pri matičnih jatah težkih hibridov

Jata	Število živali	Aktivna zaščita proti <i>E. coli</i>	Preventivni program kokcidioze	Program vzorčenja in spremljani proizvodni parametri
A	25.700 jarčk in 3340 petelinčkov	- živo atenuirano cepivo proti <i>E. coli</i> , DSP, razprševanje - inaktivirano cepivo proti <i>E. coli</i> , 9 in 19 teden, i/m	živo atenuirano cepivo, 1 teden, p/o	Patološke preiskave in bakteriološke preiskave: pred vselitvijo ter 4, 12, 24 in 36 teden starosti
B	17264 jarčk in 3210 petelinčkov	ne	živo atenuirano cepivo, 1 teden, p/o	Serološke preiskave: 12 in 24 teden starosti
C	16.120 jarčk 3032 petelinčkov	inaktivirano cepivo proti <i>E. coli</i> , 12 in 18 teden, i/m	kokcidiostatik od prvega dne do 14 tedna, p/o	Spremljani parametri: pogin, zdravljenja, nesnost (število jajc/kokoš, število valilnih jajc/prevedeno kokoš, valilnost)

- Piščanci brojlerji

Spremljali smo 4 jate piščancev brojlerjev. Dve jati (jata A1 in A2) sta izvirali iz matične jate A, dve (B1 in B2) pa iz matične jate B. Piščanci so bili vhlavljeni na različnih farmah. Čas pitanja je bil od 36 do 42 dneva starosti. Piščanci so bili cepljeni po standardnem programu proti atipični kokošji kugi, bolezni Gumboro in kužnemu bronhitisu. Podatki o rejah ter programu vzorčenj in spremljanih parametrih so prikazani v tabeli 2.

- Pitovni purani

Vključene so bile 4 jate pitovnih puranov (D, E, F in G). Purani so bili vseljeni na farmah različnih lokacij in so bili v Slovenijo vnešeni kot dan stari purančki. Pogoji reje in programi preventivnih cepljenj so bili med jatami primerljivi. Sistem vzorčenj in podatke o rejah prikazuje tabela 2.

Tabela 2: Podatki o jatah pitovne perutnine (piščanci brojlerji, pitovni purani) in sistem vzorčenja

Jata	Število živali v reji	Vzorčenje in spremljani proizvodni parametri
A1	11.500	Patološke preiskave in bakteriološke preiskave: pred vselitvijo ter 1 in 5 teden starosti, po zakolu (bakteriološke preiskave)
A2	10.700	
B1	14.400	Serološke preiskave: 5 teden
B2	7.000	Spremljani parametri: klinična slika, pogin, zdravljenja, proizvodni indeks
D	4.100	Patološke preiskave in bakteriološke preiskave: pred vselitvijo ter 1, 5, 9 in 16 teden
E	3.900	
F	15.500	Serološke preiskave: 9 teden
G	15.800	Spremljani parametri: klinična slika, pogin, zdravljenja, dosežena masa živali

Vzorčenja

Pred vhlavitvijo živali smo iz vsake jate odvzeli okoljske vzorce in vzorce živali poginjenih v času transporta. Pred vselitvijo v objekte smo odvzeli najmanj 10 brisov površin objekt, vzorce krme, vode in stelje. Poginjene živali smo preiskali s patomorfološko preiskavo in sterilno odvzeli organe za usmerjene bakteriološke preiskave na *E. coli* in *E. coli* z AmpC/ESBL. Istočasno smo vzorčili tudi iztrebke iz transportnih škatelj. Poginjene ali izločene živali iz jat perutnine v navedenih časovnih terminih smo patološko preiskali in odvzeli organe za bakteriološke preiskave. Istočasno smo vzorčili tudi iztrebke z uporabo opojnih obuval. V jatah pitovnih živali smo ob vsakem vzorčenju uporabili po dva para obuval, v matičnih jatah pa 5 parov opojnih obuval.

Za vzorčenje zraka smo uporabili zbiralnik zraka Coriolis Delta air sampler. Vzorce zraka smo odvzeli v jatah puranov v starosti 1 in 9 tednov, matične jate smo vzorčili 4 in 12 teden, jate piščancev pa 1 in 5 teden starosti.

V dveh rejah piščancev brojlerjev smo ob zakolu odvzeli vzorce kožic 10 trupov in jih preiskali na prisotnost *E. coli* z ESBL. Hkrati smo pred in po zakolu odvzeli vzorce vode.

Za serološka testiranja smo živalim iz posamezne jate odvzeli ob vsakem vzorčenju najmanj 20 vzorcev krvi; krvne vzorce smo jemali iz krilne vene.

Izolacija E. coli

Bakterije *E. coli* smo izolirali na neselektivnih in selektivnih gojiščih, odvisno od vrste vzorca. Okoljske vzorce smo preiskali na tekočih in trdnih selektivnih gojiščih. Kulturo smo z bakteriološko zanko prenesli na trdno selektivno in diferencialno gojišče za diagnostiko odpornih bakterij. Kolonije, ki so morfološko ustrezale *E. coli* (rdeče, ploščate kolonije) smo precepili na sveža gojišča za čisto kulturo in jih identificirali do vrste. Vzorce organov smo preiskali na osnovnih gojiščih za diagnostiko enterobakterij po protokolu za splošno bakteriološko preiskavo in jih na podlagi biokemijskih testov identificirali do vrste.

Fenotipsko in genotipsko ugotavljanje prisotnosti ESBL/AmpC E. coli

Prisotnost ESBL/AmpC *E. coli* smo določili fenotipsko na osnovi testiranja občutljivosti za indikatorske antibiotike. Testiranje smo opravili z disk difuzijsko metodo in mikrodilucijsko metodo za ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika, v skladu s priporočili standardov CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) in EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Izolate smo testirali na komercialno pripravljenih mikrotiterskih ploščah za enterobakterije (EUMVS in EUSEC). Izolate, ki so bili odporni proti indikatorskim antibiotikom za ESBL in izolate, ki so zrastle na selektivnih gojiščih, smo dodatno testirali še na dodatni mikrotiterski plošči (EUSEC2). Na podlagi rezultatov EUSEC2 smo fenotipsko razlikovali izolate ESBL in AmpC.

Genotipsko smo prisotnost genov za ESBL in plazmidne AmpC dokazovali z reakcijo PCR in analizo velikosti, ter po potrebi nukleotidnega zaporedja, pomnožka. Za dokazovanje prisotnosti genov iz skupin TEM in SHV smo uporabili protokol Dallenne in sod. (2010). Za pripravo pomnožka za sekvenciranje navedenih skupin pa protokol Brinasa in sod. (2003). Gene *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9} in *bla*_{CTX-M-25} smo dokazovali po Woodfordu (2010). Za dokazovanje plazmidno zapisanih betalaktamaz AmpC (MOX, CIT, DHA, ACC, EBC in FOX) smo uporabili navodilo iz članka Perez-Pereza in Hansona (2002).

Določitev filogenetski skupin izolatov E. coli z ESBL/AmpC

Izolate *E. coli* z ESBL/AmpC smo uvrstili v eno izmed filogenetskih skupin z reakcijo multipleks-PCR po Clermont-u (Clermont in sod., 2000).

Druge laboratorijske preiskave

Vse serume smo preiskali na prisotnost specifičnih protiteles proti mikoplazmam - *Mycoplasma synoviae* (MS) in *M. gallisepticum* (MG) in APV; vzorce matičnih jat in piščancev brojlerjev pa še na prisotnost protiteles proti IBV in GBV. Za določitev protiteles proti MG in MS smo uporabili test hitre serumske aglutinacije (SAT MG, SAT MS), protitelesa proti APV, GBV in IBV smo določili s testom ELISA.

Poginjene živali smo patološko anatomsko preiskali. V primeru suma na druge patogene, smo opravili dodatne bakteriološke in molekularne analize.

Spremljani proizvodni parametri

Vse jate so bile pod stalno veterinarsko kontrolo, dnevno so bili beleženi pogini oz. število izločenih živali in protimikrobna zdravljenja. V rejah matičnih jat smo še posebej spremljali nesnost (število jajc/kokoš, število valilnih jajc/prevedeno kokoš) in valilnost. V vseh jatah pitovne perutnine smo spremljali uspešnost reje na osnovi skupnih izgub ob zakolu, konverzije krme in proizvodnega indeksa. V jatah piščancev brojlerjev smo se še posebej osredotočili na pogine v prvem tednu starosti.

B. Karakterizacija izolatov *E. coli*

Izolati E. coli

V analizo smo vključili 33 izolatov *E. coli*, ki so bili izolirani iz različnih rej perutnine s kliničnimi znaki kolibaciloze, in 76 izolatov, ki smo jih pridobili iz rej klinično zdrave perutnine. Patogeni izolati (APEC) so izvirali iz organov piščancev in puranov različne starosti z značilnimi patomorfološkimi spremembami kolibaciloz (omfalitis, fibrinozno vnetje seroznih open, ooforitis, oviduktitis, fibrinozne pljučnice...).

Ugotavljanje prisotnosti genov za virulentne dejavnike z metodo PCR

Vse isolate smo preiskali na prisotnost 19 genov, ki so potencialno povezani s patogenostjo *E. coli* (VAGs): Določili smo gene iz skupin adhezinov (*fimH*, *papC*, *papGII*, *iha*), toksinov (*hlyA*, *vat*, *tsh*, *astA*), mikrocina (*cvi*), gen odgovoren za sintezo kapsule (*kpsMTII*) in gene, katerih produkti omogočajo učinkovit prevzem železa (*fyuA*, *irp2*, *iroN*, *sitA*, *iucD*, *iutA*) in zogibanje imunskemu sistemu gostitelja in odpornost proti serumu (*iss*, *traT*) ter proteazovanje membrane OmpT (*ompT_{APEC}*). Prisotnost genskih zapisov smo preverili z metodo PCR, kot je bilo opisano za posamezne VAG v različnih objavah.

Določanje patogenosti izolatov E. coli na kokošnjih embrijih

Osmim izbranim izolatom *E. coli*, ki so bili izolirani iz organov perutnine z različnim profilom virulencnih genov smo določili patogenost na SPF kokošnjih embrijih. V testiranje smo vključili tudi cepni sev *E. coli* in izolat *E. coli*, ki je bil izoliran pri antilopi. Test smo izvedli po metodi, ki jo je opisal Nolan (1992).

C. Razvoj in uvedbo hitre diagnostike *E. coli* z metodo LAMP v laboratorijskih in terenskih pogojih

Razvoj metode LAMP

Za določanje APEC smo izbrali reprezentativne gene, ki so se izkazali kot pomembni pri patogenosti *E. coli*. Za izbrane gene smo razvili različne LAMP-teste, kjer smo oblikovali več setov specifičnih oligonukleotidnih začetnikov in preverili njihovo delovanje. Izbrali smo set, ki je imel najboljše lastnosti glede časa, potrebnega za pozitivno reakcijo, specifičnosti in občutljivosti. V naslednjem koraku smo izbrani set začetnikov preverili na več izolatih *E. coli* različne patogenosti in na izolatih drugih bakterijskih patogenov. Tako smo vrednotili specifičnost metode LAMP. Določili smo tudi občutljivost metode. Rezultate LAMP testa smo primerjali z rezultati, pridobljenimi s klasičnim PCR in testi na kokošnjih embrijih. Dalje smo preverili delovanje LAMP -testov na različnih matriksih; notranji organi in okoljski vzorci (stelja, krma, feces, zrak).

Uporaba metode LAMP v praksi

Uporabnost metode LAMP za diagnostiko APEC smo preizkusili terenskih pogojih v dveh rejah konzumnih nesnic s kliničnimi in patomorfološkimi znaki značilnimi za kolibacilozo. Podatki o jatah in vzorčenju so prikazani v tabeli 3.

Tabela 3: Podatki o rejah vključenih v testiranje LAMP na terenu

Oznaka jate/ tip perutnine/starost	Klinični znaki, pogin	Patomorfološki spremembe
1/ konzumne nesnice, 49. tednov	Višji pogin (0,27% na teden), slabša nesnost	Fibrinozni ooforitis, peritonitis, aerosakulitis in fibrinozna pleuropneumonia
2/ konzumne nesnice, 45 tednov	Višji pogin (0,6% na teden), slabša nesnost	Fibrinozni ooforitis, peritonitis, aerosakulitis, fibrinozni celulitis

Testi LAMP so bili izvedeni kot opisano (Kogovšek in sod., 2015) z manjšimi spremembami. Volumen reakcije je bil 10 µl, kjer je bilo 4 µl vzorca. Vzorce smo pripravili v PEG pufru (pH 13.3) in inkubirali 10 min na sobni temperaturi. Vzorce smo 10x redčili v TE pufru in 4 µl vzorca dodali reakcijski mešanici. Analize so potekale na napravi GenieII (Optigene), kadar smo analize opravili na terenu, in Roche LC480. Fluorescenco smo merili v realnem času in po zaključenem pomnoževanju, ki je potekalo 30 min, izpeljali še analizo talitvene temperature produkta (T_m).

Poleg testov z LAMP smo v obeh rejah opravili tudi bakteriološke preiskave na prisotnost *E.coli*, molekularne preiskave na prisotnost drugih respiratornih patogenov perutnine in serološke preiskave na prisotnost specifičnih protiteles proti APV, IBV in GBV.

Statistične analize

Za potrebe raziskave smo zbirali ključne podatke in jih sistematično uredili v programu MS Excel, v obliki elektronskih preglednic. Za nadaljnje statistične analize in obdelave smo uporabili program SPSS 22.0, ko tudi R 3.0.2. Pri tem smo na podlagi značilnosti zbranih podatkov opravili univariatno in bivariatno statistično analizo. Pri univariatni analizi smo temeljili na deskriptivni statistiki, med tem ko smo, pri bivariatni analizi uporabili Fisherjev eksaktni test, hi-kvadrat test in z-test z Bonferonnijevo prilagoditvijo. Pri analizah smo kot statistično pomembne razlike opredelili tiste, katerih stopnja p je bila manjša od 0,05.

Glede na zastavljene prioritete raziskovalnega projekta smo statistično analizo izvedli v dveh delih. V prvem delu smo iskali odgovor na vprašanja:

(i) ali zdravljenje z protimikrobno terapijo in kokcidiostatikom vpliva na pojavnost ESBL in AmpC izolatov *E. coli*, ter

(ii) ali obstaja razlika med pojavljanostjo ESBL in AmpC *E.coli* v vzorcih različnih medijev (feces, organi, zrak).

Nadalje smo v drugem delu analizirali 19 genov, potencialno povezani s patogenostjo *E. coli* za perutnino, in določili najbolj značilne za okužbo z *E.coli* (APEC).

Rezultati

A. Viri okužb z *E. coli* in *E. coli* z AmpC/ESBL v rejah perutnine, vpliv uporabe protimikrobnih učinkovin na pojavljanje rezistentnih sevov *E. coli* ter vpliv drugih dejavnikov na pojav kolibaciloze

Spremljanje zdravstvenega stanja v rejah perutnine

Skozi ves čas terenskih študij je bilo zdravstveno stanje jat perutnine dobro. Matični jati A in C nista bili zdravljeni, terapija tudi ni bila potrebna v jatah piščancev brojlerjev in jatah pitovnih puranov. Matična jata B je prejela antibiotično terapijo konec prvega tedna in v 20 tednu starosti. Rezultati

seroloških preiskav so potrdili, da jate niso bile okužena z mikoplazmami, okužba z aviarnim pneumovirusom je bila posredno potrjena v matičnih jatah A in C ter v jatah puranov F in G.

Rezultati bakterioloških preiskav

V okoljskih vzorcih, ki smo jih odvzeli pred vhlevitvijo živali v perutninske hleve, *E. coli* z ESBL/AmpC nismo potrdili, čeprav smo *E. coli* izolirali iz brisov površin kot tudi iz vzorcev krme in stelje (Tabela 4). Bakteriološke analize so pokazale, da so bili objekti dobro pripravljene in razkuženi. Najvišji odstotek na *E. coli* pozitivnih vzorcev je bil potrjen v objektih rej piščancev brojlerjev (11,53%).

Tabela 4: Določitev *E. coli* v okoljskih vzorcih odvzetih pred vhlevitvijo živali v objekte

Vzorec	Število izolatov <i>E. coli</i> / Število vzorcev			
	Matične jate	Piščanci brojlerji	Pitovni purani	Skupaj (%)
Brisi površin	3/50	6/40	3/35	12/125 (9,60)
Krma	2/5	0/4	0/4	2/13 (15,38)
Stelja	1/5	0/4	0/4	1/13 (11,12)
Voda	0/5	0/4	0/3	0/12 (0,0)
Skupaj (%)	6/65 (9,23)	6/52 (11,53)	3/46 (6,52)	15/163 (9,20)

Matične jate

Čeprav iz organov in iztrebkov na transportu poginjenih piščancev nismo izolirali *E. coli* z ESBL, smo ob nadaljnjih testiranjih *E. coli* z ESBL potrdili v vseh matičnih jatah. V starosti 4 tednov so bili ti izolati potrjeni v dveh jatah; v jati A so bili pozitivni organi, opojne prevleke in vzorci zraka, v jati B pa smo *E. coli* z ESBL potrdili v vzorcih organov in opojnih prevlekah. V 12. tednu starosti so bile *E. coli* z ESBL potrjene tudi v vzorcih zraka jate C. V fazi nesnosti smo *E. coli* z ESBL potrdili v jatah A in B. *E. coli* z AmpC smo potrdili v organih transportnega pogina v jati A, ne pa v jatah B in C. Tekom naslednjih testiranj *E. coli* z AmpC v jati A nismo več potrdili, nasprotno pa smo te izolate potrdili v jatah B in C (Tabela 5).

V času spremljanja matičnih jat smo *E. coli* potrdili pri več kot 82% preiskanih vzorcev, ob tem pa klinično kolibaciloz nismo potrdili.

Tabela 5: Distribucija *E. coli* in *E. coli* z ESBL/AmpC v matičnih jatah

Vzorčenje		Jata A			Jata B			Jata C		
Čas odvzema	Tip vzorca	<i>E. coli</i> ⁴	ESBL ⁴	AmpC ⁴	<i>E. coli</i> ⁴	ESBL ⁴	AmpC ⁴	<i>E. coli</i> ⁴	ESBL ⁴	AmpC ⁴
Pred vhlevit.	Mekonij ¹	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2
	Organi ²	4/4	0/4	4/4	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2
4 teden	Zrak ³	3/3	3/3	0/3	2/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2
	Vp. prevleke ¹	2/2	2/2	0/3	2/2	1/2	1/2	2/2	0/2	0/2
	Organi ²	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	0/2	1/1	0/1	0/1
12 teden	Zrak ³	2/2	1/2	0/2	2/2	0/2	2/2	2/4	1/4	1/4
	Vp. prevleke ¹	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2
	Organi ²	2/2	2/2	0/2	2/2	1/2	0/2	2/2	0/2	1/2
24 teden	Vp. prevleke ¹	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2
	Organi ²	2/2	1/2	0/2	4/4	1/4	0/4	3/4	0/4	0/4
36 teden	Vp. prevleke ¹	2/2	0/2	0/2	2/2	1/2	0/2	3/3	0/3	1/3
	Organi ²	2/2	0/2	0/2	3/4	0/4	2/4	1/2	0/2	0/2
Skupaj		27/27	13/27 ^a	6/27 ^c	23/28	10/28 ^a	7/28 ^c	23/28	1/28 ^b	3/28 ^c

(%)		(100)	(48.1)	(22.2)	(82.1)	(35.7)	(25.0)	(82.1)	(3.57)	(10,7)
-----	--	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

¹ Pred vhlevitvijo; 5 oblog transportnih škatelj /vzorec. V času vzreje in nesnosti, 5 parov vpojnih prevlek/vzorec.

² 4 vzorci jeter/vzorec; v primeru, če smo ugotovili spremembe na drugih organih (srce, ovarij) so bili ti vzorci preiskani posamično.

³ 2 do 4 vzorci zraka /vzorec.

⁴ Število izolatov/št. vzorcev.

^{a,b} Različne črke opredeljujejo statistično značilno razliko v potrditvi *E.coli* z ESBL med jatami pri $p < 0.05$ z uporabo korekcije po Bonferroni testu

^c Črka opredeljuje jate, ki se med seboj statistično značilno ne razlikujejo deležu AmpC izolatov, $p < 0.05$, z uporabo korekcije po Bonferroni testu

Statistična analiza (hi- kvadrat) je pokazala, da pojavnost ESBL in AmpC izolatov ni povezana s protimikrobno terapijo niti z dodanimi kokcidiostatiki (ionoforni antibiotik). Relativni delež števila AmpC izolatov se med jatami ni razlikoval. Statistično značilni nižji delež ESBL-izolatov je bil potrjen v jati C, ki ni bila zdravljena in je v krmi prejela kokcidiostatik, v primerjavi z jatama A (jata ni bila zdravljena) in jato B (zdravljena jata). Med jatama A in B nismo potrdili statistično značilne razlike v pojavnosti ESBL-izolatov.

Piščanci brojlerji

V vzorcih odvzetih dan starim piščancem pred vhlevitvijo *E. coli* z AmpC/ESBL nismo potrdili. V prvem tednu starosti smo ESBL izolate potrdili v jati A1, v jati A2 pa *E. coli* z AmpC. Ti izolati so bili potrjeni v vzorcih organov, zraka in v vzorcih vpojnih prevlek. V petem tednu starosti smo *E. coli* z AmpC potrdili v vzorcih vpojnih prevlek v obeh jatah brojlerjev, ki sta izvirali iz jate B (Tabela 6).

Tabela 6: Potrditev *E. coli* z AmpC/ESBL v jatah brojlerjev

Čas vzorčenja	Vsi vzorci		A/1			A/2			B/1			B/2		
	ESBL ¹	AmpC ²	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1 teden	3/13	3/13	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ²	+ ²	+ ²	-	-	-	-	-	-
5 teden	3/12	3/12	+ ¹	+ ¹	+ ¹	-	+ ²	-	-	+ ²	-	-	+ ²	-

¹ ESBL *E.coli* pozitivni vzorci/ število vzorcev

² AmpC *E. coli* pozitivni vzorci/število vzorcev

Vir vzorcev:

a= zrak;

b= vpojne prevleke;

c= organi poginjenih ali žrtvovanih živali (jetra, srce).

+ Poz. ESBL ali AmpC *E. coli*; - neg. ESBL ali AmpC *E. coli*

Ob zakolu jat B1 in B2 smo opravili preiskave na prisotnost *E. coli* z ESBL; preiskali smo vzorce vode pred in po zakolu ter vzorce po 10 kožic piščancev po zakolu. *E. coli* z ESBL smo potrdili v vzorcih kožic iz obeh jat, voda pred in po zakolu pa je bila negativna.

Jate pitovnih puranov

Tudi v jatah pitovnih puranov v vzorcih, ki smo jih odvzeli živalim poginjenim v času transporta, AmpC/ESBL *E. coli* nismo potrdili. V času reje smo *E. coli* z ESBL potrdili v dveh jatah; v jati E smo te izolate potrdili le v vzorcu zraka v 9 tednu starosti, v jati G pa že ob prvem vzorčenju, v starosti 1 teden (Tabela 7). AmpC-izolatov tekom spremljanja teh jat nismo potrdili.

Tabela 7: Detekcija *E. coli* z ESBL v jatah pitovnih puranov

Čas vzorčenja	Vsi vzorci	D			E			F			G		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1 teden	3/17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
5 teden	2/12	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	+	+
9 teden	4/17	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
16 teden	4/15	/	-	-	/	-	-	/	-	-	/	+	+

¹ ESBL *E. coli* pozitivni vzorci/Število testiranih vzorcev

Tip vzorcev:

a= zrak;

b= vpojne prevleke;

c= organi

+ Poz. ESBL *E. coli*; - neg ESBL *E. coli*; / vzorec ni bil odvzet

Določitev filogenetski skupin izolatov *E. coli* z ESBL/AmpC

V tabeli 8 je prikazana razvrstitev 58 izolatov *E. coli* z ESBL/AmpC v filogenetske skupine.

Tabela 8: Določitev filogenetskih skupin izolatov *E. coli* z fenotipsko in genotipsko določenimi ESBL in AmpC

Filogenetska skupina	<i>E. coli</i> s fenotipsko/genotipsko določenimi ESBL	<i>E. coli</i> s fenotipsko/genotipsko določenimi AmpC	Skupaj (%) Fenotipsko/genotipsko določena beta- laktamaza
A0/1	23/ 22 ¹	8/4 ²	31 (53,4)/ 26 (44,8)
B1	11/16 ³	9/8 ⁴	20 (29,8)/ 24 (35,8)
D1/2	5/4 ⁵	10/10 ⁶	15 (22,3)/14 (20)
Skupaj	35	23	67 (100)

¹ Pri dveh fenotipsko pozitivnih izolatih tega nismo uspeli potrditi z genotipizacijo, smo pa potrdili *bla*_{CTX-M-1} pri izolatu, ki je bil opredeljen kot AmpC.

² Pri enem fenotipsko pozitivnemu izolatu AmpC nismo uspeli potrditi z genotipizacijo

³ pri treh izolatih, ki so bili fenotipsko opredeljeni kot AmpC so potrdili genske zapise za ESBL.

⁴ Pri dveh izolatih, ki sta bila opredeljena kot AmpC tega molekularno nismo potrdili, smo pa pomnožili genski zapis pri izolatu, ki je bil fenotipsko opredeljen kot ESBL.

⁵ Pri enem fenotipskemu ESBL izolatu nismo potrdili iskanih genov.

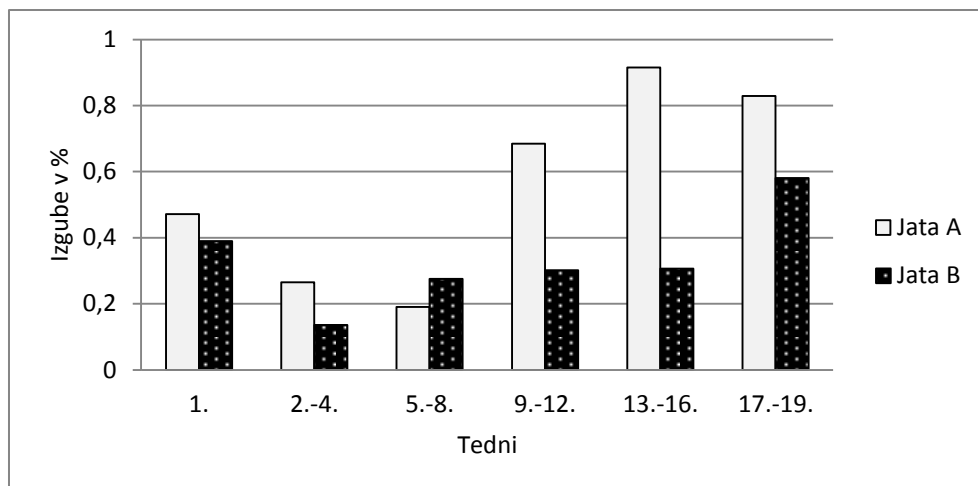
⁶ Pri vseh fenotipsko opredeljenih izolatih smo potrdili prisotnost ustreznih genskih zapisov.

Doseženi proizvodni parametri

Matične jate

Vpliv preventivnega cepljenja na izgube v času vzreje smo podrobneje analizirali v jati A, ki je bila cepljena z živim antenuiranim cepivom in revakcinirana z inaktiviranim cepivom v primerjavi z jato B, ki ni bila cepljena proti *E. coli*, obe jati sta bili cepljeni proti kokcidiози.

Gibanje pogina oz. skupnih izgub primerjanih jat v času vzreje prikazujemo v grafikonu 1.



Grafikon 1: Izgube (pogin in izločene živali) matičnih jat v času vzreje

Kot je razvidno iz grafikona 1, so bile izgube v fazi vzreje višje v jati, ki je bila cepljena proti *E.coli* z živimi in inaktiviranimi cepivi (jata A).

V tabeli 9 so prikazani proizvodni parametri matičnih jat v času nesnosti, primerjali smo število jajc na prevedeno kokoš, število valilnih jajc na prevedeno kokoš in odstotek izvalitve.

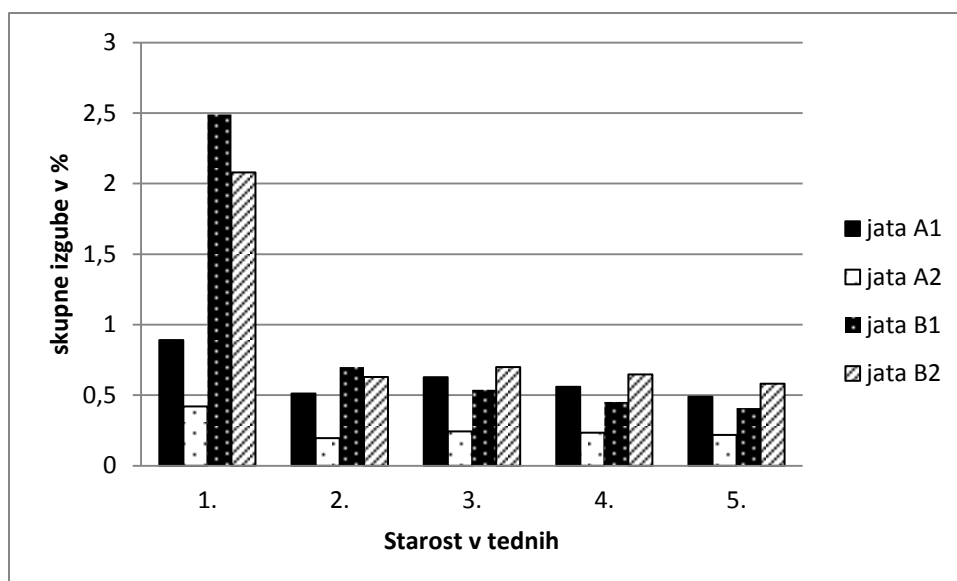
Tabela 9: Proizvodni parametri doseženi v času nesnosti matičnih jat

Parameter	Jata A	Jata B	Jata C
Št. jajc/prevedeno kokoš	174,04	177,1	186,5
Št. valilnih jajc /prevedeno kokoš	163,98	170,4	142,2
Odstotek izvalitve	84,52	80,87	77,88

Proizvodni rezultati so bili v vseh matičnih jatah dobri. Najvišje število valilnih jajc na prevedeno kokoš je dosegla jata B, ki ni bila cepljena proti *E. coli*, najvišji odstotek izvalitve pa je bil dosežen v jati A, ki je bila cepljena proti *E. coli* z živim in inaktiviranim cepivom.

Piščanci brojlerji

Gibanje pogina v tedenskih intervalih v primerjanih jatah je prikazano v grafikonu 2, dosežene proizvodne parametre prikazuje tabela 10.



Grafikon 2: Primerjava tedenskih izgub v jatah piščancev brojlerjev.

V prvem tednu starosti je bil višji pogin ugotovljen v obeh jatah brojlerjev (B1 in B2), ki sta izvirali iz matične jate, ki ni bila cepljena proti *E. coli*. V nadaljnjih tednih pitanja se pogin med jatami ni več razlikoval. Proizvodni parametri v jatah so bili primerljivi, čeprav je bil PI višji v jatah A1 in A2.

Tabela 10: Doseženi proizvodni rezultati v jatah brojlerjev

Jate piščancev brojlerjev				
Parameter	A1	A2	B2	B1
Izgube od 1- 7 dne (%)	0,89	0,42	2,08	2,49
Skupne izgube ob zakolu %	3,40	2,80	4,07	3,82
Št. dni pitanja	35,05	39,57	38,20	37,54
Masa v kg	1,88	2,15	2,04	1,93
Konverzija	1,759	1,809	1,882	1,768
PI	295	292	282	281

Pitovni purani

V tabeli 11 so proizvodni parametri doseženi v jatah pitovnih puranov, ki so bili v vseh jatah dobri in primerljivi.

Tabela 11: Doseženi proizvodni rezultati v jatah puranov

Jate pitovnih puranov				
Parameter	D	E	F	G
Št. vseljenih	4100	3900	15.800	15.500
Skupne izgube ob zakolu v %	5,10	7,28	7,38	7,76
Masa v kg	13,72	14,72	14,25	13,70
Konverzija	2,65	2,55	2,67	2,62

B. KARAKTERIZACIJA IZOLATOV *E. coli*

Izolate *E. coli* smo preiskali na prisotnost 19 genov potencialno povezanih s patogenostjo te bakterije za perutnino. Primerjava prisotnosti genov v izolatih, ki so izvirali iz rej perutnine z izraženimi kliničnimi znaki in patomorfološkim spremembami značilnimi za okužbe z *E. coli* (APEC) in tistimi, ki so izvirali iz zdravih rej perutnine je pokazala, da se statistično značilno razlikujejo v prisotnosti genov *ompT*_{APEC}, *iss*, *traT*, *iroN*, *iucD* in *iutA* (Tabela 12).

Tabela 12: Primerjava izražanja genov v potencialno patogenih izolatih *E. coli* in izolatih pridobljenih iz klinično zdravih rej perutnine

Geni	Potencialno patogeni izolati <i>E. coli</i> (APEC)	Drugi izolati <i>E. coli</i>	p-value
<i>kps</i>	6	11	0,78
<i>fimH</i>	33	68	0,31
<i>papC</i>	2	2	0,58
<i>papGII</i>	2	1	0,21
<i>hra</i>	3	15	0,26
<i>iha</i>	0	7	0,19
<i>ompT</i> _{APEC} *	32	44	0,000
<i>iss</i> *	25	35	0,018
<i>traT</i> *	32	50	0,002
<i>fyuA</i>	15	19	0,073
<i>irp2</i>	14	19	0,120
<i>iroN</i> *	27	40	0,005
<i>sitA</i>	27	53	0,109
<i>iucD</i> *	21	29	0,009
<i>iutA</i> *	22	32	0,057
<i>vat</i>	7	7	0,131
<i>tsh</i>	10	10	0,115
<i>astA</i>	4	15	0,3
<i>cvi</i>	13	19	0,1093

* geni, ki se statistično značilno razlikujejo med skupinama (Fishert's Exact test, $p < 0,05$)

Patogenost izolatov *E. coli* za kokošje zarodke

Patogenost izbranih izolatov *E. coli* smo preverili na SPF kokošjih zarodkih (Tabela 13)

Tabela 13: **Rezultati patogenosti izbranih izolatov za SPF kokoške zarodke**

Opis izolata <i>E.coli</i>	Prisotnost izbranih VAG							Št.zam./št.inok. embrijev (%)
	<i>ompT</i> _{APEC}	<i>iss</i>	<i>traT</i>	<i>iroN</i>	<i>iucD</i>	<i>iutA</i>	<i>sitA</i>	
Živo ateniurano cepivo proti <i>E.coli</i>	-	-	+	-	-	-	-	24/40 (60%)
10278/jetra/izločena žival	-	-	-	-	-	+	+	2/20 (10%)
7228/srce/ brojler/kolisepsa	+	+	+	+	+	+	+	12/20 (60%)
8805/srce/kolisepsa	+	+	+	+	+	+	+	10/20 (50%)
7780/jetra/ izločena žival	+	+	+	+	+	+	+	12/20 (60%)
6166/jetra/kolisepsa	+	+	+	+	+	+	+	9/20 (45%)
10303/ jetra/izločena žival	-	-	-	-	-	+	+	18/20 (90%)
XC2-251 jetra/ kolisepsa	+	+	+	+	+	+	+	19/20 (95%)
<i>E.coli</i> /antilopa	+	nd	+	nd	nd	nd	+	6/20 (30%)

C. Razvoj in uvedbo hitre diagnostike *E. coli* z metodo LAMP v laboratorijskih in terenskih pogojih

Razvoj metode LAMP

Za razvoj testov LAMP smo najprej statistično obdelali rezultate molekularnih analiz in pregledali in analizirali podobne že objavljene študije na perutnini. Na osnovi rezultatov smo izbrali tri tarčne gene: *ompT*_{APEC}, *traT* in *sitA*. Za določanje teh genov smo oblikovali specifične oligonukleotidne začetnike za LAMP-teste. Delovanje in specifičnost testov LAMP smo potrdili na izboru več izolatov, v katerih je bil izbran gen potrjen z predhodno molekularno analizo (PCR). Specifičnost testov LAMP smo ovrednotili tudi s testiranjem izolatov *E. coli*, v katerih nismo pričakovali teh genov, izoliranih iz perutnine in drugih živali (Tabela 14) ter izolate salmonel. V nobenem primeru nismo dobili nespecifične reakcije.

Tabela 14: Detekcija izbrnih genov z metodo LAMP v izolatih *E. coli*

Izolat/vzorec	<i>sitA</i> (št.poz./št.preiskanih)	<i>traT</i> (št.poz./št.preiskanih)	<i>ompT</i> _{APEC} (št.poz./št.preiskanih)
Okoljski vzorci/ perutnina	6/8	7/8	8/8
Organi /perutnina	19/21	20/21	20/21
<i>E.coli</i> /govedo	+	+	-
<i>E.coli</i> - antilopa	+	+	+
<i>E.coli</i> - tele	-	-	-
<i>E.coli</i> - prašič	-	-	-
<i>E.coli</i> - konj	-	+	-
<i>E.coli</i> - muflon	+	+	+
<i>E.coli</i> - prašič	+	+	-
<i>E.coli</i> - prašič	+	+	-
<i>E.coli</i> - prašič	-	+	-

Delovanje LAMP-testov smo preverili tudi na grobih homogenatih tkiv perutnine (jetra, srce). Najprej smo testirali različne pufre za pripravo samega homogenata in izbrali takega, ki ne inhibira reakcije LAMP in obenem omogoča sproščanje DNA iz bakterij, ki so v/na tkivu. Optimizirali smo tudi postopek priprave homogenata.

Testiranje metode LAMP v terenskih pogojih

V dveh jatah konzumnih nesnic s kliničnimi in patomorfološkimi znaki kolibaciloze smo izvedli LAMP-test na terenu ter v laboratorijskih pogojih (Tabela 15).

Tabela 15 : Rezultati LAMP-testov v rejah konzumnih nesnic

Jata 1	Žival	Vzorec	Rezultat LAMP testov			Jata 2	Žival	Vzorec	Rezultat LAMP testov		
			<i>sitA</i>	<i>traT</i>	<i>ompT</i>				<i>sitA</i>	<i>traT</i>	<i>ompT</i>
Žive živali	1	Bris kloake	neg	poz	neg		1	Bris kloake	poz	poz	poz
		Bris sapnika	poz	sum	poz			Bris sapnika	poz	neg	sum
	2	Bris kloake	neg	poz	neg		2	Bris kloake	poz	poz	neg
		Bris sapnika	poz	poz	poz			Bris sapnika	neg	neg	neg
	3	Bris kloake	neg	poz	neg		3	Bris kloake	poz	poz	poz
		Bris sapnika	neg	neg	neg			Bris sapnika	sum	sum	sum
	4	Bris kloake	neg	neg	neg		4	Bris kloake	neg	sum	neg
		Bris sapnika	poz	poz	poz			Bris sapnika	neg	neg	neg

	5	Bris kloake	poz	poz	neg	Žive živali	5	Bris kloake	poz	poz	neg		
		Bris sapnika	poz	poz	poz				Bris sapnika	neg	neg	neg	
Poginjene živali	1	Jetra	poz	poz	poz	Poginjene živali	1	Jetra	poz	poz	poz		
		Bris kloake	poz	poz	poz			Srce	poz	poz	poz		
		Bris sapnika	poz	poz	poz			Potrebušnica	poz	poz	poz		
		Zračne vrečke	poz	poz	poz			Bris sapnika	poz	poz	poz		
		Srce	poz	poz	poz			Bris kloake	poz	poz	poz		
	2	Jetra	poz	poz	poz		2	Jetra	poz	poz	poz		
		Bris kloake	poz	poz	poz			Jajčnik	poz	poz	poz		
		Bris sapnika	poz	poz	poz			Bris kloake	poz	poz	poz		
		Jajcevod	poz	poz	poz			Bris sapnika	poz	poz	poz		
	3	Jetra	poz	poz	poz		3	Jajcevod	poz	poz	poz		
		Bris kloake	poz	poz	poz			Jetra	poz	poz	poz		
		Bris sapnika	poz	poz	poz			Zračne vrečke	poz	poz	poz		
		Jajcevod	poz	poz	poz			Bris kloake	poz	poz	poz		
	Okolje	Zrak 1A	poz	poz	sum		Okolje	Zrak	poz	poz	poz		
Zrak 2A		sum	neg	neg	Krma	neg		neg	neg				
Feces suh		poz	poz	neg	Feces	neg		neg	neg				
Feces svež		poz	poz	poz									
Krma		neg	neg	neg									

Analiza LAMP je bila izvedena na lokaciji sami in v manj kot 30 minutah smo dobili prve rezultate. Vsi vzorci so bili testirani tudi v laboratoriju, kjer smo uporabili visoko zmogljivo aparature za PCR v realnem času (Roche LC 480). Ker za pripravo vzorcev nismo uporabili postopka priprave DNA, le lizo celic s pufrom PEG, je bila analiza izvedena v do 60 minutah, večina priprave in analize vzorcev je bila zaključena v 30 minutah. Kljub temu, da smo analizirali različne tipe vzorcev, od brisov do krme in fecesa ter notranjih organov, smo v vseh naštetih matriksih lahko dokazali prisotnost bakterijske DNA. S tem smo potrdili neobčutljivost reakcije LAMP za inhibitorje, ki izvirajo iz različnih matriksov, in tako pokazali, da je metoda zelo uporabna za delo na terenu, kjer nimamo

možnosti za izvedbo postopka izolacije DNA. Metoda LAMP se je izkazala kot izredno hitra in zanesljiva za določanje izbranih virulenčnih genov *E.coli*.

V jatah konzumnih nesnic smo opravili tudi druge laboratorijske preiskave (raztelesba, bakteriološke, molekularne in serološke preiskave). Potrdili smo prisotnost *Mycoplasma synoviae* in *Ornithobacterium rhinotracheale*, ter *E. coli* z AmpC. Serološki rezultati na prisotnost protiteles proti aviarnemu pneumovirusu so bili negativni. Živali iz obeh rej so bile tudi močno infestirane s parazitom *Dermanyssus gallinae*.

Razprava in zaključki

Kolibaciloze predstavljajo enega najpogostejših zdravstvenih in ekonomskih problemov v rejah perutine. Najpogosteje povzročajo različne vnetne spremembe respiratornega in reprodukcijskega sistema, povezujemo jih tudi z vnetji podkožja in spremembah na lokomotornem sistemu. Pogosteje so kolibaciloze prisotne v rejah, kjer so slabi mikroklimatski pogoji, veliko *E. coli* v okolju, ali so posledica predhodnih okužb virusne pa tudi bakterijske etiologije.

Analize vzorcev, ki smo jih odvzeli pred vhlevitvijo, so pokazale, da so perutninski objekti dobro pripravljani in razkuženi. Od 163 vzorcev, ki smo jih odvzeli, je bila *E.coli* potrjena le v 15 primerih, v večini so bili to brisi opreme. V nobenem primeru nismo potrdili prisotnosti rezistentnih sevov *E. coli*. Izbrane reje matičnih jat težkih hibridov, jate piščancev brojlerjev in puranov, ki smo jih vključili v našo raziskavo, so bile skozi ves čas spremljanja v dobrem zdravstvenem stanju, kljub temu, da smo *E.coli* izolirali praktično iz vseh vzorcev (90,37%), ki smo jih odvzeli tekom reje; tako v organih poginjenih ali izločenih živali kot tudi v iztrebkih in zraku. Molekularna analiza prisotnosti virulenčnih genov iz teh rej v primerjavi z izolati pridobljenimi v rejah s kolibacilozo so pokazali, da so bili ti izolati najverjetneje manj patogeni.

Protimikrobno zdravljenje v izbranih jatah je bilo minimalno. Živali iz matične jate B so prejele antibiotično terapijo konec prvega tedna in v 20 tednu starosti po preselitvi. Matični jati A in C nista bili zdravljeni, terapija tudi ni bila potrebna v jatah piščancev brojlerjev in jatah pitovnih puranov. Rezultati seroloških preiskav so potrdili, da jate niso bile okužena z mikoplazmami in virusom kužnega bronhitisa, za katere je znano, da povečujejo dovzetnost za okužbe z *E. coli*, prav tako nismo potrdili prekužb z imunosupresivnimi virusi kot so virus Gumborske bolezni oz. adenovirusi. Okužbo z aviarnim pneumovirusom smo potrdili s serološkimi metodami v matičnih jatah A in C ter v jatah puranov F in G, vendar respiratornih znakov bolezni nismo zaznali v nobeni od okuženih rej. V raziskavo smo vključili tudi dve reji kokoši konzumnih nesnic, starih med 40 – 49 tednov. V obeh rejah je prišlo v omenjenem obdobju do višjega pogina s patološkimi spremembami značilnimi za kolisepse. V vseh primerih smo izolirali *E. coli*. Rezultati dodatnih laboratorijskih preiskav so pokazali, da sta bili obe jati močno invadirani z rdečo pršico (*Dermanyssus gallinae*), hkrati smo z molekularnimi preiskavami potrdili *Ornithobacterium rhinotracheale* in okužbo z *Mycolasmae synoviae*. V primerjavi z mesnimi tipi perutnine so množični pogini v rejah konzumnih načeloma redki, zato te izbruhe povezujemo s slabšim zdravstvenim stanjem perutnine zaradi sočasnih infestacij s paraziti in respiratornimi patogeni.

Eden od mogočih preventivnih ukrepov kolibaciloz je tudi cepljenje. Rezultati naše raziskave niso potrdili pozitivnega učinka uporabe atenuiranega živega cepiva, saj so bile skupne izgube v prvih tednih vzreje višje pri matični jati, ki je bila cepljena v primerjavi z jato, ki ni bila cepljena. Ob zaključku nesnosti smo primerjali proizvodne rezultate matičnih jat. Rezultati vseh matičnih jat so bili dobri. Najvišje število valilnih jajc na prevedeno kokoši je dosegla jata B, ki ni bila cepljena proti *E. coli*, najvišji odstotek izvalitve pa je bil dosežen v jati A, ki je bila cepljena proti *E. coli* z živim in

inaktiviranim cepivom. Ob tem je potrebno poudariti, da je izvalilnost v veliki meri odvisna tudi od načina- rigoroznosti odbire valilnih jajc. Učinek uporabe inaktiviranega cepiva pri matičnih jatah, odbira valilnih jajc in sanitarni ukrepi v valilnici se odražajo pri potomcih v prvem tednu. Nižje izgube smo potrdili v rejah brojlerjev, ki so izvirali iz cepljene jate, v nadaljnjih tednih pitanja se pogin med jatami ni več razlikoval. Proizvodni indeks kot pokazatelj uspešnosti reje pitovne perutnine, je bil med jatami primerljiv, vendar boljši v jatah A1 in A2.

Številna poročila navajajo, da lahko pričakujemo *E. coli* z ESBL/AmpC pri vseh vrstah in kategorijah perutnine. V raziskavi, ki je bila opravljena leta 2013 v Sloveniji, so bili rezistentni sevi potrjeni pri več kot 50% vzorcih perutninskega mesa odvzetega po zakolu (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS, 2015). Nismo pa razpolagali s podatki, kakšna je pojavnost in v katerem obdobju reje pride do vnosa rezistentnih sevov *E.coli* v jate perutnine. Z raziskavo smo potrdili prisotnost rezistentnih sevov v vseh treh kategorijah perutnine. Rezultati jasno kažejo, da se njihova pojavnost tekom reje zvišuje. Čeprav v okoljskih vzorcih niti v organih živali pred vselitvijo *E. coli* z ESBL nismo potrdili v nobeni od 11 načrtno spremljanih jat, smo tekom spremljanja reje te seve potrdili v vseh matičnih jatah ter pri pitovni perutnini. Večjo frekventnost pojavljanja rezistentnih sevov smo potrdili v rejah piščancev kot v rejah pitovnih puranov. Pri matičnih jatah so bili rezistentni sevi ugotovljeni v dveh jatah pri 4 tednih, v 12 tednu pa smo ESBL seve potrdili še pri tretji jati. Pri pitovni perutnini (piščanci in purani) smo *E. coli* z ESBL/AmpC potrdili pri treh jatah v prvem tednu po vselitvi, v petem tednu starosti pa so bili ti izolati potrjeni v vseh rejah piščancev. Naše ugotovitve sovpadajo s poročili iz drugih evropskih držav (Nemčija, Velika Britanija, Nizozemska), ki navajajo, da so v začetku reje rezistentni sevi pri živalih redko potrjeni (med 0 – 20%), že po tednu dni pa njihov odstotek močno naraste in ob zakolu doseže tudi 100%. V rejah piščancev in puranov pitovne perutnine smo seve ESBL/AmpC ugotovili v prvem tednu pri 37,5% testiranih jat, pred zakolom se je njihova pojavnost zvišala na 62.5%. Raziskava je tudi potrdila, da so rezistentni sevi prisotni tako v zraku kot tudi v iztrebkih in organih živali. Med različnimi tipi vzorcev statistično značilnih razlik nismo ugotovili. Posebej v začetku reje (1 teden pri pitovni perutnini in 4 teden pri matičnih jatah), so bili rezistentni sevi potrjeni v vseh treh matriksih istočasno, kar govori za možnost prenosa iz okolja in intenzivno kroženje rezistentnih sevov. Kljub temu, da neposrednega prenosa teh sevov iz matičnih jat na potomce nismo dokazali – dan stari piščanci so bili negativni na prisotnost *E. coli* z ESBL, pozitivne izolate z AmpC pa smo potrdili le v eni matični jati, je ta način prenosa vseeno zelo verjeten. Razlago, zakaj je tako težko odkriti te seve pri DSP gre najverjetneje iskati v sanitacijskih ukrepih valilnih jajc pred in med inkubacijo, po drugi strani pa tudi v fiziologiji razvoja črevesne mikrobiote pri mladih živalih. Potrditev rezistentnih sevov v zraku in iztrebkih nakazuje tudi na možnost okužb ljudi, predvsem delavcev na farmah. Z raziskavo, ki so jo opravili na Nizozemskem, so pri ljudeh, ki so bili v neposrednem stiku z živo perutnino, potrdili več rezistentnih sevov v primerjavi z drugimi, ki the stikov niso imeli. Filogenetska analiza rezistentnih sevov *E. coli* je pokazala, da je večina sevov z ESBL uvrščena v skupino A, kamor se sicer uvrščajo komenzalni sevi. Večina sevov AmpC pa je bila uvrščena v filogenetsko skupino D, za katero je značilno, da so patogeni tako za živali kot za ljudi. Med rezistentni sevi *E. coli* skupine B₂ oz. B₃ nismo potrdili. Pojav rezistentnih sevov se v veliki meri povezuje s prekomerno uporabo protimikrobnih zdravil. V okviru naše raziskave tega nismo potrdili. Relativni delež števila AmpC izolatov se med jatami ni razlikoval. Statistično značilni nižji delež ESBL izolatov je bil potrjen v jati C, ki ni bila zdravljena in je v krmi prejela kokcidiostatik, v primerjavi z jatama A (jata ni bila zdravljena) in jato B (zdravljena jata). Med jatama A in B nismo potrdili statistično značilne razlike v pojavnosti ESBL izolatov. Izolate *E. coli*, ki smo jih pridobili tekom študije, in 33 sevov, ki smo jih izolirali iz poginjenih živali z značilnimi znaki kolibaciloze, smo preiskali na prisotnost 19 genov, ki so potencialno povezani z patogenostjo *E. coli*. Primerjava frekventnosti pojavljanja genov je pokazala, da bi bilo mogoče ločiti

patogene seve od nepatogenih na osnovi detekcije genov *ompT*_{APEC}, *iss*, *traT*, *iroN* *iucD* in *iutA*. Rezultati ugotavljanja patogenosti izbranih izolatov, z različnim naborom genov za dejavnike virulence, za SPF kokošje embrije so delno potrdili molekularne ugotovitve, saj so izolati, ki so imeli vse navedene gene, povzročili od 45 do 95% zamrtost. Med predvidoma manj patogenimi sevi (dva izolata iz perutnine, cepni sev in izolat antilope) sta le dva povzročila pričakovano nižji odstotek zamiranja. Presenetljiva je ugotovitev, da je cepni sev povzročil visoko (60%) mortalnost zarodkov. Hitre in specifične diagnostične metode so ključne za ugotavljanje in preprečevanje širjenja patogenov. V okviru projekta smo razvili in optimizirali izotermalno metodo LAMP za določanje patogenih sevov *E. coli* pri perutnini na osnovi treh virulentnih genov. Najprej smo ugotovili najnižjo količino bakterij potrebnih za pozitivno reakcijo, potem smo delovanje metode preverili na različnih tipih vzorcev perutnine (kloakalni in trahealni brisi, notranji organi poginjenih živali) in okoljskih vzorcih (stelja, krma, feces, zrak). Na dveh ločenih lokacijah smo s hitro metodo LAMP potrdili prisotnost virulenčnih genov sevov APEC na vzorcih živali, ki so kazale morfološke spremembe značilne za kolisepse. Analiza LAMP je bila izvedena na lokaciji sami, kjer smo testirali omejeno število vzorcev in v manj kot 30 minutah dobili prve rezultate. Na ta način smo prikazali uporabnost metode LAMP za določanje patogenih mikroorganizmov na terenu. Vsi vzorci so bili testirani tudi v laboratoriju. Kljub temu, da smo analizirali različne tipe vzorcev, od brisov do krme in fecesa ter notranjih organov, smo v vseh naštetih matriksih lahko dokazali prisotnost bakterijske DNA. S tem smo potrdili neobčutljivost reakcije LAMP za inhibitorje, ki izvirajo iz različnih matriksov in tako pokazali, da je metoda zelo uporabna za delo na terenu, kjer nimamo možnosti za izvedbo postopka izolacije DNA. Metoda LAMP se je izkazala kot izredno hitra in zanesljiva za določanje izbranih virulenčnih genov *E. coli*.

SMERNICE IN PRIPOROČILA ZA OBVLADOVANJE KOLIBACILOZ V REJAH PERUTNINE

1. Občutljivost *E. coli* v okolju

Parameter	Opis
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> • občutljive so na višjo temperaturo • pri 60⁰C so aktivne pol ure, pri 70⁰C so obstojne 2 minuti. • T= 37⁰C obstojne 1 – 2 dni, • T= 4⁰C pa od 6 – 22 tednov. • Na zamrzovanje niso občutljive
Vlaga	Občutljive na izsuševanje
pH	Obstojne pH 4,5 – 9
Občutljivost na razkužila	Nekateri sevi so rezistentni na klorheksidin, formaldehid, hidrogen peroksid in kvartarne amonijeve spojine.

2. Načini širjenja okužbe/dejavniki tveganja in smernice ukrepov

Način širjenja- dejavniki tveganja	Priporočeni ukrepi
Horizontalno <ul style="list-style-type: none"> ➤ Kontaminacija jajčne lupine, okužba zarodka (žarišče infekcije je rumenjakova vrečka) ➤ Po izvalitvi se začne v prebavilih piščancev formirati mikroflora, razraščanje <i>E. coli</i> ➤ Prenos med živalmi (oralno fekalna pot) ➤ Kontaminirano okolje 	<p><i>Kvaliteta valilnih jajc:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - rigorozna odbira valilnih jajc na farmah - dezinfekcijo valilnih jajc je potrebno opraviti znotraj dveh ur - redno čiščenje in dezinfekcija valilnice (redne bakteriološke preiskave na število koliformnih bakterij) <p><i>Dan stari piščanci:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Preveriti kvaliteto DSP (zaprtost popka, obseg trebuščka, teža živali, živahnost) - Izločiti je potrebno živali, ki so slabotne in z vidnimi okužbami popka ter rumenjakove vrečke <p><i>Dodajanje preparatov kompetitivne ekskluzije</i></p> <p><i>Primerna gostota naselitve</i></p> <p><i>Objekti</i> morajo biti pred vselitvijo dobro očiščeni in razkuženi. Priporočljivo je <i>preveriti učinek dezinfekcije</i> z odvzemom brisov opreme na najmanj desetih mestih <i>Kritična mesta:</i> krmilniki, napajalniki, ventilacijski sistem V primeru , če je bila v <i>predhodnem turnusu</i></p>

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Krma ➤ Voda ➤ Glodavci ➤ Insekti (v larvah insektov <i>E. coli</i> preživi do 2 tedna) ➤ Prostoživeče ptice 	<p>ugotovljena kolibaciloza, je potrebno pooprčiti čiščenje in dezinfekcijo V primeru, če se ugotovi več kot 10^4 koliformnih bakterij v posameznem brisu, je potrebno razkužbo ponoviti</p> <p>Peletiranje krme</p> <p>Redna deratizacija Redna dezinfekcija</p> <p>Mreže na oknih</p>
Vertikalno	- Okuženi jajčnih folikli , jajcevod	Spremljanje zdravstvenega stanja starševskih jat , dnevni pogin, nesnost, patomorfološke preiskave

3. Dejavniki, ki vplivajo na povečano dovzetnost perutnine na okužbo z *E. coli* in smernice ukrepov

a. <u>Dejavniki</u>	
Virusne bolezni	Aviarna anemija, hemoragični enteritis puranov, inkluzijski hepatitis, kužni bronhitis, gumborska bolezen, atipična kokošja kuga, aviarna influenza, laringotraheitis, okužbe z aviarnim pneumovirusom, reoviroze
Bakterijske in glivične bolezni	Bordetelioza, kokošja korica , mikoplazmoze, klamidioza, pastereloza, klostridijski enteritis, aspergiloza, ornitobakterioza
Parazitarne infestacije	Askaridoza, kokcidioza, kriptosporidioza, histomonijaza, pršičavost
Toksini	NH ₃ , mikotoksini: aflatoksin, ohratoksin, fumonizini
Fiziološko stanje živali	Starost - občutljivejše so mlade živali, stres, spol - moške živali so bolj občutljive
Pogoji reje	Kontaminirana voda, suho in prašno okolje, restrikcija vode ali krme, prenaseljenost, slaba kakovost stelje, ekstremne temperature, višja koncentracija CO ₂ in NH ₃
Nutricijski dejavniki	Hipervitaminoza vit. E in A, avitaminoza A, nizka vsebnost beljakovin v krmi

b. Smernice ukrepov glede na dejavnike, ki vplivajo na pojav koli-infekcij

- **Programi imunoprofilakse** morajo biti prilagojeni epizootiološki situaciji na terenu (Priporočljivo je zaščitno cepljenje piščancev brojlerjev proti gumborski boleznim in

kužnemu bronhitisu, pitovnih puranov proti aviarnemu pneumovirusu in virusu hemoragičnega enteritisa. Kokoši nesnice (matične jate in konzumne nesnice) je potrebno cepiti proti Marekovi bolezni, kokcidiozi, salmonelam, kužnemu bronhitisu, gumborski bolezni ter po potrebi proti aviarnemu pneumovirusu).

- **Perutnina mora biti prosta mikoplazem** (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* in *M. meleagridis*)
- **Uspešnost zaščitnih programov cepljenja in okužb z mikoplazmami** je potrebno redno preverjati.
- V rejah perutnine je potreben **redni monitoring zunanjih in notranjih parazitov in preveniranje infestacij**. V rejah pitovne perutnine velja posebno pozornost posvetiti protozoarnim infestacijam, v rejah nesnic pa infestaciji z rdečo pršico.
- **Krmne mešanice** je potrebno redno preveriti na vsebnost mikotoksinov in na druge kazalnike kakovosti krme.
- Redno preverjanje nivoja **škodljivih plinov** v objektih z rejo perutnine (NH₃, CO₂).
- **V enem objektu ali na eni lokaciji je priporočljivo gojiti perutnino enake starosti in kategorije**.
- Na lokacijah, kjer se okužbe z *E. coli* ponavljajo, je potrebno **določiti značilnosti sevov** in se na tej osnovi odločiti **preventivna cepljenja**.
- **Zdravljenje kolibaciloz (izbruhov) je indicirano**. Priporočljivo je vedno opraviti bakteriološko preiskavo (difuzna rast *E. coli* ali določitev APEC) in antibiogram. Preveriti je potrebno, kateri dejavniki so privedli do izbruha kolibaciloze.

PRIPOROČILA ZA OBVLADOVANJE *E. coli* z ESBL/AmpC

- Vse matične jate kokoši in pitovne purane je potrebno ob vnosu (uvozu) v Slovenijo preiskati na prisotnost *E. coli* z ESBL in *E. coli* z AmpC. V primeru negativnega rezultata, je potrebno opraviti dodatno testiranje na prisotnost ESBL/AmpC *E. coli* v prvih dveh tednih po vselitvi (interes širše javnosti, ne le nosilca dejavnosti).
- V perutninskih objektih je potrebno vzdrževati biovarnostne ukrepe.
- Objekt, kjer se redi perutnine, mora imeti predprostor, ki je fizično ločen od prostora za rejo. Predprostor mora imeti tekočo vodo za umivanje, primerno milo in dozo z razkužilom. Pred vstopom v del s perutnino, je potrebno obleči zaščitno obleko in zaščitna obuvala.
- Ljudje, ki so v neposrednem stiku s perutnino, si morajo redno umivati in razkuževati roke. Priporočljiva je zaščita rok z rokavicami in obraza z masko.
- Ob izlovu oz. pitovne perutnine morajo biti lovilci zaščiteni z zaščitnimi oblekami, obuvali, rokavicami in zaščitno masko.
- Predlagamo sistematično spremljanje pitovne perutnine na prisotnost *E. coli* z AmpC/ESBL pred zakolom v povezavi z izvedeno protimikrobno terapijo (interes širše javnosti, ne le nosilca dejavnosti).